



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Generación de microportadores basados en mezclas de alginato de sodio y fibrinógeno

Ana Isabel Ramos Murillo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia

2013

Generación de microportadores basados en mezclas de alginato de sodio y fibrinógeno

Ana Isabel Ramos Murillo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:
Ph.D. Rubén Darío Godoy Silva

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia

2013

*Con amor y respeto infinito, a mis padres, por su
valentía, su fuerza y su carácter.*

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental por el apoyo brindado para el desarrollo de la tesis.

Así mismo, agradezco de forma especial a la profesora Carmen Alicia Cardozo de Martínez y al Laboratorio de Biomiméticos. Sin su soporte no hubiese sido posible el desarrollo del presente trabajo. A Janeth Sarmiento por apoyarme en la sala de cultivo de células animales y enseñarme todo lo concerniente al buen desempeño en el mismo.

A la profesora Sonia Ospina, por facilitarme el laboratorio de Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología. A Yolanda Pardo por toda su colaboración y ayuda en la preparación de los reactivos y el material.

Al profesor Fabio Aristizábal, a Claudia Cordero y a Margi Ibata por su soporte en la etapa final del proyecto para los ensayos de citotoxicidad y adhesión celular.

Al Hemocentro Distrital y a su director, el Dr. Bernardo Camacho, por creer en este proyecto y soportar el plasma humano necesario para el desarrollo del mismo.

Al director del proyecto, el Ing. Rubén Darío Godoy Silva por sus valiosos aportes durante el desarrollo del proyecto y su apoyo incondicional.

Al Ingeniero Mario Velásquez por su apoyo y colaboración en la ejecución de la tesis. A Helver Lesmes por su paciencia y ayuda en la preparación del material para los ensayos.

Al profesor Carlos Guerrero de la Facultad de Medicina quién aportó reactivos e ideas para el desarrollo del presente trabajo.

A la Ingeniera Lina M. Suárez y a Aura Rosa Prieto quienes me apoyaron en la etapa inicial de la maestría y estuvieron pendientes de toda mi evolución durante la misma.

A mis compañeros y amigos: Camilo Antonio Monroy Peña, Jenifer Carolina Serrano, Leonardo Camargo, Adriana Suesca, Luis Miguel Serrano, Daniel Ramírez, Liliana Ardila, Libardo

Estupiñán, Óscar Suarez y Marisol Herrera. Gracias por los buenos momentos que compartimos juntos.

Al Ing. Dionisio Malagón por su apoyo constante y su particular modo de enseñar. No lo hubiera logrado sin su ayuda.

A Ricardo, Edgar, Óscar, Luis Carlos y Jimmy en la planta piloto.

Al profesor Jairo Perilla por permitirme trabajar en el Laboratorio de Polímeros, empleando el reómetro y por sus aportes al presente trabajo. Al profesor Luis Ignacio Rodríguez por su asesoría en la selección de los sistemas de aspersión.

A la profesora Marcela Camacho del CIF, Adriana Urbina, Iván Camilo Navarrete, Abelino Vargas, Michel García y Lina García por el apoyo en el microscopio de fluorescencia invertido y los reactivos necesarios para realizar los ensayos.

A la profesora Martha Fontanilla y al Grupo de Investigación en Ingeniería de Tejidos por el apoyo representado en la donación de varios viales de células L929.

A Paola Martínez Murillo por el suministro de reactivos necesarios para el desarrollo de la presente investigación.

A mis amigos, Sandra Milena Castro Salazar, Víctor Manuel Trejos Montoya y Víctor Daniel Piedrahita Medina. Gracias por sus palabras de aliento y su confianza.

Finalmente y no por eso menos importante, a mi familia.

A mis padres Leonor Murillo Gil y Antonio Ramos Santiago por su apoyo incondicional y su esfuerzo constante para ayudarme a alcanzar este sueño. Gracias por creer en mí e impulsarme a seguir adelante.

A mis hermanos Antonio, Tobías y Dubán. Han sido y serán siempre mi soporte, mi impulso, mi motor para seguir adelante. Gracias por estar siempre ahí.

A mi tía Alejandra Murillo por escuchar mis ideas locas y continuar creyendo en este sueño a pesar de las adversidades.

A mi abuelo Domingo Ramos Garzón, por ser fuente de inspiración, sinónimo de lucha y tenacidad. Gracias, este triunfo es para usted.

Resumen

Los equivalentes tisulares son dispositivos artificiales que deben cumplir funciones similares a las del tejido que se quiere reemplazar. Muchas de las funciones de cada tejido son llevadas a cabo por células especializadas, cuyo crecimiento y supervivencia requiere de la existencia de un sustrato físico sobre el cual las células puedan anclarse. En el cuerpo humano tal sustrato es la matriz extracelular, pero en equivalentes tisulares al sustrato en mención usualmente se le denomina soporte. En el mercado ya existen múltiples equivalentes de piel que varían en el grado de complejidad, la presencia o no de células y el material de soporte empleado. El análisis de tales alternativas fue el objeto del capítulo 1, el cual presenta una revisión de la literatura en lo concerniente a equivalentes de piel comercialmente disponibles, sus pros y contras y las áreas que necesitan desarrollo.

El plasma sanguíneo humano (PH) es un material ampliamente estudiado para fabricar soportes usados en ingeniería de tejidos gracias a su contenido de fibrinógeno, proteína que puede polimerizarse para formar una red de fibrina; tal red puede servir de albergue para células y promueve su proliferación, así como la síntesis de matriz extracelular. Además, es biocompatible, biodegradable y como puede obtenerse directamente de la sangre, hace posible su aplicación para trasplantes autólogos. Sin embargo, los geles de fibrina obtenidos a partir de PH son frágiles y difíciles de manejar, cualidades indeseables durante un procedimiento quirúrgico. Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma sanguíneo humano, en el capítulo 2 del presente proyecto se evaluaron dos estrategias: la primera consistió en la combinación del PH con alginato de sodio, sustancia que tiene el mismo mecanismo de gelificación que el fibrinógeno (intercambio iónico con Ca^{+2}); la segunda consistió en el aumento de la concentración de fibrinógeno mediante crioprecipitación de PH para formar plasma humano crioprecipitado (PHCC). Las propiedades mecánicas de los geles obtenidos usando ambas estrategias se determinaron mediante reología dinámica; los resultados muestran que los geles fabricados a partir de PHCC tienen una resistencia mecánica mayor que los fabricados a partir de alginato de sodio, a partir de mezclas de alginato y PH o a partir de mezclas de alginato y PHCC; en todos los casos, la resistencia mecánica fue mayor a mayores concentraciones de Ca^{+2} . Las mejores propiedades mecánicas del gel de PHCC comparadas con las de PH, permiten sugerir su uso como material de soporte para ingeniería de tejidos sin las complicaciones adicionales de bioadhesión y biodegradabilidad que implica el uso de alginato. Sin embargo, el elevado tiempo de formación de gel con PHCC (de 10 a 30 min) y la

necesidad de controlar la temperatura a valores muy específicos (37 ± 1 °C) dificulta su uso para la generación de soportes a alta velocidad con formas preseleccionadas, como las requeridas para formar las microesferas de las que se habla en el capítulo 3; en dicho caso, la mezcla PHCC+1% p/v de alginato de sodio resulta más conveniente.

El desarrollo de equivalentes de piel con células requiere de la disponibilidad apropiada de estas últimas; el uso de células del propio paciente resultaría ideal para evitar cualquier problema de tipo inmunológico. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos la disponibilidad de células de piel del propio paciente es limitada como resultado de su condición patológica. Como alternativa, la expansión *in vitro* de una pequeña cantidad de células obtenidas del paciente mediante una biopsia podría vencer tal limitación, con tal que dicha expansión sea suficientemente rápida para proveer las células en un plazo prudente, de manera que el tratamiento llegue al paciente a tiempo para ayudarlo en su recuperación. Para aumentar la velocidad de crecimiento se propone el uso de un biorreactor en donde se mantengan condiciones óptimas de pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, el cultivo de células de piel requiere de un soporte sólido con suficiente área superficial para alojar la cantidad total de células necesarias; este requerimiento puede ser provisto fácilmente mediante el uso de microportadores. La primera parte del capítulo 3 describe la elaboración de microportadores basados en una solución de alginato de sodio al 1% p/v, solución que se usó como modelo para realizar el montaje de una metodología experimental, para detectar y solucionar problemas y obtener unas condiciones finales de operación, sin gastar plasma humano. Esta metodología fue posteriormente aplicada a la elaboración de microportadores basados en mezclas de plasma sanguíneo crioconcentrado (PHCC) y alginato de sodio al 1% p/v.

Finalmente, en el capítulo 4 se describe la metodología empleada para la evaluación de la adhesión celular y la citotoxicidad tanto en geles planos de PHCC y sus respectivas mezclas con alginato de sodio (al 0,5% y 1,0 % p/v), como en microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v. La citotoxicidad de los materiales se determinó empleando el procedimiento descrito en la norma ISO 10993-5 para dispositivos médicos que involucra la elución de extractos del material y su aplicación en un cultivo celular seguida por conteo por MTT. Los resultados indican que ninguno de los materiales evaluados resultó citotóxico. Igualmente se realizó la evaluación de la adhesión celular empleando técnicas de microscopía confocal y fluorescencia, usando Hoechst® para la tinción de núcleos de fibroblastos murinos de la línea celular L929 y CFSE® para tinción de citoplasma; se encontró que las células se adhirieron en todos los soportes seleccionados, incluyendo los microportadores.

Palabras clave: Plasma humano crioprecipitado, alginato de sodio, fibroblastos, equivalentes dérmicos, ingeniería de tejidos

Abstract

Tissue equivalents are artificial devices designed to do similar functions as to those of the biologic tissue they are intended to replace. Many of the tissue's functions are accomplished by specialized cells whose growth and survival require a solid substrate for cell attachment. In the human body, such physiological substratum is the extracellular matrix, but in tissue equivalents it is named scaffold. There is a large variety of skin equivalents commercially available which vary in their complexity, presence or absence of cells and material used for scaffold. Chapter 1 deals with a literature review about skin equivalents, their pros and cons and areas requiring further research and development.

Human plasma (PH) is a material widely studied as scaffold in tissue engineering due to its large content of fibrinogen, protein capable of polymerizing to make a fibrin net; such net can serve as shelter for cells, promoting their proliferation and extracellular matrix synthesis. In addition, fibrinogen is biocompatible, biodegradable and as it can be obtained directly from the own patient's blood, it is suitable for autologous transplants. However, fibrin gels derived from PH are fragile and hard to handle, both undesirable characteristics along a surgical procedure. Chapter 2 illustrates two strategies to improve mechanical properties of fibrin gels from human plasma. The first strategy consisted on mixing PH with sodium alginate, substance that shares the same gelling mechanism as the fibrinogen (Ca^{+2} ionic exchange); the second one involved increasing the concentration of fibrinogen by cryo-precipitation of PH to form human plasma cryoprecipitate (PHCC). The mechanical properties of gels from both strategies were assessed by dynamic rheology; results indicate that gels made of PHCC have a larger mechanical strength compared to those made of sodium alginate, sodium alginate mixed with PH or sodium alginate mixed with PHCC. In every case, the larger the concentration of Ca^{+2} , the larger was the mechanical strength of gels. The better mechanical strength of gels made only of PHCC compared to gels made of PH allow to suggest PHCC as a more suitable material to make scaffolds for tissue engineering, without the additional bioadhesion and biodegradability hurdles introduced by using alginate. However, the long time required for gelling (10 to 30 minutes) and the need to control very precisely the temperature (37 ± 1 °C), makes it very difficult to generate rapidly scaffolds with a preselected shape such as the microspheres described in chapter three. In such case, the mixture of PHCC with 1% w/v sodium alginate is more convenient.

The development of cellular tissue equivalents requires wide availability of the proper cells; the usage of cells from the own patient would be ideal to avoid any kind of immunological response. Unfortunately, in most cases, there is a shortage of skin cells from the patient as a result of

his/her pathological condition. As an alternative, *in vitro* expansion of a small amount of cells from a patient's skin biopsy would provide enough cells for the equivalent as long as growth is fast enough that the skin equivalent can be provided to the patient on time to help to his/her recovery. To increase growth rate, the use of a bioreactor with optimally controlled conditions of pH, temperature, dissolved oxygen and nutrients is proposed. However, as mentioned before, skin cells require a solid substratum with enough surface area to provide anchorage for the amount of cells needed; such requirements could be easily provided by using microcarriers. The first part of chapter 3 describes the procedure for production of microcarriers from a solution of 1% w/v sodium alginate, used as a model solution for setting up the experimental methodology, detecting problems and solving them without wasting human plasma. Once standardized, the methodology was applied to the production of microcarriers based on a human plasma cryoprecipitate (PHCC) with 1% w/v sodium alginate.

Finally, chapter 4 describes the methodology employed to assess cytotoxicity from and cell adhesion to sheet gels made of PHCC or of PHCC mixed with 0,5% or 1% w/v sodium alginate, as well as to microcarriers made of PHCC mixed with 1% sodium alginate. Cytotoxicity from gels was assessed following the procedure described in ISO 10993-5 for medical devices, which involves eluting an extract from the material, apply it into a cell culture and follow cell growth using MTT®. Results show no detectable cytotoxicity from any of the evaluated materials. Cell adhesion to gels was determined employing a confocal microscope and fluorescent dyes (Hoechst® for staining the nuclei of the murine fibroblastic L929 cell line and CFSE® for cytoplasm staining). It was found that cells adhered to all scaffolds, including microcarriers.

Keywords: human plasma cryoprecipitate, sodium alginate, fibroblast, dermal equivalent, tissue engineering.

Contenido

	Pág.
1. Antecedentes	5
1.1 Resumen	5
1.2 Piel	5
1.2.1 Estructura y función	5
1.2.2 Tipos de heridas	9
1.2.3 Proceso de reparación de heridas	11
1.3 Equivalentes de piel.....	15
1.3.1 Equivalentes epidérmicos.....	16
1.3.2 Equivalentes dérmicos.....	22
1.3.3 Equivalentes dermo-epidérmicos	37
1.4 Referencias	39
2. Material de soporte: Desarrollo y caracterización	45
2.1 Resumen	45
2.2 Introducción	46
2.3 Fibrinógeno y fibrina	46
2.3.1 Estructura molecular del fibrinógeno.....	47
2.3.2 Obtención del fibrinógeno.....	48
2.3.3 Función de la sangre en el cuerpo – cascada de coagulación.....	48
2.3.4 Hemostasia - Cascada de coagulación	49
2.4 Alginato de sodio	52
2.4.1 Estructura y caracterización	52
2.4.2 Peso molecular y solubilidad	53
2.4.3 Biocompatibilidad	53
2.4.4 Adhesión celular	53
2.4.5 Formación de hidrogeles de alginato.....	53
2.4.6 Biodegradación del alginato y sus hidrogeles	54
2.5 Propiedades mecánicas.....	54
2.5.1 Reología dinámica	54
2.5.2 Reología dinámica del alginato de sodio.....	61
2.6 Materiales y métodos.....	62
2.6.1 Plasma sanguíneo humano (PH).....	62
2.6.2 Plasma sanguíneo humano crioconcentrado (PHCC).....	62
2.6.3 Alginato de sodio 3% p/v.	62
2.6.4 Soluciones de CaCl ₂ a diferentes concentraciones	63
2.6.5 Evaluación rápida de las condiciones de la formación de gel	63

2.6.6	Evaluación de las propiedades mecánicas mediante reología dinámica	64
2.6.7	Análisis estadístico.....	66
2.7	Resultados y discusión.....	66
2.7.1	Evaluación rápida de las condiciones de la formación de gel.....	66
2.8	Reología dinámica	70
2.8.1	Pruebas de barrido de deformación	70
2.8.2	Pruebas de barrido de frecuencia.....	79
2.8.3	Comportamiento del ángulo de fase	83
2.9	Conclusiones.....	85
2.10	Referencias.....	85
3.	Desarrollo de una metodología para la elaboración de microportadores .	89
3.1	Resumen.....	89
3.2	Introducción	89
3.2.1	Características generales de los microportadores	91
3.2.2	Microportadores comerciales. Principales materiales empleados	91
3.3	Materiales y métodos	95
3.3.1	Alginato de sodio 1% p/v.....	95
3.3.2	Solución de CaCl ₂ al 3% p/v	95
3.3.3	Montaje empleado para la elaboración de los microportadores.....	95
3.3.4	Selección del cabezal de salida de aire	96
3.3.5	Condiciones de operación para el cabezal de salida de aire seleccionado.....	98
3.3.6	Caracterización morfológica y dimensional de los microportadores	99
3.3.7	Análisis estadístico.....	99
3.4	Resultados y discusión.....	99
3.4.1	Cabezal de aire N°1.....	99
3.4.2	Cabezal de aire N°2.....	100
3.4.3	Cabezal de aire N°3.....	102
3.4.4	Selección de las condiciones de operación para el cabezal N° 3	104
3.4.5	Distribución del tamaño de partícula	117
3.4.6	Análisis económico del montaje empleado	120
3.5	Conclusiones.....	121
3.6	Referencias.....	122
4.	Cultivo celular sobre el material de soporte	125
4.1	Resumen.....	125
4.2	Introducción	125
4.2.1	Adhesión celular	125
4.2.2	Cultivo de células animales en microportadores	128
4.3	Materiales y métodos	129
4.3.1	Plasma sanguíneo humano crioconcentrado (PHCC)	129
4.3.2	Alginato de sodio 3% p/v.....	130
4.3.3	Solución de CaCl ₂ al 3% p/v	130
4.3.4	Obtención de la mezcla PHCC – Alginato de sodio al 0,5% p/v.....	130
4.3.5	Obtención de la mezcla PHCC – Alginato de sodio al 1% p/v	130
4.3.6	Elaboración de geles de PHCC y alginato de sodio (0,5%p/v y 1,0%p/v)	131
4.3.7	Elaboración de geles de PHCC	131
4.3.8	Elaboración de microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v.	131
4.3.9	Cultivo celular en monocapa	133

4.3.10	Evaluación de la adhesión celular en láminas.....	133
4.3.11	Evaluación cualitativa de la adhesión celular en microportadores	134
4.3.12	Evaluación de la citotoxicidad del material	134
4.4	Resultados y discusión	135
4.4.1	Geles de PHCC y sus mezclas con alginato de sodio al 0,5 y al 1,0% p/v.	135
4.4.2	Adhesión celular	136
4.4.3	Adhesión celular en microportadores	143
4.4.4	Citotoxicidad del material	143
4.5	Conclusiones	144
4.6	Referencias	144
5.	Conclusiones y recomendaciones	149
	Conclusiones.....	149
	Recomendaciones	150
	Bibliografía	164

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1:	Capas y componentes de la piel7
Figura 1-2:	Ejemplos de lesiones cutáneas10
Figura 1-3:	Fases involucradas en la reparación de heridas. 11
Figura 1-4:	Apariencia de Epicel®. 17
Figura 1-5:	Apariencia de Epidex™.18
Figura 1-6:	Apariencia de Episkin™.18
Figura 1-7:	Apariencia de Epifast®.19
Figura 1-8:	Apariencia de Laserskin™. 20
Figura 1-9:	Apariencia de Myskin™. 20
Figura 1-10:	Apariencia de ReCell®.21
Figura 1-11:	Apariencia de Suprathel®. 22
Figura 1-12:	Esquema del proceso de elaboración de Alloderm®. 22
Figura 1-13:	Modo de uso de Alloderm®.23
Figura 1-14:	Presentación comercial de Biobrane™. 24
Figura 1-15:	Presentación comercial de Dermagraft®.25
Figura 1-16:	Proceso de obtención de Dermagraft®. 26
Figura 1-17:	Presentación comercial de Dermamatrix. 27
Figura 1-18:	Presentación comercial de EZ-Derm™. 27
Figura 1-19:	Presentación comercial de Glyaderm®. 28
Figura 1-20:	Composición de Graftjacket®. 29
Figura 1-21:	Presentación comercial de Hyalograft -3D™. 29
Figura 1-22:	Presentación comercial y especificaciones técnicas de Integra®.30
Figura 1-23:	Esquema de la evolución de un herida de piel reparada con Integra®. 31
Figura 1-24:	Estructura interna y externa de Matriderm®. 33
Figura 1-25:	Morfología interna y externa de Oasis®. 33
Figura 1-26:	Presentación comercial de Pelnac™.34
Figura 1-27:	Estructura externa de Permacol®.35
Figura 1-28:	Estructura externa de Repliform®.35
Figura 1-29:	Presentación comercial de Surederm®.36
Figura 1-30:	Mecanismo de acción de Terudermis®. 37
Figura 1-31:	Presentación comercial de Terudermis®.36
Figura 1-32:	Presentación comercial de Apligraf®. 37
Figura 1-33:	Presentación comercial Orcel®.38

Figura 1-34:	Apariencia de Stratagraft®	39
Figura 2-1:	Estructura molecular del fibrinógeno.....	47
Figura 2-2:	Formación del coágulo de fibrina.....	48
Figura 2-3:	Cascada de coagulación.....	50
Figura 2-4:	Estructura química de los bloques G y los bloques M del alginato	52
Figura 2-5:	Sólido ideal con la base fija a la superficie	55
Figura 2-6:	Deformación de cizalla	55
Figura 2-7:	Ley de Newton	56
Figura 2-8:	Respuesta sinusoidal al esfuerzo o deformación aplicada	57
Figura 2-9:	Tipo de material según la respuesta ante un esfuerzo o deformación aplicado	58
Figura 2-10:	Modulo complejo como combinación de dos vectores.....	59
Figura 2-11:	Reómetro y detalle de la trampa de solventes y el sistema <i>Peltier</i>	65
Figura 2-12:	Geometría de placas planas paralelas y ubicación de la película de gel.....	65
Figura 2-13:	Molde para troquelar los geles	66
Figura 2-14:	Formación de los geles de PH y alginato	67
Figura 2-15:	Estructura grumosa del PH a concentraciones de calcio de 3% p/v.	68
Figura 2-16:	Registro fotográfico de la formación de geles de PHCC y alginato.....	69
Figura 2-17:	Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'')	71
Figura 2-18:	Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') como función de la deformación para los geles fabricados con Plasma Humano (PH) y/o alginato de sodio (Alg). . F=1 Hz. T= 37°C.....	71
Figura 2-19:	Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') como función de la deformación para geles fabricados con mezclas de Plasma Humano (PH) y alginato de sodio al 1% p/v. F=1 Hz. T= 37°C.	73
Figura 2-20:	(a) Evolución del módulo complejo (G^*) como función de la deformación para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg). (b) Ampliación de la escala para la región de baja deformación. F=1 Hz. T= 37°C.	74
Figura 2-21:	(a) Comportamiento de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) como función de la deformación para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg). (b) Ampliación de la escala para la región de baja deformación. F=1 Hz. T= 37°C.	76
Figura 2-22:	Comportamiento de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) y del CV como función de la deformación para el gel fabricado con Plasma Humano (PH) y alginato de sodio al 0,5% (Alg).	77
Figura 2-23:	Efecto de la adición de alginato en las propiedades mecánicas de los geles formados con PH, empleando una solución de CaCl_2 al 3% p/v.	80
Figura 2-24:	Barrido de frecuencia para el PHCC sin alginato variando la concentración de calcio.	81
Figura 2-25:	Comparación entre el PHCC y el alginato de sodio al 1% p/v.....	82

Figura 2-26: Efecto de la adición de alginato en el comportamiento reológico de los geles formados con PHCC empleando una solución de CaCl_2 al 3% p/v.	83
Figura 2-27: Ángulo de fase de los geles formados	84
Figura 3-1: Montaje para la elaboración de microportadores	96
Figura 3-2: Sistema empleado en la aspersion. Tomado de (<i>Spraying-Systems-Co.</i> , 2012)....	96
Figura 3-3: Variables involucradas en el tamaño de partícula y su distribución.....	98
Figura 3-4: Patrón de rociado cabezal de aire N°1.....	99
Figura 3-5: Patrón de rociado cabezal de aire N°2.....	100
Figura 3-6: Patrón de rociado cabezal de aire N°3.....	102
Figura 4-1: Montaje para la elaboración de microportadores	132
Figura 4-2: Sistema empleado en la aspersion. Tomado de (<i>Spraying-Systems-Co.</i> , 2012)...	132
Figura 4-3: Geles de PHCC y sus mezclas con alginato de sodio al 0,5 y 1,0 % p/v. *NO: material sin células (control)	135
Figura 4-4: Geles de PHCC a diferentes concentraciones de alginato de sodio mostrando células L929 teñidas con Hoechst, luego de 4 días de cultivo.	136
Figura 4-5: Geles de PHCC y a diferentes concentraciones de alginato de sodio con células L929 teñidas con Hoechst con cortes en diferentes longitudes del eje z.	138
Figura 4-6: Geles de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v con células L929 teñidas con CFSE.	140
Figura 4-7: Geles de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v con células L929 teñidas con CFSE.	141
Figura 4-8: Comparación de la adhesión celular de L929 sobre PHCC-Alg. 1%p/v y una caja de cultivo tradicional (poliestireno).....	142
Figura 4-9: Adhesión celular de L929 sobre esponjas de gelatina y diamantes nanocristalinos	142
Figura 4-10: Adhesión celular de fibroblastos L929 sobre diferentes microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v.	143

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Proteínas de la coagulación sanguínea. Factores de coagulación	51
Tabla 2-2: Matriz de ensayos para determinar la formación de gel	64
Tabla 2-3: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con PH	67
Tabla 2-4: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con PHCC .	68
Tabla 2-5: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con agua destilada	69
Tabla 2-6: Condiciones evaluadas mediante reología dinámica	70
Tabla 2-7: Valores característicos del punto crítico para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg). ...	78
Tabla 3-1: Relación entre el tamaño de partícula y el área superficial	90
Tabla 3-2: Relación entre el tamaño de partícula y el área superficial total	90
Tabla 3-3: Microportadores comerciales.	92
Tabla 3-4: Microportadores evaluados para el crecimiento de hESC (<i>human Embryonic Stem Cells</i>)	93
Tabla 3-5: Cabezales de aire evaluados	97
Tabla 3-6: Condiciones de operación y cabezales de aire evaluados	97
Tabla 3-7: Parámetros evaluados generación de microportadores	98
Tabla 3-8: Microesferas obtenidas con el cabezal de aire N° 1	100
Tabla 3-9: Microesferas obtenidas con el cabezal de aire N° 2	101
Tabla 3-10: Microesferas obtenidas con la boquilla N° 3	103
Tabla 3-11: Ensayo 1	105
Tabla 3-12: Ensayo 2	106
Tabla 3-13: Ensayo 3	107
Tabla 3-14: Ensayo 4	108
Tabla 3-15: Ensayo 5	109
Tabla 3-16: Ensayo 6	110
Tabla 3-17: Ensayo 7	111
Tabla 3-18: Ensayo 8	112
Tabla 3-19: Ensayo 9	113
Tabla 3-20: Ensayo 10	114
Tabla 3-21: Ensayo 11	115
Tabla 3-22: Ensayo 12	116

Tabla 3-23: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros inferiores a 100 μm	117
Tabla 3-24: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros entre 100 y 300 μm	119
Tabla 3-25: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros mayores a 300 μm	120
Tabla 3-26: Costos del montaje empleado en la formación de los microportadores	121
Tabla 3-27: Costos Encapsulador B395 50/60 de BUCHI.....	121
Tabla 4-1: Tamices ASTM serie fina usados para clasificar los microportadores (ASTM, 2011)	133
Tabla 4-2: Resultados de citotoxicidad de los geles de PHCC con diferentes concentraciones de alginato (n=3) en células L929.	144
Tabla A-1: Parámetros para el cultivo celular	153

Introducción

La piel recubre el cuerpo en su totalidad y es el órgano más grande en cuanto a su peso y superficie. Cubre un área de aproximadamente 1.5 a 2 m² en un adulto y representa alrededor del 10% del peso corporal. La principal función de la piel es la de actuar como una barrera protectora frente al medio exterior. Así mismo, regula la temperatura corporal y evita la pérdida de agua mediante la transpiración y la circulación sanguínea. Las heridas de la piel que más afectan la calidad de vida de los pacientes son aquellas causadas por quemaduras de segundo o tercer grado, o aquellas crónicas como las que sufren los pacientes con diabetes.

Dentro de las alternativas existentes para el tratamiento de este tipo de heridas se encuentran los equivalentes cutáneos, sin embargo su alto costo limita su aplicación en países en desarrollo como Colombia. La presente investigación hace parte de un proyecto macro, liderado por el Grupo de Investigación de Reactivos Biológicos en asociación con el Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia, que tiene como objetivo la obtención de un equivalente cutáneo de bajo costo aplicable a nivel clínico en países con economías emergentes como la colombiana.

Una de las etapas de este proyecto macro comprende la evaluación del fibrinógeno, proteína presente en el plasma sanguíneo humano, como material de partida para la elaboración de equivalentes cutáneos, atendiendo a los resultados favorables reportados en España por Meana y colaboradores (1998), donde a partir de plasma humano y células autólogas forman un equivalente de piel biocompatible y biodegradable.

Al estudiar en detalle este desarrollo se encontró que el hidrogel obtenido es débil mecánicamente y requiere ser soportado sobre una gasa para su trasplante. Así mismo, se encontró que se requieren entre 15 a 20 días para proliferar las células autólogas obtenidas de la biopsia del paciente.

Se hacía necesario:

1. Mejorar las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma humano
2. Disminuir el tiempo requerido para alcanzar la concentración celular necesaria para cubrir el material.




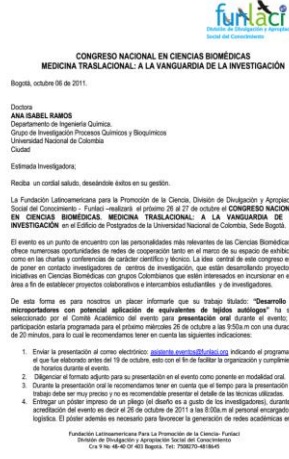
Se propuso

1. Se plantean dos alternativas para **mejorar las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma sanguíneo humano**. La primera consiste en la mezcla del plasma humano (PH) con alginato de sodio, que es un material polimérico, ampliamente empleado en ingeniería de tejidos que tiene un mecanismo de formación de gel similar al del fibrinógeno presente en el PH y consiste en intercambio iónico con calcio (Ca^{++}). Los geles obtenidos con alginato de sodio son resistentes y manipulables. El objetivo es obtener un gel con propiedades mecánicas intermedias, dadas por la mezcla de alginato de sodio con PH y su entrecruzamiento mediante intercambio iónico con calcio. La segunda estrategia considera el aumento de la concentración del fibrinógeno en el PH, empleando un subproducto del mismo conocido como plasma humano crio concentrado (PHCC). El PHCC se obtiene centrifugando PH a bajas temperaturas del PH y se puede aumentar hasta 10 veces la concentración del fibrinógeno por unidad de volumen.
2. Los fibroblastos, que son las células que predominan en la dermis son anclaje dependientes, por lo tanto en un cultivo 2D hay limitaciones por área superficial y por transferencia de oxígeno y de nutrientes. Si se usa un esquema 3D, cambiando el método de cultivo tradicional en frascos T por un cultivo a nivel de biorreactor empleando partículas de tamaño micrométrico como soporte, se puede disminuir el tiempo necesario para alcanzar una concentración celular determinada, partiendo de una biopsia autóloga.

En este contexto, el **objetivo general** de la presente investigación fue generar y caracterizar partículas de tamaño micrométrico (microportadores) a partir de un material de propiedades mecánicas mejoradas procedente de mezclas de alginato de sodio y plasma humano, que permitieran el crecimiento celular de fibroblastos dérmicos. Para esto, se hizo necesario evaluar diferentes concentraciones de alginato y PH que permitieran la formación de gel mediante intercambio iónico con calcio, también en diferentes concentraciones. Dado que la presente investigación tenía características exploratorias y se constituía en la primera vez que el Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos abordaba este campo del conocimiento, fue necesario desarrollar y estandarizar todas las técnicas empleadas, desde la elaboración de los geles, la evaluación de las propiedades mecánicas hasta la metodología para la obtención de microportadores.

La presente investigación establece las bases para futuras investigaciones en esta área del conocimiento y se constituye en un avance significativo, no solo por los resultados obtenidos sino por la infraestructura para el desarrollo de la misma.

Divulgación de la investigación en eventos científicos

		<p style="text-align: center;">ORAL PRESENTATION</p> <p style="text-align: center;">23-25 de mayo de 2012</p> <p style="text-align: center;">Würzburg, Alemania</p> <p style="text-align: center;"><i>"Improved Human Fibrin with alginate as a scaffold for Tissue Engineering of skin. Microfluidic approach"</i></p>
		<p style="text-align: center;">PRESENTACIÓN ORAL</p> <p style="text-align: center;">26 y 27 de octubre de 2011</p> <p style="text-align: center;">Bogotá, Colombia</p> <p style="text-align: center;"><i>"Desarrollo de microportadores con potencial aplicación de equivalentes de tejidos autólogos"</i></p>

Acércate al desarrollo y vive un cambio
del 20 al 23 de Septiembre.
Centro de Convenciones Teatro Los Fundadores

CIB
CONGRESO IBEROAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD
NATURALEZA Y BIOTECNOLOGÍA

Conferencistas Internacionales en el CIBB 2011

Clara Barahona PhD, Director IREC, Ciudad Real, Department of Agriculture USA
Francisco Escobar PhD, Director CONICET, Argentina
María Ester Latorre PhD, Directoras IICM, Argentina
Diana Casado PhD, Universidad de Sevilla, España
José Manuel Serrano PhD, Universidad de La Laguna, España

Michael Sengen PhD, Director IREC, Ciudad Real, Department of Agriculture USA
Paul Reid PhD, Ciudad Uchire, Venezuela
Julian Wlodawski PhD, London, Reino Unido
Marta Casades PhD, Fribourg, España

CIB
CONGRESO IBEROAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD
NATURALEZA Y BIOTECNOLOGÍA

Manizales, Agosto 13 de 2011

Señora
Ana Isabel Ramos Muñoz
Grupo de Investigación Procesos Químicos y Bioquímicos
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá D.C., Colombia

En nombre del Comité Académico del II Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad tengo el placer de informarle que fue aceptado para su presentación en la modalidad de **PRESENTACIÓN ORAL**, el trabajo de investigación:

"Generación de microportadores para el cultivo de fibroblastos al interior de un biorreactor".

De los autores: Ramos AI, Melagón DH, Gofroy RD, Cardatos CA.

Las ponencias tendrán lugar los días 22 y 23 de septiembre de 2011 en el Centro Cultural y de Convenciones Teatro Los Fundadores, de la ciudad de Manizales.

Su trabajo será presentado en la sesión de Biotecnología Farmacéutica y Cosmética el **Jueves 22 de Septiembre de 2011 a las 3:45 PM en el auditorio Olimpia**. El tiempo disponible para su exposición es de 15 minutos, incluido el tiempo dedicado a preguntas. Se le solicita entregar el archivo powerpoint al coordinador de sala a las 1:45 PM para tener lista su presentación en el horario asignado.

Cordial saludo,

Daniel Hedromont
Daniel Hedromont
Director General
II Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad

PRESENTACIÓN ORAL

20 al 23 de septiembre de 2011

Manizales, Colombia

"Generación de microportadores para el cultivo de fibroblastos al interior de un biorreactor"

III Curso - Congreso Internacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa
Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

termis
RESEARCH CENTER
Tissue Engineering and Regenerative Medicine
International Society
http://www.termis.org/

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
Departamento de Farmacia
Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

GOBERNACION DE CUNDINAMARCA

Comité Saludo.

Se le comunica cordialmente que el trabajo titulado: **"GENERACIÓN DE MICROPORTADORES PARA EL CULTIVO DE FIBROBLASTOS AL INTERIOR DE UN BIORREACTOR"** presentado en el II Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad, fue aceptado por el comité científico para participar en la modalidad presentación oral.

Los trabajos inscritos y aprobados en Presentación Oral concurren a la categoría premio, donde se entregarán los días 22 mejores trabajos. Los trabajos aprobados para presentación oral deben ser presentados en un tiempo máximo de 20 minutos el día 28 de mayo en la hora indicada por el comité organizador. Posteriormente se enviará la programación para la presentación de trabajos aprobados en el congreso.

Por favor tener en cuenta que el pago de inscripción al curso incluye solamente la participación como expositor en el curso y el congreso, pero el pago por la participación en el congreso no incluye la participación en las actividades del curso. El congreso de los trabajos que son aceptados para participar en el congreso no incluye el pago de inscripción al curso. Se le comunicó de su participación en el congreso de acuerdo a si es estudiante o profesional de la Universidad Nacional o de otras universidades.

Categoría	Presentación	Reservación	Programa del 27 de mayo de 2011	Programa del 28 de mayo de 2011
Estudiante	150.000	150.000	150.000	150.000
Profesional	300.000	300.000	300.000	300.000
Profesional área Universitaria	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000

Para oficializar el registro del trabajo en el programa del congreso, le pedimos el favor de hacer llegar el comprobante de pago de participación al congreso a este correo electrónico antes del 11 de mayo. La lista de inscripción se dará después de esta fecha, cancelada su presentación y su trabajo no será incluido en el CD del Congreso.

Es importante tener en cuenta la nota que aparece en el link de inscripciones de la página web del evento. La inscripción al curso incluye la participación como expositor al curso y al congreso, la inscripción al congreso solo permite la participación como expositor de trabajos aceptados en el congreso que se llevará a cabo el 28 de mayo pero no incluye la participación en las actividades del curso. Se le comunicó de su participación en el congreso de acuerdo a si es estudiante o profesional de la Universidad Nacional o de otras universidades.

Agradecemos su participación, para cualquier duda o comentario no dude en contactarnos.

Acreditación:
Comité Organizador
Grupo de Trabajo en **Ingeniería de Tejidos**
Universidad Nacional de Colombia
Tel: 31050000 Ext: 14064-14068

PRESENTACIÓN ORAL

25 al 28 de mayo de 2011

Bogotá, Colombia

"Generación de microportadores para el cultivo de fibroblastos"

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Ingeniería
V Coloquio de Ingeniería Químicas UN

V Coloquio de Ingeniería Químicas UN
II Encuentro de Egresados de Ingeniería Química
II Encuentro de Egresados de Ingeniería de Alimentos

Objetivo general
Reunir a un grupo de egresados de los diferentes programas de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), mediante el cual se analicen temáticas de alta relevancia para la ingeniería química colombiana, y se realice el intercambio de resultados del trabajo académico de su programa.

Objetivos específicos
• Promover un espacio de intercambio de ideas académicas y los riesgos que conlleva una salida de talento de la universidad y motivación de los mismos miembros, si no se consideran otros mecanismos de vinculación con el medio.
• Crear un espacio de intercambio de ideas académicas y los riesgos que conlleva una salida de talento de la universidad y motivación de los mismos miembros, si no se consideran otros mecanismos de vinculación con el medio.
• Crear un espacio de intercambio de ideas académicas y los riesgos que conlleva una salida de talento de la universidad y motivación de los mismos miembros, si no se consideran otros mecanismos de vinculación con el medio.
• Crear un espacio de intercambio de ideas académicas y los riesgos que conlleva una salida de talento de la universidad y motivación de los mismos miembros, si no se consideran otros mecanismos de vinculación con el medio.
• Crear un espacio de intercambio de ideas académicas y los riesgos que conlleva una salida de talento de la universidad y motivación de los mismos miembros, si no se consideran otros mecanismos de vinculación con el medio.

V COLOQUIO DE INGENIERÍA QUÍMICA UN
II Encuentro de Egresados de Ingeniería Química UN
II Encuentro de Egresados de Ingeniería de Alimentos UN

Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel

Proceso Químico Biotecnológico
Ana Isabel Ramos Muñoz, Rafael David Gofroy Muñoz
Grupo de Investigación en Biotecnología y Bioingeniería
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Introducción
El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel. Este trabajo se realizó en el marco del proyecto de investigación "Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel" financiado por el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

Metodología
El desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel se realizó en el marco del proyecto de investigación "Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel" financiado por el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

Resultados
El desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel se realizó en el marco del proyecto de investigación "Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel" financiado por el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

Conclusiones
El desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel se realizó en el marco del proyecto de investigación "Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel" financiado por el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

PÓSTER

28, 29 y 30 de junio de 2012

Bogotá, Colombia

"Desarrollo de un soporte mejorado para uso en Ingeniería de Tejidos. Caso de estudio: Piel"

1. Antecedentes

1.1 Resumen

En el presente capítulo se describe la piel como órgano fundamental del cuerpo, se aborda su estructura y función, así como los tipos de heridas que puede sufrir y el proceso de reparación que se lleva a cabo cuando éstas ocurren. Se presentan de forma detallada algunas de las alternativas tecnológicas existentes para el tratamiento de heridas cutáneas.

1.2 Piel

La piel actúa como barrera física entre el cuerpo y el ambiente exterior, aislándolo de sustancias tóxicas y organismos patógenos y sirviendo como mecanismo regulador de la pérdida de agua y electrolitos (Parenteau *et al.*, 2000; Falanga & Faria, 2007; Huang *et al.*, 2010; Groeber *et al.*, 2011). Así mismo, protege al cuerpo de impactos fuertes, radiación UV y desempeña un papel importante en la termorregulación, detección sensorial y curación de heridas (Ghosh & Clark, 2007; Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

1.2.1 Estructura y función

La piel cumple funciones activas que son llevadas a cabo por células especializadas y por estructuras ubicadas en dos capas principales, la **epidermis** y la **dermis**, que están separadas una de la otra por la **membrana basal**. La relación entre éstas le permite a la piel mantener su estructura y cumplir adecuadamente sus funciones.

Otro de los componentes principales de la piel, entendiendo a ésta como el órgano más extenso del cuerpo es la **matriz extracelular** constituida por un conjunto de macromoléculas, localizadas por fuera de las células, que en conjunto forman el ecosistema donde la célula realiza sus funciones vitales: multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y fisiológicos indispensables para la supervivencia de los tejidos vitales de los organismos vivos de las diferentes especies (Silvera & Barrios de Zurbarán, 2002).

- **Epidermis**

La **epidermis** es la capa externa de la piel (**Figura 1-1**), conformada por una estructura celular multicapa con poca o ninguna matriz extracelular. Por ser un epitelio, carece por completo de

vasos sanguíneos y se nutre por difusión de los capilares del tejido conjuntivo subyacente (Cepeda, 1999).

Los **queratinocitos** son las células predominantes de la **epidermis** la cual puede dividirse en cuatro capas o estratos según la morfología de los queratinocitos (desde lo más profundo a lo superficial):

- Basal
- Espinoso
- Granuloso
- Córneo

Cada capa celular en la epidermis representa diversas etapas a lo largo de un proceso en el cual los **queratinocitos** del estrato basal sufren un ciclo continuo de proliferación, diferenciación y apoptosis, que implican su desplazamiento desde la capa basal hasta la superficie, para producir finalmente **corneocitos** que son células muertas compuestas principalmente por queratina y forman el estrato córneo (Menon *et al.*, 2012). Al pasar a través de los estratos espinoso y granuloso, los queratinocitos basales sufren cambios morfológicos que los hacen más planos en la estructura debido a la pérdida de su viabilidad celular y finalmente se transforman en restos celulares. En edades tempranas, la epidermis se renueva en promedio cada 28 a 30 días, mientras que en pieles envejecidas este proceso puede tardar hasta 40 días (Oblong & Millikin, 2009).

El **estrato basal o germinativo**, ancla la dermis con la epidermis y está compuesto de células cuboidales que forman una capa continua unida a la **membrana basal**. En este estrato proliferan las células epiteliales que por diferenciación pasan progresivamente a las zonas superiores hasta que alcanzan el **estrato córneo**, donde forman una capa de células muertas en forma de escamas y rica en queratina, y luego se desprenden en un proceso conocido como **descamación** (Falanga & Faria, 2007).

La capa **epibasal o estrato espinoso** está formado por queratinocitos poliédricos; se distingue por contar con numerosos puntos de anclaje o **desmosomas** interconectando las células para producir una red celular estable. Los desmosomas no sólo proveen un medio de adhesión intercelular, sino que también son el centro para la organización interna del citoesqueleto, particularmente tonofilamentos.

El **estrato granuloso** está caracterizado por la deposición intracelular de gránulos de **queratohialina**, que son partículas de forma irregular de unos 2 nm. de diámetro, sin membrana limitante organizadas en filas o celosías. Las células del estrato granuloso no se dividen y en su lugar se diferencian a queratinocitos. Éstos al ser desplazados hasta al **estrato córneo**, que es la capa superficial, se aplanan, rompen su núcleo y otros organelos y forman un entrecruzado de proteínas bajo su membrana celular. Esta envoltura proteica se conecta a una densa red de filamentos intracelulares de queratina para proveer resistencia física adicional a la epidermis (Price *et al.*, 2008).

Aunque en la epidermis predominan los queratinocitos, también se encuentran otros tipos celulares tales como melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans.

Los **melanocitos** son células especializadas en la producción de **melanina**, la cual se distribuye a los queratinocitos circundantes en el estrato basal. La melanina es el pigmento responsable de la coloración de la piel y protege a la epidermis y a la dermis de la radiación ultravioleta (Kindred *et al.*, 2009).

Las **células de Merkel** son células intraepiteliales de la piel que se asocian con la detección mecano sensorial a través de conexiones a las terminaciones nerviosas de la piel.

Las **células de Langerhans** son células dendríticas que se encuentran principalmente en el estrato espinoso de la epidermis y sirven como una primera línea de defensa para ayudar a prevenir infecciones; así mismo, bloquean crecimientos celulares aberrantes (células tumorales) y participan en la respuesta inmune del organismo, emigrando desde la piel hasta los ganglios linfáticos regionales (Quinn, 2004).

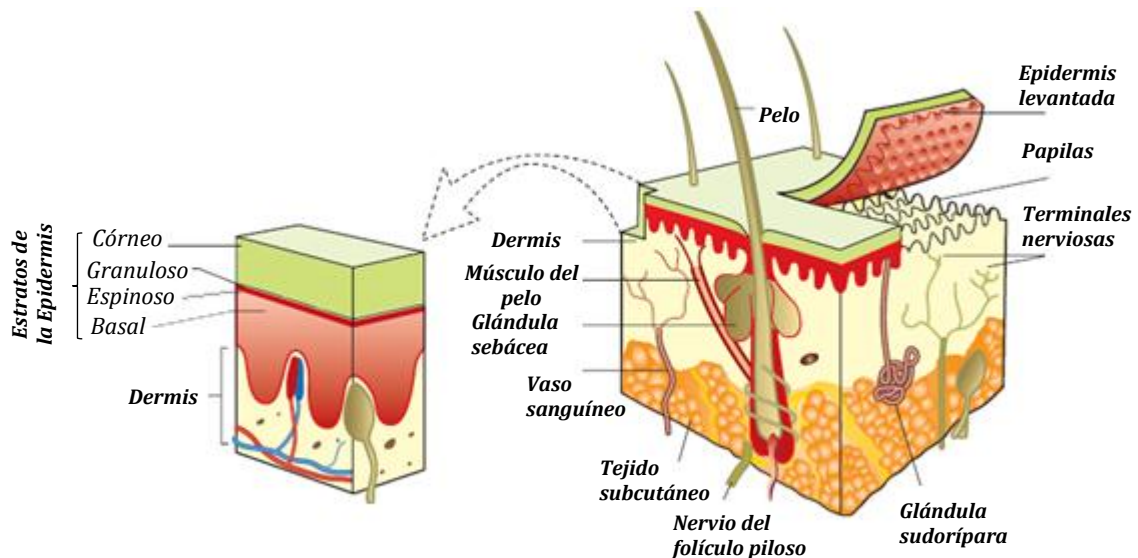


Figura 1-1: Capas y componentes de la piel
Tomado y adaptado de Price *et al.* (2008)

▪ Dermis

La **dermis** es la capa subyacente a la epidermis y la componen dos regiones: **la dermis papilar**, que se encuentra justo debajo de la epidermis y **la dermis reticular profunda** que es más acelular y está compuesta principalmente de una matriz extracelular de fibrillas de colágeno entrecruzadas. Entre las fibras de colágeno se intercalan fibras elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas, que le proveen a la piel fuerza, flexibilidad y elasticidad. Es debido a su conformación estructural que la pérdida de la dermis reticular da lugar a la contracción de la herida produciendo así una significativa cicatrización (Parenteau *et al.*, 2000).

En la dermis se extiende una red de fibras que desempeñan el rol sensitivo de la piel. Estas fibras nerviosas también secretan neuropéptidos que influyen en la respuesta inmune y en la respuesta inflamatoria de la piel a través de sus efectos en las células endoteliales, leucocitos y queratinocitos (Parenteau *et al.*, 2000; Lai-Cheong & McGrath, 2009).

Los principales componentes de la dermis son **fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, y mastocitos**. Se encuentran principalmente alrededor de la región papilar, aunque también es posible encontrarlos en la dermis reticular entre las fibras de colágeno. Los **fibroblastos** son células de origen mesenquimal que migran a través del tejido y son los responsables de la síntesis y degradación de los componentes fibrosos y no fibrosos de la matriz extracelular y de algunos factores solubles. Los **fibroblastos** proveen de un marco estructural a la matriz extracelular a la vez que promocionan la interacción dermo-epidérmica mediante la síntesis de mediadores solubles. Así mismo, desempeñan un rol importante en la reparación de heridas y en la cicatrización, donde aumentan su proliferación y actividad sintética (Celleno & Tamburi, 2009).

Las **células endoteliales** recubren el interior de los vasos sanguíneos y desempeñan un papel fundamental en el sistema inmune de la piel mediante el control de la extravasación de leucocitos, que hace referencia al movimiento de éstos fuera del sistema circulatorio hacia el sitio del daño o de la infección del tejido (Williamson & Harding, 2004).

Los **macrófagos**, monocitos y células dendríticas dérmicas, constituyen el sistema de células fagocíticas mononucleares en la piel. Los macrófagos derivan de precursores en la médula ósea, se diferencian en monocitos circulantes en el torrente sanguíneo, luego migran a la piel para diferenciarse en macrófagos. Estas células son fagocíticas, procesan y presentan antígenos, son microbicidas, tumoricidas, secretan factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas inmunomoduladoras, y están involucradas en la reparación de heridas y remodelación de tejidos (Enoch & Leaper, 2005).

Los **mastocitos** son células secretoras especializadas que en la piel están presentes en gran densidad en la dermis papilar, cerca de la unión dermoepidérmica, y alrededor de vasos sanguíneos y nervios del plexo subpilar. También son comunes en la grasa subcutánea. Los mastocitos son identificados histológicamente por un núcleo oval y redondeado y por

abundantes gránulos oscuros citoplasmáticos. La superficie de los mastocitos está cubierta con fibronectina que probablemente asegura a la célula a la matriz de tejido conectivo. En determinados estados de activación pueden volverse hiperproliferativos e hiperplásicos (mastocitosis). Los mastocitos son responsables de la reacción de hipersensibilidad inmediata en la piel y en el mantenimiento de estados inflamatorios subagudos y crónicos (Falanga & Faria, 2007).

Otro componente de la dermis son las **glándulas sudoríparas** que ayudan a regular la temperatura del cuerpo a través de la evaporación de sudor secretado en la superficie de la piel. Las **glándulas sebáceas** asociadas con los folículos pilosos secretan sebo, una sustancia oleosa que lubrica y humecta el cabello y la epidermis. El **vello** mantiene la temperatura del cuerpo en muchos mamíferos; sin embargo, ésta no es su principal función en los seres humanos, en donde son una importante fuente de proliferación de queratinocitos durante el proceso de re-epitelización después de heridas severas (Falanga & Faria, 2007).

1.2.2 Tipos de heridas

Se pueden distinguir diferentes tipos de heridas de acuerdo con la fuente u origen de las mismas, como se muestra en la **Figura 1-2** (Hansaplast®, 2012).

Cortes. Se generan por un impacto agudo violento, generalmente con elementos cortopunzantes u objetos afilados. A menudo generan sangrado por el rompimiento de los vasos sanguíneos circundantes.

Heridas punzantes: Son aquellas producidas por objetos puntudos como clavos, agujas, anzuelos o mordeduras de serpientes.

Contusiones: Impacto romo violento (por ejemplo, al cerrar una puerta) que deja bordes irregulares, en la herida y hemorragia en el tejido subyacente. Tendencia a la formación de cicatrices. Las contusiones a gran escala precisan una atención médica profesional para mejorar el pronóstico curativo.

Desgarros: (Por ejemplo, al serrar). En el momento de una sobreexpansión y distensión del tejido, la elasticidad deja bordes irregulares, mellados en la herida; la curación de la misma se desacelera a menudo y existe una tendencia a la formación de cicatrices. Los desgarros de mayor tamaño requieren limpieza quirúrgica, recortando los bordes de la herida y cerrándola por medio de suturas.

Abrasiones: (Por ejemplo, después de rascar la piel). Habitualmente son inocuas, pero a menudo contaminan las capas cutáneas superiores. Las abrasiones de mayor tamaño son muy dolorosas, dado que la lesión se extiende a las numerosas terminaciones nerviosas finas subyacentes a la piel.

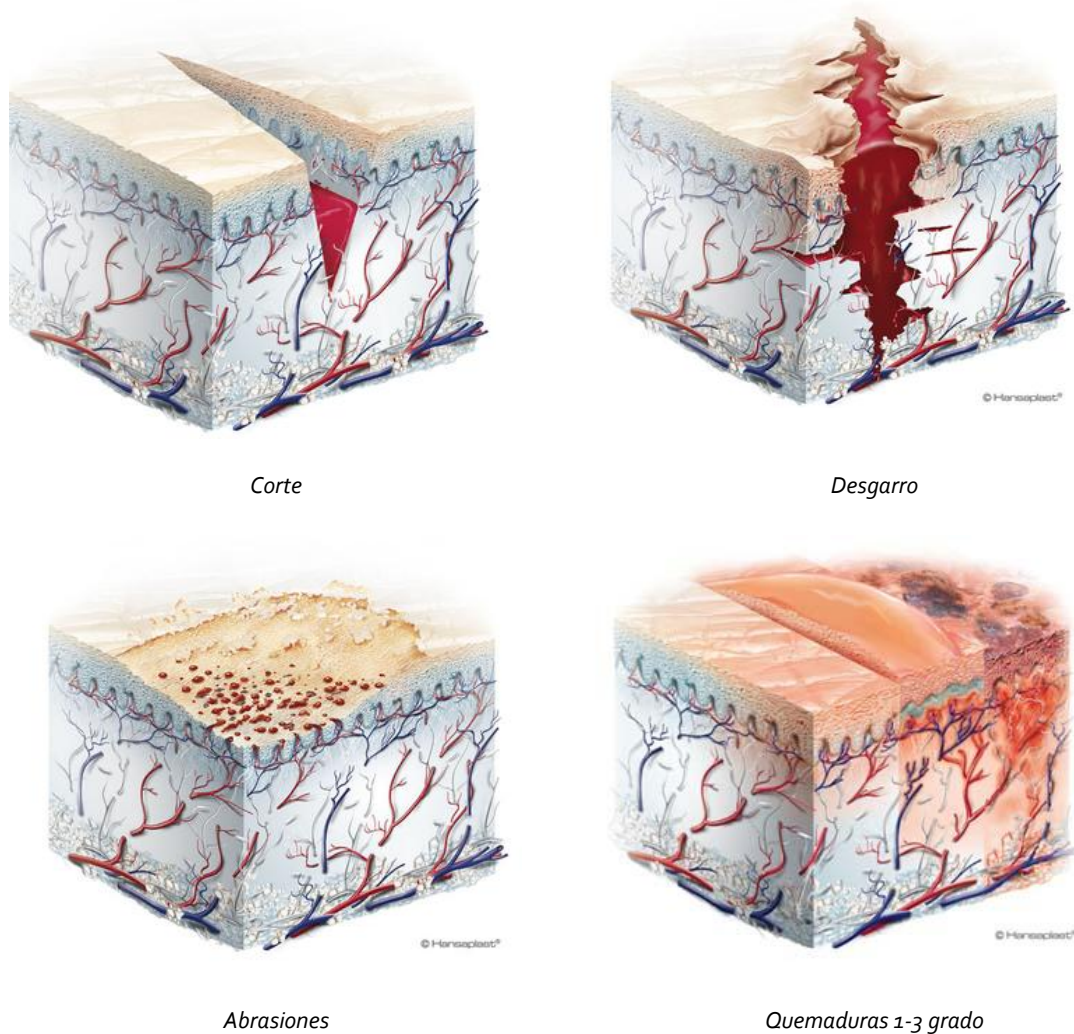


Figura 1-2: Ejemplos de lesiones cutáneas.
Tomado y adaptado de Hansaplast® (2012)

Quemaduras: Se distinguen tres tipos de quemaduras de acuerdo con el alcance de la lesión:

- De primer grado: son superficiales, sólo afectan a la epidermis. La zona quemada se enrojece y se presenta una leve hinchazón. Aunque causa dolor, la zona afectada permanece seca y sin ampollas. Un ejemplo es la quemadura solar leve. El daño tisular a largo plazo es raro y habitualmente resulta en un cambio en el color de la piel.

- De segundo grado: son aquellas que afectan la epidermis y parte de la dermis cutánea. La causa estriba a menudo en lesiones por escaldadura o contacto con fuego. La quemadura aparece roja, con ampollas, hinchada y dolorosa.
- De tercer grado o de espesor total: en estas se destruye la epidermis y la dermis y también puede ocurrir daño en el tejido subcutáneo subyacente, en los huesos, los músculos y los tendones. La zona quemada presenta un aspecto blanco o chamuscado. No hay sensibilidad en la zona, dado que las terminaciones nerviosas están destruidas.

1.2.3 Proceso de reparación de heridas

La reparación de heridas es un proceso dinámico integrado que involucra mediadores solubles (citoquinas) y elementos que forman la sangre, la matriz extracelular y las células del parénquima (tejido que hace de un órgano algo funcional) (Thomas *et al.*, 1995).

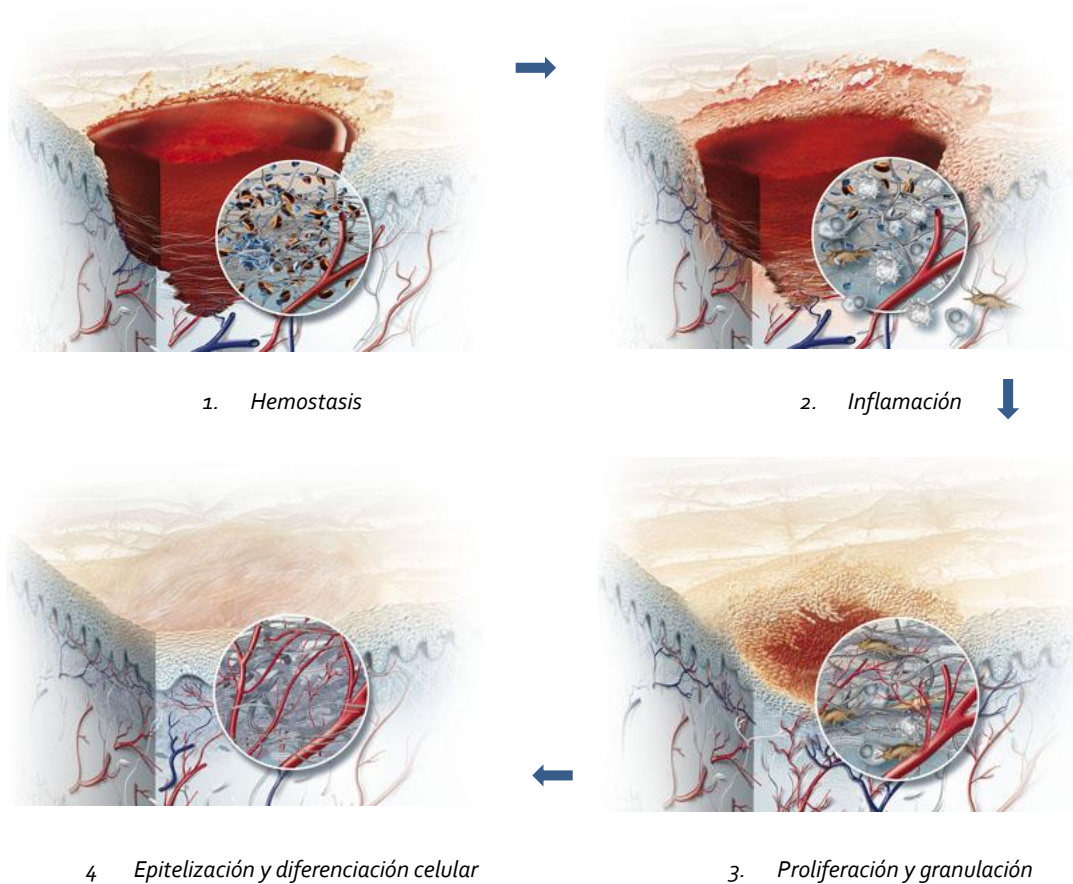


Figura 1-3: Fases involucradas en la reparación de heridas.
Tomado y adaptado de Hansaplast® (2012)

Este proceso sigue una secuencia temporal específica que inicia con la **inflamación**, seguida de la **formación de tejido** y por última la **remodelación** del mismo. Estas fases no son mutuamente exclusivas y se pueden solapar unas con otras. Las heridas crónicas, incluyendo las incisiones quirúrgicas usualmente atraviesan por estas etapas relativamente rápido (Falanga & Faria, 2007; Ghosh & Clark, 2007). Dentro del proceso de cicatrización de heridas se da un proceso de reparación que requiere modificaciones morfológicas y generalmente se divide en cuatro fases principales tal como se aprecia en la **Figura 1-3** (Nawaz & Bentley, 2011).

Fase 1. Hemostasis (Detención de la hemorragia y cierre provisional de la herida)

La formación de heridas graves en los tejidos causa la ruptura de los vasos sanguíneos, con la extravasación (salida de líquido de un vaso) simultánea de los constituyentes de la sangre. El primer objetivo del proceso de reparación consiste en detener la hemorragia. Los vasos arteriales se encojen rápidamente a través de la contracción del músculo liso ubicado en la capa circular de la pared del vaso, mediada por el incremento de los niveles de calcio citoplasmático. En pocos minutos, el flujo de sangre es reducido por la constricción de las arterias, lo que conduce a la hipoxia (déficit de oxígeno de un organismo) tisular y acidosis (exceso de ácido en los tejidos) (Young & McNaught, 2011).

De forma paralela a la disminución del flujo sanguíneo, se da la activación de la cascada de la coagulación y la agregación de plaquetas que dan origen a la formación del coágulo. La coagulación de la sangre y la agregación de plaquetas generan un coágulo que taponan los vasos y llena cualquier discontinuidad en el tejido herido (Falanga & Faria, 2007). Mientras el coágulo de sangre restablece la hemostasis en el vaso, el coágulo dentro del espacio actúa como un reservorio de factores de crecimiento y provee una matriz provisional para la migración celular.

Esto promueve la producción de óxido nítrico, adenosina y otros metabolitos vasoactivos, causando la vasodilatación y la relajación de los vasos arteriales. Al mismo tiempo, se libera histamina de los mastocitos, que son células que se originan en las células madre de la médula ósea y actúan en los procesos inflamatorios, que actúa para aumentar la vasodilatación y la permeabilidad vascular, facilitando la entrada de las células inflamatorias en el espacio extracelular alrededor de la herida. Esto explica el carácter cálido y la apariencia inflamada y enrojecida de las heridas iniciales (Young & McNaught, 2011).

Fase 2. Proceso inflamatorio

Comprende el período que transcurre desde el momento del trauma hasta el tercer día, lapso durante el cual ocurren (Groeber *et al.*, 2011):

- Reacciones inflamatorias
- Fagocitosis y defensa contra la infección
- Acción de macrófagos

Durante esta fase, la dilatación de los vasos sanguíneos próximos a la herida causa fuga de líquido vascular con el resultado de la formación de un edema (hinchazón blanda ocasionada por serosidad infiltrada en el tejido celular). Este líquido (exudado) contiene diversas sustancias esenciales como enzimas, anticuerpos, células de crecimiento, todas ellas necesarias para un proceso de curación fisiológico. Los tipos de células primarias involucradas en el proceso global de inflamación son las **plaquetas**, los **neutrófilos** y los **monocitos** (células generadas en la médula ósea que después de 24 horas en el torrente sanguíneo se diferencian a macrófagos). Después de la lesión, el restablecimiento exitoso de la **hemostasis** (mecanismo para detener la hemorragia por medios físicos o químicos) depende de la exposición de las plaquetas al tejido conectivo intersticial, lo cual lleva a su activación. La activación de las plaquetas libera diferentes proteínas de adhesión para facilitar su agregación, factores quimiotácticos para leucocitos de sangre y múltiples factores de crecimiento para promover la formación de nuevo tejido (Ghosh & Clark, 2007).

De los dos leucocitos fagocitos primarios (**neutrófilos** y **monocitos**), los que primero llegan en gran cantidad son los neutrófilos debido a su abundancia en el sistema circulatorio. Los neutrófilos limpian el área de la herida de partículas extrañas, incluyendo las bacterias. Si hay una cantidad excesiva de microorganismos o partículas indigeribles en el lugar de la herida, los neutrófilos causaran un daño adicional al tejido con el fin de eliminar estos contaminantes a través de la liberación de enzimas y productos de oxígeno tóxicos. Cuando la herida está completamente libre de partículas, cesa la generación de granulocitos y decae la cantidad de neutrófilos remanentes (Clark & Singer, 2000; Ghosh & Clark, 2007).

Fase 3. Etapa de proliferación celular

Esta etapa está comprendida entre los días cuatro y seis después de originada la herida y se inicia aun cuando la fase inflamatoria no ha finalizado. Los principales procesos que tienen lugar durante este tiempo son (Williamson & Harding, 2004; Velnar *et al.*, 2009):

- Reconstrucción vascular y vascularización (conjunto y riego de los pequeños vasos sanguíneos y linfáticos en un tejido, órgano o región del organismo)
- Aparición del tejido granular(tejido conectivo fibroso que reemplaza el coágulo de fibrina formado en la fase inflamatoria y/o exudativa)
- Acción de los fibroblastos

La regeneración de células nuevas, con la finalidad de reemplazar al tejido dañado, predomina durante esta fase. El nuevo tejido presenta un aspecto rojo brillante y se empieza a formar aproximadamente cuatro días después de la generación de la herida, recibe el nombre de **tejido de granulación** por su apariencia granular cuando es escindido y examinado visualmente (Beldon, 2010).

Los **macrófagos** en crecimiento proveen una fuente continua de citoquinas necesarias para la estimulación de la **fibroplasia** (producción de tejido fibroso en algunos procesos orgánicos, como la cicatrización de una herida) y la **angiogénesis** (formación de los vasos sanguíneos): los fibroblastos construyen una nueva matriz extracelular necesaria para soportar las células en crecimiento a través de la síntesis de fibras de colágeno, y los vasos sanguíneos llevan el oxígeno y los nutrientes necesarios para sostener el metabolismo celular (Williamson & Harding, 2004; Enoch & Leaper, 2008).

Fase 4. Diferenciación celular

Inicia el séptimo día y se extiende como mínimo tres días más. Durante este lapso se da:

1. Contracción de la herida
2. Epitelización
3. Mitosis y migración

Mientras que los nuevos vasos son los responsables del transporte de nutrientes a la zona de regeneración, el tejido de granulación rellena la herida y crea la base para la epitelización, es decir, la formación de una nueva capa cutánea. La epitelización de la herida completa el proceso de curación de la misma. Las células epiteliales se dividen, migran desde los bordes de la herida y la cierran. Después de la renovación del epitelio, la costra se desprende y el tejido epitelial recién formado y de color rosa, llega a ser visible (Williamson & Harding, 2004; Enoch & Leaper, 2005).

▪ **Re-epitelización**

La reepitelización de la herida comienza horas después de la ocurrencia de la misma y se inicia con el movimiento de células epiteliales de la epidermis existente alrededor de la superficie denudada. El rápido restablecimiento de la superficie epidérmica y la creación de una barrera permeable, previenen la pérdida excesiva de agua y el tiempo de exposición a infecciones bacterianas, lo cual disminuye la morbilidad y la mortalidad de los pacientes. Si el daño abarca un área extensa de epidermis, las células epidérmicas se regeneran principalmente de las células madres presentes en los folículos pilosos (Cotsarelis, 2006). La migración de las células epiteliales altera considerablemente su fenotipo, causando la retracción de sus filamentos intracelulares, disolviendo muchos de sus desmosomas y formando filamentos periféricos de actina, los cuales facilitan el movimiento celular (Clark & Singer, 2000).

Esta migración de células también se somete a disolución de sus vínculos hemidesmosomales entre la epidermis y la dermis. Todas estas alteraciones fenotípicas proveen a las células epiteliales de la movilidad lateral necesaria para la migración al sitio de la herida. Las células epiteliales de migración poseen un único fenotipo que las hace distintas de la diferenciación terminal de los queratinocitos normales. Se aprecia por tanto que las señales que controlan la curación de heridas en el animal adulto son similares a las que controlan la fusión del epitelio durante la embriogénesis (Jacinto *et al.*, 2001).

Uno a dos días después de la herida, las células epiteliales del margen de la herida comienzan a proliferar. Aunque el mecanismo no es claro, ambos procesos, proliferación y migración de las células epiteliales pueden ser provocados por la ausencia de células vecinas en el margen de la herida (es el llamado efecto del borde libre) (Dejana, 1996).

En la medida que el proceso de re-epitelización avanza, las proteínas de la membrana basal reaparecen en una secuencia muy ordenada del margen del interior de la herida como una cremallera.

Fase 5. Etapa de maduración y remodelación

En la fase de maduración las fibras de colágeno se reorganizan para aumentar la resistencia de la piel. No obstante, este tejido recién formado no es idéntico al tejido original. El tejido cicatricial no presenta una circulación sanguínea favorable, a veces es irregular y menos elástico. Además, cabe la posibilidad de variaciones importantes en el color y en algunos casos se puede dar lugar a la formación de una cicatriz hipertrófica. Eventualmente es posible alcanzar una estructura similar a la observada en el tejido no herido (sustitución de colágeno tipo 1 con colágeno tipo 3). Sin embargo, las heridas nunca alcanzan el mismo nivel de fuerza del tejido, alcanzando en promedio el 50% de la resistencia a la tracción original a los 3 meses y sólo 80% a largo plazo (Beldon, 2010; Young & McNaught, 2011).

1.3 Equivalentes de piel

El método estándar para el tratamiento de heridas cutáneas involucra el uso de **injertos** de espesor parcial autólogos que consisten en la utilización de una porción de piel del paciente de un área no afectada y en la herida. Este método fue introducido en el siglo XIX y desde ese momento a la actualidad se han desarrollado nuevos materiales y metodologías que han conducido a lo que hoy se conoce como equivalentes de piel (Peter, 2001).

Yildirim *et al.* (2012) mencionan que un sustituto ideal de piel debe:

- Proveer seguridad al paciente
- Ser degradable
- Ser flexible
- Favorecer la formación de nuevo tejido dérmico
- Tener vida útil razonable
- Bajo costo por cm²
- Ser mecánicamente estable y permitir la vascularización

Una de las formas de clasificar los equivalentes cutáneos actualmente disponibles es mediante su estructura anatómica, es decir si son dérmicos, epidérmicos o un conjunto de los dos (MacNeil, 2008; Shevchenko *et al.*, 2010; Jean *et al.*, 2011).

1.3.1 Equivalentes epidérmicos

Los equivalentes epidérmicos han sido diseñados para ser usados en aquellos casos donde la dermis no ha sido afectada gravemente y sólo se hace necesario recuperar la epidermis.

BIOSEED-S™

BioSeed-S™ (*BioTissueTechnologies*, Dinamarca), está compuesto de una matriz de fibrina (Tissucol®) cubierta con queratinocitos autólogos (Jean *et al.*, 2011). A nivel clínico se ha estudiado principalmente en el tratamiento de úlceras crónicas en los pies mostrando mejoras significativas en la eficiencia de la cicatrización de la herida. Estudios en animales han demostrado que el uso del gel de fibrina no mejora la tasa de absorción de los queratinocitos cuando se compara con el método de aspersión de queratinocitos sobre la herida; sin embargo, el empleo de fibrina mejora la manipulación del soporte, la adhesión celular, la hemostasis y la cicatrización (Shevchenko *et al.*, 2010).

CELLSPRAY™

CellSpray™ (*Clinical Cell Culture Company*, Australia) es una suspensión de queratinocitos autólogos (Jean *et al.*, 2011) en estado subconfluyente (estado más activo de proliferación) que es aplicado en el lecho de la herida mediante aspersión. Esto permite mejorar la proliferación *in vivo* hasta la confluencia (cierre de la herida) y la diferenciación celular hasta formar una estructura epitelial reconocible. Al no emplearse queratinocitos en estado confluyente se reduce el tiempo de cultivo, cubriendo de forma temprana la herida con queratinocitos activos viables. Este método no se emplea en heridas de espesor total ya que éstas requieren un soporte dérmico para alcanzar una restauración permanente y funcional de la piel (Shevchenko *et al.*, 2010).

EPICEL®

Epichel® (*Genzyme Corporation*, USA) es un equivalente epidérmico considerado por la FDA como producto de xenotransplante (Genzyme-Corporation®, 2013), formado por queratinocitos humanos autólogos derivados de una pequeña biopsia de piel de la zona retroauricular o la inguinal y cultivados sobre una capa de fibroblastos de ratón irradiados (Jean *et al.*, 2011). Su espesor varía de acuerdo con el número de capas de células (de 2 a 8 capas) y cada injerto se une al respaldo de una gasa con vaselina empleando clips de acero quirúrgico inoxidable. En la **Figura 1-4** se presenta una imagen de la apariencia de Epichel®, el cual se emplea principalmente en el tratamiento de pacientes con quemaduras profundas que involucren la dermis (tercer grado) o de espesor total que comprometan más del 30% de área superficial del cuerpo. Se usa en conjunto con autoinjertos de espesor parcial o solo, en pacientes donde no sea posible emplear autoinjertos debido a la severidad o extensión de sus quemaduras (De Beule *et al.*, 2007).

Epichel® es una barrera temporal que previene la pérdida de fluidos y la infección de la herida, constituyéndose en un tratamiento valioso para salvar la vida de pacientes con quemaduras extensas. Dentro de las ventajas de Epichel® se encuentran la disponibilidad de tejido autólogo

para una cubierta permanente usando tan solo una pequeña parte de tejido del paciente, lo cual es bastante benéfico para pacientes con heridas graves y/o quemaduras, que dispongan de poco tejido para usar como autoinjerto. Entre las desventajas se encuentra el tiempo requerido para su preparación, la fragilidad del equivalente obtenido y el tiempo de vida tan corto (Balasubramani *et al.*, 2001; Shores *et al.*, 2007; Goh *et al.*, 2012).



Figura 1-4: Apariencia de Epicel®.
Tomado y adaptado de Grosskinsky (2006)

EPIDEX™

Epidex™ (*Euroderm AG*, Suiza) es un equivalente epidérmico compuesto de queratinocitos autólogos ubicados sobre una membrana de silicona (Jean *et al.*, 2011). Los queratinocitos son obtenidos del exterior de folículos pilosos extraídos del propio paciente, que luego son expandidos y multiplicados durante 15 días, antes de ser cultivados sobre la membrana de silicona y trasplantados en la herida del paciente. Epidex™ es ampliamente usado en el tratamiento de úlceras crónicas, especialmente aquellas de tamaño pequeño o mediano que presentan algo de tejido de granulación pero que fallan en la reepitelización (Ortega-Zilic *et al.*, 2010).

Los costos estimados del tratamiento con Epidex™ oscilan entre 3500 y 16000 dólares para úlceras en los pies y varían de acuerdo con la extensión de la herida (Ortega-Zilic *et al.*, 2010). La presentación comercial de este equivalente epidérmico es en forma de discos de 1 cm de diámetro. Cada paquete de Epidex™ contiene 6 discos que pueden tratar una herida de 10 cm², dado que el fabricante recomienda cubrir tan solo el 50% de la superficie a tratar (Croisier & Jérôme, 2013).



Los queratinocitos se obtienen del folículo piloso del propio paciente.



Las láminas circulares de 1 cm de diámetro se ubican en la herida, cubriendo tan solo un 50% de la misma.

Figura 1-5: Apariencia de Epidex™.
Tomado y adaptado de Croisier & Jérôme (2013)

EPISKIN™

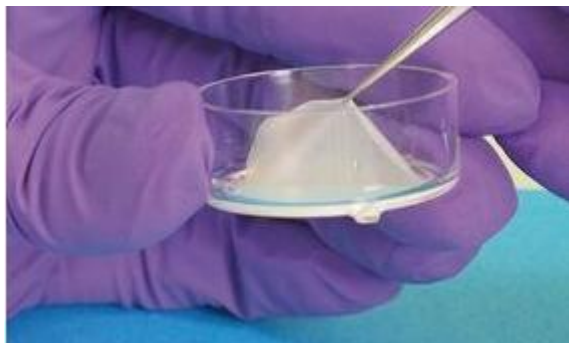


Figura 1-6: Apariencia de Episkin™.
Tomado y adaptado de Sun *et. al.* (2008)

Episkin™ (L'Oreal Institute, Francia), es un equivalente epidérmico desarrollado para evaluar los posibles efectos sobre la piel de los productos cosméticos fabricados por L'Oreal, dejando de

lado los ensayos clínicos con animales (Gomez *et al.*, 2009). Está compuesto de queratinocitos cultivados sobre una matriz de colágeno (Jean *et al.*, 2011).

EPIFAST®

Epifast® (*Bioskinco S.A.*, México) es un equivalente epidérmico formado por queratinocitos criopreservados obtenidos de prepucio de neonatos. Se encuentra soportado sobre una gasa vaselinada y sus dimensiones son 7x8 cm, dando lugar a una superficie total de 56cm² (Seal *et al.*, 2001)



Figura 1-7: Apariencia de Epifast®.
Tomada de Seal *et al.* (2001)

LASERSKIN™

Laserskin™ (*Fidia Advanced Biopolymers*, Italy) es un equivalente epidérmico formado por queratinocitos autólogos sobre una matriz de ácido hialurónico (Jean *et al.*, 2011), la cual es microperforada vía láser, lo cual permite la migración de los queratinocitos al lecho de la herida. Estudios preliminares recopilados por Shevchenko *et al.* (2010) muestran que este equivalente tiene un gran potencial, debido a la biocompatibilidad y bajas tasas de infección en modelos animales preclínicos.

Shores *et al.* (2007) reportan investigaciones de diversos autores donde se ha empleado con éxito Laserskin™ para el tratamiento de úlceras de pie diabético, úlceras venosas, úlceras arteriales, quemaduras traumáticas, entre otros.

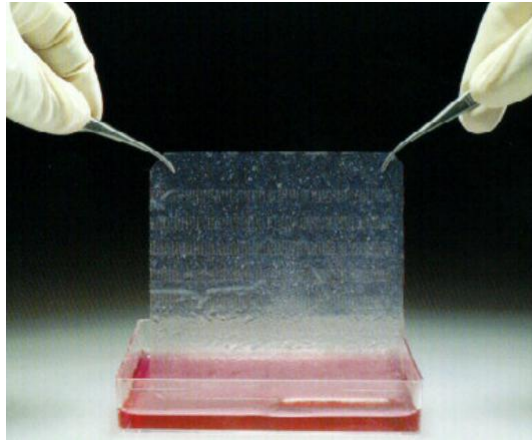


Figura 1-8: Apariencia de Laserskin™.
Tomada de Stokke *et al.*(1997)

MYSKIN™

Myskin™ (Altrika Ltd., Reino Unido) es un equivalente epidérmico compuesto de queratinocitos autólogos, extraídos de una pequeña biopsia del paciente y sembrados sobre una lámina de silicona perforada, especialmente tratada para soportar el crecimiento de este tipo de células y certificada para implantes humanos (Jean *et al.*, 2011). Su presentación es en forma de discos de 5 cm de diámetro y 19,6 cm² de área superficial, envasados en una mezcla estéril de medio Eagle modificado de Dulbecco (76%) y medio Ham's F12 (23%) en forma de gel de agar (Szymonowicz *et al.*, 2007).

Los queratinocitos son co-cultivados con fibroblastos murinos libres de contaminación bacteriana, hongos y micoplasma. Las células murinas no están presentes en el producto final y sólo son empleadas para favorecer la proliferación de los queratinocitos (Szymonowicz *et al.*, 2007).



Figura 1-9: Apariencia de Myskin™.
Tomada y adaptada de Szymonowicz *et al.*(2007)

RECELL®

ReCell® (Avita Medical, Reino Unido) es una tecnología que comprende células cutáneas autólogas en suspensión, las cuales son asperjadas en el sitio de la herida, promoviendo la cicatrización (Jean *et al.*, 2011). A partir de una pequeña biopsia del paciente, la cual es rápidamente procesada (20-30 minutos), se obtiene una suspensión celular que contiene queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y células de Langerhans que al ser aplicadas en el sitio de la herida promueven una rápida y efectiva cicatrización (Stokke *et al.*, 1997).



Figura 1-10: Apariencia de ReCell®.
Tomada y adaptada de Stokke *et al.* (1997)

SUPRATHEL®

Suprathel® (Polymedics, Alemania) es un sustituto de piel altamente permeable al oxígeno y al vapor de agua, que provee un ambiente favorable para la cicatrización de la heridas. Suprathel® fue desarrollado para el tratamiento de: quemaduras de segundo y tercer grado, sitios de donación de injertos parciales de piel, abrasiones a gran escala y correcciones de cicatrices entre otros. Está compuesto principalmente de ácido poliláctico y tarda 4 semanas en degradarse hidrolíticamente. Su permeabilidad al vapor es de $40\text{-}70\text{mL/m}^2\text{h}^{-1}$ y tiene un pH inicial de 5.5 (Dreesmann *et al.*, 2007).

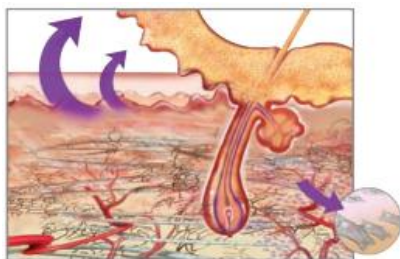


Figura 1-11: Apariencia de Suprathel®.
Tomado y adaptado de Dreesmann *et al.* (2007)

1.3.2 Equivalentes dérmicos

ALLODERM®

Alloderm® (LifeCell Corporation, Branchburg NJ, USA) es un soporte dérmico con espesores entre 2,06 y 3,30 mm (van der Veen *et al.*, 2010), elaborado a partir de dermis cadavérica humana, inmunológicamente inerte, procesada con cloruro de sodio - dodecilsulfato sódico (NaCl-SDS) y posteriormente liofilizada, que conserva la membrana basal intacta (Parenteau *et al.*, 2000; Groeber *et al.*, 2011);



Remoción de la epidermis y las células de la piel

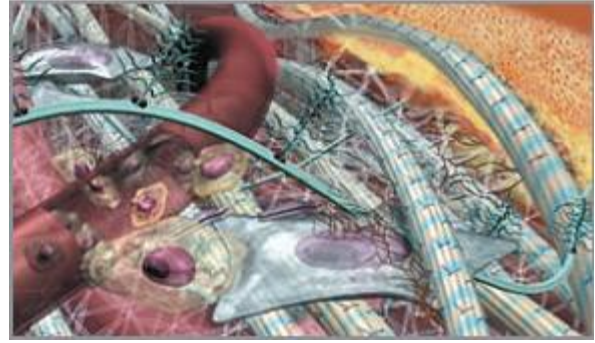


Soporte acelular heterogéneo deshidratado que contiene factores de crecimiento, sitios de anclaje celular y vasos sanguíneos

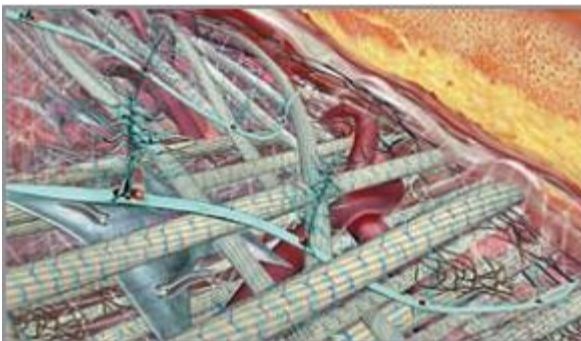
Figura 1-12: Esquema del proceso de elaboración de Alloderm®.
Imágenes tomadas y adaptadas de BioHorizons® (2008)



Los componentes de Alloderm® permanecen biológicamente en su estado natural y esto hace que se reconozca inmediatamente como tejido humano



Se da una repoblación rápida y una revascularización. Inicio de un proceso de regeneración intrínseca



Se da una remodelación completa en el tejido del propio paciente con resultados funcionales, fisiológicos y reconstructivos.



Presentación comercial Alloderm®



Alloderm® tiene hasta dos años de vida útil cuando es almacenado entre 0 y 10°C. Una vez abierto debe llevarse a un baño con solución salina estéril.



La lámina de Alloderm® debe rehidratarse en dos baños estériles consecutivos. Se debe remover el papel del Alloderm® entre el primer y segundo baño.

Figura 1-13: Modo de uso de Alloderm®. Tomado y adaptado de BioHorizons®, 2008

Alloderm® es ampliamente utilizado en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial o profundas y reemplazos de tejido blando (Balasubramani *et al.*, 2001; Shores *et al.*, 2007).

Estudios clínicos han mostrado que injertos de espesor parcial sobre Alloderm[®] presentan mejores resultados que si éstos se aplicaran directamente sobre la herida. Así mismo, se ha encontrado que presenta propiedades inmunogénicas apropiadas en estudios *in vitro* en animales, sin evidencia de rechazo (Price *et al.*, 2008; van der Veen *et al.*, 2010).

La principal desventaja de Alloderm[®] radica en la ausencia de elementos epidérmicos, requisito indispensable de una cobertura inmediata apropiada para ser empleada como injerto de piel (Price *et al.*, 2008).

BIOBRANE[™]



Figura 1-14: Presentación comercial de Biobrane[™].
Tomado y adaptado de Amaral *et al.*(2009), Healthcare-Ltd.(2011)

Biobrane[™] es un sustituto de piel biosintético que se adhiere a la dermis facilitando la recuperación de la función estructural y biológica y reduciendo el dolor. Está formado por una estructura de 2 capas: una exterior de silicona que actúa como barrera, evitando la pérdida de agua por evaporación haciendo que se cree un ambiente húmedo que favorezca la migración de

las células epiteliales a través de una capa interna compuesta por una red tridimensional de filamentos de nylon cubierta con colágeno porcino (Jones *et al.*, 2002; Leshner *et al.*, 2011).

Una vez ocurre la epitelización, el sustituto se desprende de la superficie de la herida dejando al descubierto el nuevo epitelio (Amaral *et al.*, 2009).

CYMETRA™

Cymetra™ (LifeCell Corporation, USA) es un polvo seco obtenido de piel humana pulverizada. Contiene todos los elementos necesarios para reemplazar el tejido (colágenos, elastina, proteínas y proteoglicanos). Gracias al tamaño de sus partículas, Cymetra™ puede ser inyectado en el sitio de la herida, con una invasión mínima (Seo *et al.*, 2009).

DERMAGRAFT®

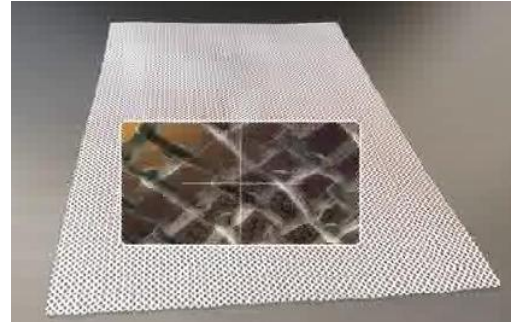
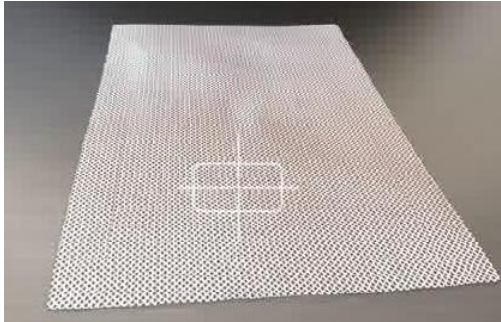
Dermagraft® (Advanced BioHealing, USA) es una barrera dérmica temporal basada en fibroblastos alogénicos neonatales criopreservados sobre un soporte poroso y bioabsorbible de poliglactina, que en heridas crónicas incrementa la velocidad de cicatrización de la herida (MacNeil, 2008; van der Veen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Una vez los fibroblastos neonatales son sembrados sobre la malla de poliglactina en presencia de factores de crecimiento, colágenos, tenascina, vitronectina y glicosaminoglicanos, se inicia su proliferación, llenando los intersticios del soporte, secretando colágeno dérmico humano, proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas hasta formar un sustituto dérmico tridimensional metabólicamente activo que contiene células vivas y que es criopreservado hasta su uso final en pacientes (Parenteau *et al.*, 2000; Advanced Biohealing, 2010).



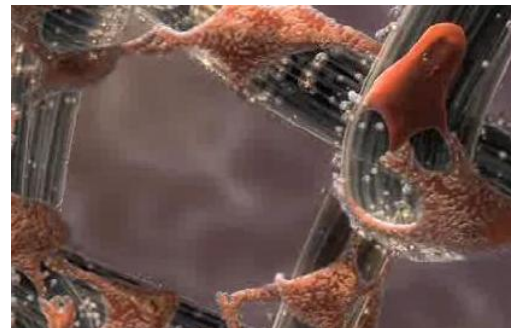
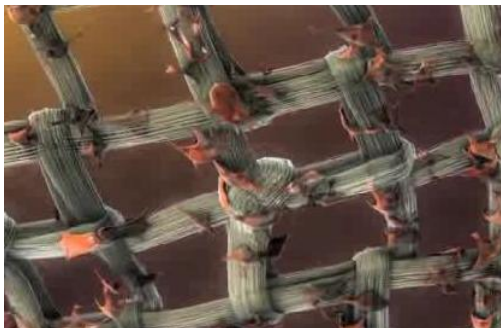
Figura 1-15: Presentación comercial de Dermagraft®
Tomado y adaptado de Advanced Biohealing (2010)

Dermagraft® es indicado para el tratamiento de úlceras de pie diabético con una duración mayor a 6 semanas que se extienda a través de la dermis pero que no alcance los tendones, músculos o

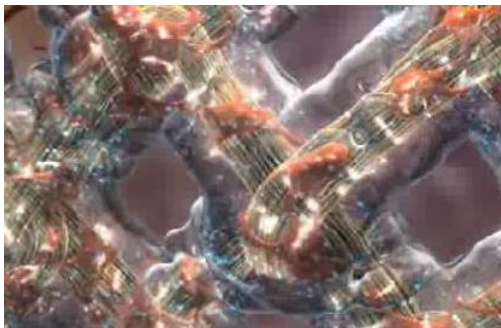
hueso y debe ser usado en pacientes que tengan una irrigación sanguínea adecuada alrededor de la úlcera (Advanced Biohealing, 2010).



Dermagraft® está compuesta de una malla porosa de poliglactina



Se depositan fibroblastos neonatales sobre la malla de poliglactina en presencia de factores de crecimiento y demás sustancias que permiten su proliferación.



Los fibroblastos producen colágeno dérmico humano y llenan los intersticios de la malla formando un soporte tridimensional que luego es empacado y criopreservado para su posterior uso.

Figura 1-16: Proceso de obtención de Dermagraft®.
Tomado y adaptado de Advanced Biohealing (2010)

Dermagraft® ha sido ampliamente empleado para estimular la cicatrización de heridas crónicas como las de los pacientes diabéticos que sufren de úlceras en los pies, aunque el cierre de la herida no es alcanzado sin la aplicación de un injerto de espesor parcial. También ha sido ampliamente usado como injerto de espesor parcial en el tratamiento de heridas de quemaduras de diferentes profundidades. Al igual que con otros dispositivos alogénicos, a largo plazo no se espera la supervivencia de las células injertadas en la herida (Price *et al.*, 2008).

DERMAMATRIX



Figura 1-17: Presentación comercial de Dermamatrix.
Tomado y adaptado de Hao *et al.*(2012)

Dermamatrix (Synthes Inc, USA) es un producto dérmico acelular procesado y manufacturado por la Fundación de Trasplante Musculoesquelético y distribuido a través de Synthes Inc. Al igual que AlloDerm™ proviene de piel cadavérica humana procesada, sin embargo su procesamiento es diferente ya que se emplean detergentes y ácidos seguidos de una posterior liofilización. Es ampliamente usado en reconstrucciones craneofaciales, de la pared abdominal y de busto (Shores *et al.*, 2007).

EZ-Derm™

EzDerm™ (Brennen Medical, Inc., MN, USA) es una cubierta acelular basada en colágeno dérmico porcino reconstituido y entrecruzado con un aldehído para incrementar su resistencia tensil. Este producto no se incorpora dentro de la herida y debe ser removido (Groeber *et al.*, 2011).



Figura 1-18: Presentación comercial de EZ-Derm™.
Tomado y adaptado de AM-Scientifics-Ltd.(2008)

FORTAFLEX™

FortaFlex™ (Organogenesis Inc., USA) es una matriz acelular derivada de la submucosa del intestino delgado porcino (Jean *et al.*, 2011).

GLYADERM®

Glyaderm® (Euroskin Bank, Holanda) es una matriz dérmica acelular derivada de piel humana que puede ser utilizada en el remplazo de piel quemada o en la reconstrucción de defectos de tejido blando y tejido granular inestable (Jean *et al.*, 2011). Conserva la estructura tridimensional del colágeno y la elastina, importantes para mejorar la calidad de la cicatrización. Glyaderm® es preservado en glicerol al 85% para inactivar la acción de microorganismos y virus. Se usa para la reconstrucción de heridas de espesor total en combinación con injertos autólogos de espesor parcial, con el fin de alcanzar una restauración tanto de la dermis como de la epidermis (Sun & Tan, 2013).



Figura 1-19: Presentación comercial de Glyaderm®.
Tomado y adaptado de Sun & Tan (2013)

GRAFTJACKET®

Graftjacket® (Wright Medical Technology, Inc, Arlington, TN, USA) es un soporte que proviene de tejido dérmico cadavérico humano, al cual se le remueven los componentes celulares y se le retiene el colágeno, la elastina, los proteoglicanos y los canales vasculares, preservando intacta la matriz; provee un ambiente ideal para la revascularización y la proliferación celular (Shores *et al.*, 2007; Shevchenko *et al.*, 2010).

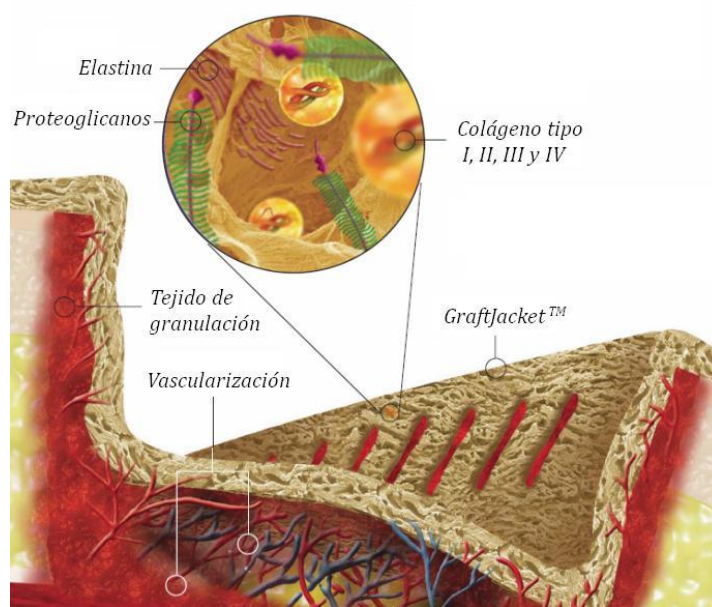


Figura 1-20: Composición de Graftjacket®.
Tomado y adaptado de Fischer *et al.* (2003)

Wright Medical Technology, Inc patentó una tecnología que le permite remover los componentes celulares sin entrecruzamiento químico o radiación, preservando las propiedades bioquímicas y estructurales del colágeno dérmico. Graftjacket® es empacado al vacío y requiere un proceso de rehidratación antes de la implantación. Este soporte permite la revascularización de la matriz extracelular, favoreciendo la proliferación celular. Por su carácter alogénico es biocompatible con tejido humano, además tiene adecuadas propiedades mecánicas que permiten su correcta manipulación (Fischer *et al.*, 2003).

HYALOGRAFT -3D™

Hyalograft-3DTM (Hyaltec, Argentina) es una matriz tridimensional compuesta de un éster de ácido hialurónico (Jean *et al.*, 2011).



Figura 1-21: Presentación comercial de Hyalograft -3D™.
Tomado y adaptado de CookBiotech (2013)

El ácido hialurónico es uno de los principales polisacáridos que compone la matrix extracelular y promueve la migración y proliferación de fibroblastos dérmicos y queratinocitos. Hyalograft-3D™ se utiliza como soporte de fibroblastos autólogos, para el injerto de dermis en heridas de espesor parcial. A partir de una biopsia de piel (1 cm²) se extraen fibroblastos autólogos que son sembrados sobre la superficie del biomaterial y luego éste es empleado para cubrir totalmente la superficie cutánea afectada. Está indicado para ser usado de forma conjunta con Laserskin® en lesiones tales como: úlceras crónicas, varicosas, diabéticas, o por decúbito; quemaduras, heridas de difícil cicatrización, escaras, cirugía plástica, reparadora y otras. Hyalograft-3D™, con fibroblastos autólogos, se presenta en una cápsula de Petri para cultivo celular, listo para aplicar (CookBiotech, 2013).

ICX-SKN

ICX-SKN (Intercytex Ltd, Manchester, UK) es un sustituto dérmico conformado por una matriz de fibrina cultivada con fibroblastos dérmicos. Los ensayos en fase I han mostrado la eficacia en la cicatrización de heridas de espesor total, encontrado después de 28 días una adecuada epitelización del tejido y una incorporación exitosa en el cuerpo, dando lugar a una vascularización completa (Boston Scientific Corporation, 2004; Shores *et al.*, 2007).

INTEGRA®

Integra® (Integra NeuroSciences, Plainsboro, NJ, USA) es un equivalente dérmico artificial semipermanente desarrollado y comercializado en Estados Unidos desde el año 1996 (Kim *et al.*, 2011). Se compone de una matriz porosa tridimensional de fibras de colágeno bovino reticulado y glicosaminoglicanos de tiburón (sulfato de condroitina), fabricada con una porosidad y una velocidad de degradación controlados (Price *et al.*, 2008; Groeber *et al.*, 2011) y una cubierta epidérmica temporal elaborada con polisiloxano sintético (silicona), que proporciona la homeostasis inmediata a la herida mediante el control de la humedad de una manera comparable a la piel normal y a su vez le imparte resistencia al equivalente. La presentación comercial (en forma de láminas delgadas estériles para ser usadas como apósitos) y algunas características técnicas de Integra® se presentan en la **Figura 1-22**.

- ✓ Fracción de volumen de poro: 98%
- ✓ Diámetro de poro promedio entre 30-120µm
- ✓ Relación colágeno/GAG de 92/8 (colágeno de tendón bovino tipo I/ condroitina-6-sulfato)
- ✓ Resistencia específica a la degradación por colagenasa
- ✓ Tiempo de degradación *in vivo*, 30 días.



Figura 1-22: Presentación comercial y especificaciones técnicas de Integra®.

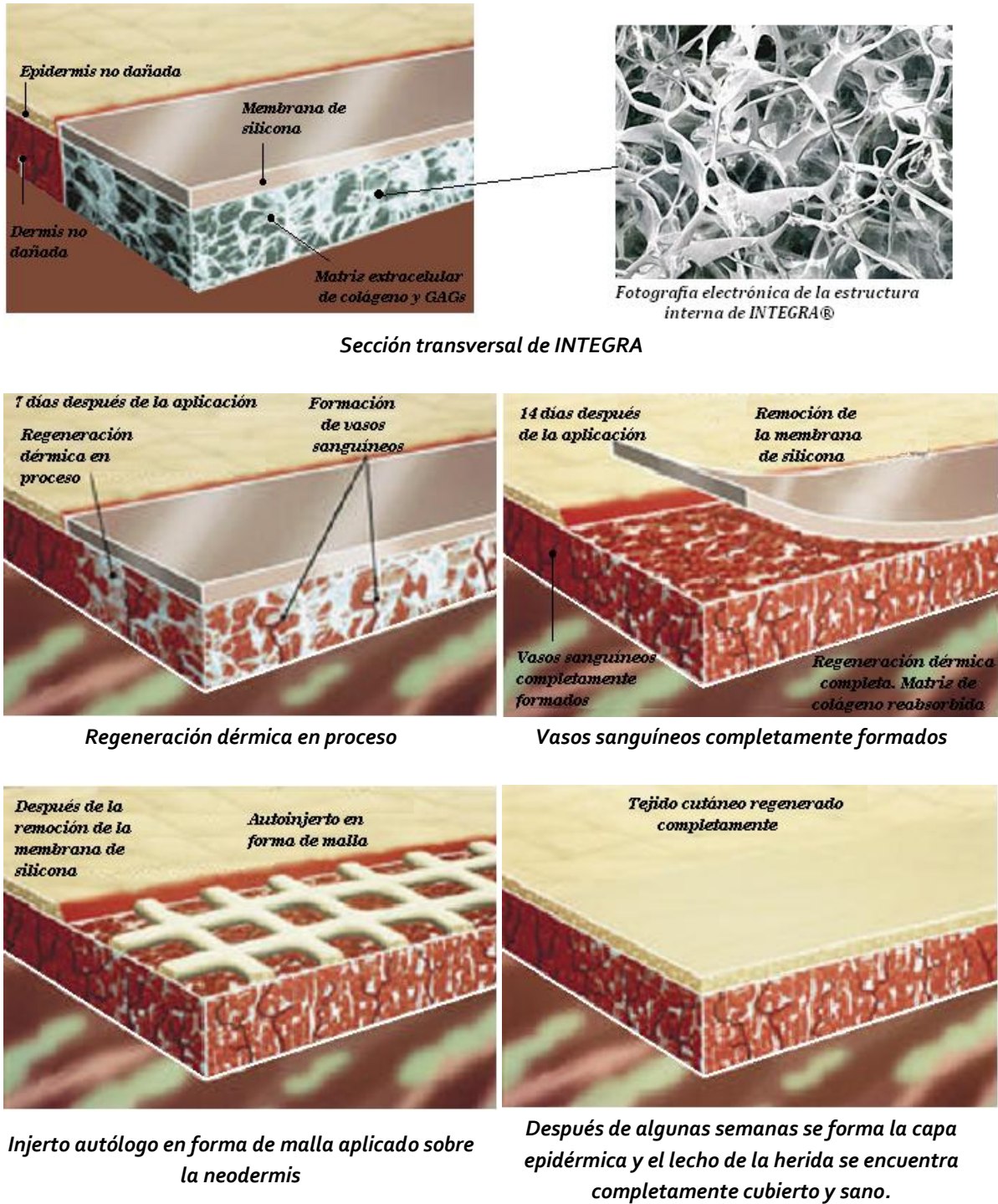


Figura 1-23: Esquema de la evolución de un herida de piel reparada con Integra®. Tomado y adaptado de FDA (2002)

Integra® es actualmente el soporte dérmico más probado y extendido clínicamente (Price *et al.*, 2008); su función más importante es servir de soporte e inducir la regeneración del tejido dérmico. El tamaño de poro y la degradación del colágeno bovino están controlados para permitir el crecimiento del tejido e inhibir la contracción de la herida. En la **Figura 1-23** se presenta un esquema del proceso de reparación de heridas empleando Integra®. El equivalente dérmico es ubicado en el lecho de la herida, con la membrana de silicona hacia el exterior. Fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales provenientes de capas adyacentes de la piel del paciente se infiltran para iniciar la formación de una nueva red vascular (Integra®, 2012).

A medida que la curación progresa, el colágeno nativo depositado por los fibroblastos reemplaza la porción de colágeno bovino proveniente de Integra®, la cual es degradada aproximadamente en 30 días.

Una vez ha ocurrido la vascularización en el lecho de la herida (aprox. 3 semanas) y la capa dérmica ha sido reabsorbida, la membrana de silicona es retirada y se ubica una capa epidérmica (generalmente un autoinjerto delgado) para finalizar el proceso de reconstrucción de la piel (Parenteau *et al.*, 2000; MacNeil, 2008).

Dentro de las principales ventajas del sustituto dérmico Integra® se encuentran su fácil manejo, baja inmunogenicidad y bajo riesgo de transmisión de enfermedades. Además, se obtienen resultados cosméticos satisfactorios al reducir las tasas de contracción y la formación de cicatrices. Dentro de sus desventajas están el largo período de vascularización (10-14 días) y la temporalidad, pues implica un procedimiento quirúrgico posterior para adicionar un injerto epidérmico definitivo. Por otra parte, se ha demostrado que los cultivos epidérmicos autólogos no se integran muy bien sobre la nueva dermis producida luego de emplear Integra® (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010; Shevchenko *et al.*, 2010).

KARODERM®

Karoderm® (KaroCell Tissue Engineering, Suecia) es un equivalente dérmico compuesto de dermis humana descelularizada (Shevchenko *et al.*, 2010).

MATRIDERM®

Matriderm® (Dr Suwelack Skin and Health Care AG, Billerbeck, Germany) es un soporte de origen bovino y consiste de una matriz de colágeno nativa intacta cubierta con α -elastina hidrolizada, liofilizada y no entrecruzada con tamaño de poro aprox. de 0,75 mm (van der Veen *et al.*, 2010; Groeber *et al.*, 2011). En pequeños ensayos clínicos para el tratamiento de quemaduras de espesor completo, éste ha mostrado resultados promisorios cuando es aplicado de forma simultánea con un injerto de espesor parcial en un procedimiento de una sola etapa (Shevchenko *et al.*, 2010).

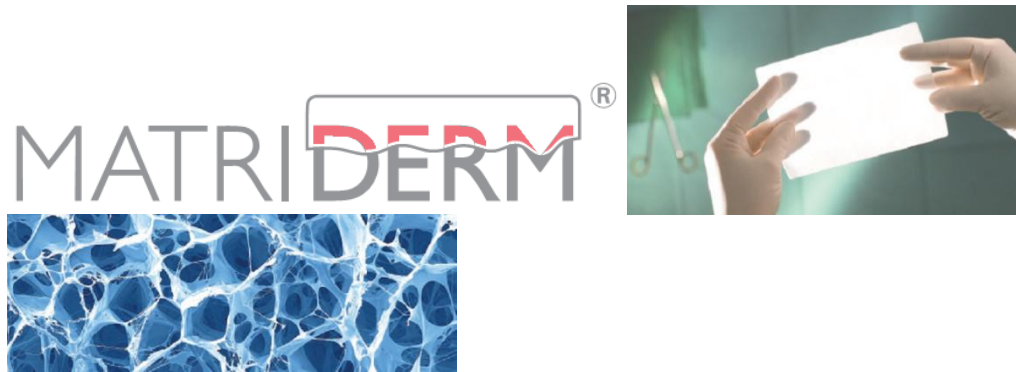


Figura 1-24: Estructura interna y externa de Matriderm®.
Tomado y adaptado de Andersen *et al.* (2012)

OASIS®

Oasis® (Cook Biotech Inc., West Lafayette, IN, USA) es una cubierta permanente elaborada con submucosa acelular liofilizada de intestino delgado porcino, con espesores entre 0,15 - 0,30 μm (van der Veen *et al.*, 2010; Groeber *et al.*, 2011), empleada en el tratamiento de heridas de espesor parcial y total, úlceras venosas crónicas, úlceras diabéticas y otros traumas en la piel como abrasiones, laceraciones, quemaduras de segundo grado.

Se han obtenido resultados positivos para el tratamiento de úlceras crónicas, donde el tiempo de cicatrización se ha reducido y se ha disminuido la recurrencia de la ulceración (Mostow *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la matriz Oasis® soporta la diferenciación epidermal *in vitro* y la formación de membrana basal (Lindberg & Badylak, 2001), sin embargo hasta el momento no se han publicado ensayos en los que se use en el tratamiento de heridas de espesor total.

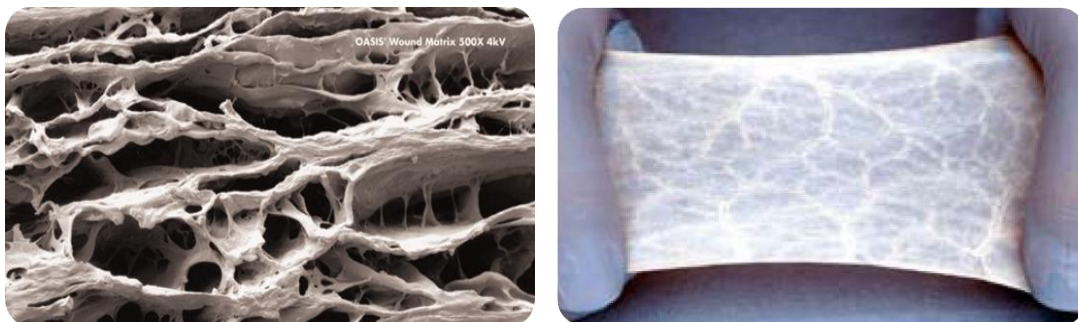


Figura 1-25: Morfología interna y externa de Oasis®.
Tomada y adaptada de CookBiotech (2013)

PELNAC™

Figura 1-26: Presentación comercial de Pelnac™.
Tomado y adaptado de EuroSurgical (2013)

Pelnac™ (EuroSurgical, UK) está conformado por una esponja de **atelocolágeno** (colágeno procesado con pepsina para remover los telopéptidos, lo que lo hace soluble) derivada de tendón porcino (de 3 mm de espesor y poros con tamaños entre 60-100µm) y una capa de silicona. Es adecuado para usar en defectos de piel de espesor parcial y usado como material alternativo para la formación de nueva dermis mediante la invasión de fibroblastos en la esponja de atelocolágeno (EuroSurgical, 2013).

Pelnac™ es indicado para el tratamiento de quemaduras de tercer grado, defectos traumáticos en la piel y escisión de tumores nerviosos, entre otros (Shevchenko *et al.*, 2010).

PERMACOL®

Permacol® (Tissue Science Laboratories PLC, Aldershot, UK) es un sustituto dérmico basado en dermis acelular porcina entrecruzada con hexametileno-diisocianato, (HMDI por sus siglas en inglés *Hexa Metilen Diisocianate*) (MacNeil, 2008), que ha sido sometida a un proceso de remoción de células y cualquier resto de ADN y ARN, sin afectar la matriz tridimensional de colágeno. El uso de un agente entrecruzante permite un control sobre el proceso de remodelación del colágeno y la velocidad de este proceso puede ser modificada mediante la alteración del nivel de entrecruzamiento. Sin entrecruzamiento, no hay control del proceso y por lo tanto el soporte implantado puede fallar en su función si la remodelación ocurre muy rápidamente o de una manera desorganizada. La presencia de HMDI como agente entrecruzante interfiere con la habilidad de la enzima colagenasa de acceder a la unión específica de los enlaces

de colágeno y realizar la digestión; por lo tanto, el Permacol® entrecruzado con HMDI tiene una mayor resistencia a la digestión de la colagenasa (Liang *et al.*, 2004). Permacol® no requiere rehidratación o refrigeración y es dimensionalmente estable. Está disponible en una amplia variedad de tamaños incluyendo los tamaños más grandes que eliminan la necesidad de sutura de múltiples piezas juntas y proporciona el tamaño adecuado de implante sin importar el tamaño de la herida (Covidien, 2012).

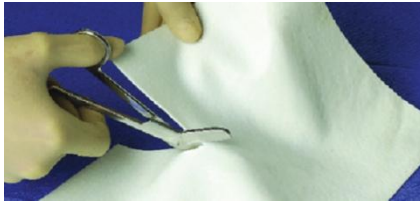


Figura 1-27: Estructura externa de Permacol®.
Tomado y adaptado de *Olympus Terumo Biomaterials Corp.* (2012)

REPLIFORM®

Repliform® (LifeCell™, USA) es un aloinjerto elaborado a partir de dermis cadavérica humana (Jean *et al.*, 2011). Al provenir de dermis humana, este soporte dérmico acelular conserva el colágeno, la elastina, proteoglicanos y demás componentes de la piel, que le dan resistencia, elasticidad y durabilidad (Boston Scientific Corporation, 2004).



Figura 1-28: Estructura externa de Repliform®.
Tomado y adaptado de *Boston Scientific Corporation* (2004)

STRATTICE™

Strattice™ (LifeCell™, USA) es una malla quirúrgica derivada de dermis porcina (Jean *et al.*, 2011), procesada (remoción de células animales) y conservada en una solución tampón de fosfatos. Strattice™ está diseñada para actuar como malla quirúrgica en la reparación de tejidos blandos, a la vez que representa una estructura de soporte para los tejidos del paciente (LifeCell®, 2012).

SUREDERM®

Surederm® (Hans Biomed Corporation, Seoul, Korea) es un soporte alogénico consistente de dermis humana liofilizada (Groeber *et al.*, 2011).



Figura 1-29: Presentación comercial de Surederm®.
Tomada y adaptada de Hansbiomedical (2012)

Surederm® es indicado para el reemplazo o reparación de tejido suave, incluyendo cicatrices hipertróficas y heridas por quemaduras. El material puede ser almacenado hasta por 2 años y requiere 10 minutos de rehidratación antes de la aplicación, es incorporado de forma permanente en el lecho de la herida y provee un soporte dérmico para la posterior aplicación del injerto de piel (Shevchenko *et al.*, 2010).

TERUDERMIS®

Terudermis® (Olympus Terumo Biomaterial Corp, Tokio, Japan) es una esponja de colágeno bovino desnaturalizada térmicamente, liofilizada y entrecruzada (Groeber *et al.*, 2011). La capa de colágeno es adherida a una membrana de silicona que controla la contaminación bacteriana y la pérdida de agua por evaporación durante el tiempo de permanencia del sustituto en la herida (Shevchenko *et al.*, 2010).



Figura 1-30: Presentación comercial de Terudermis®.
Tomada y adaptada de *Olympus Terumo Biomaterials Corp.* (2012)

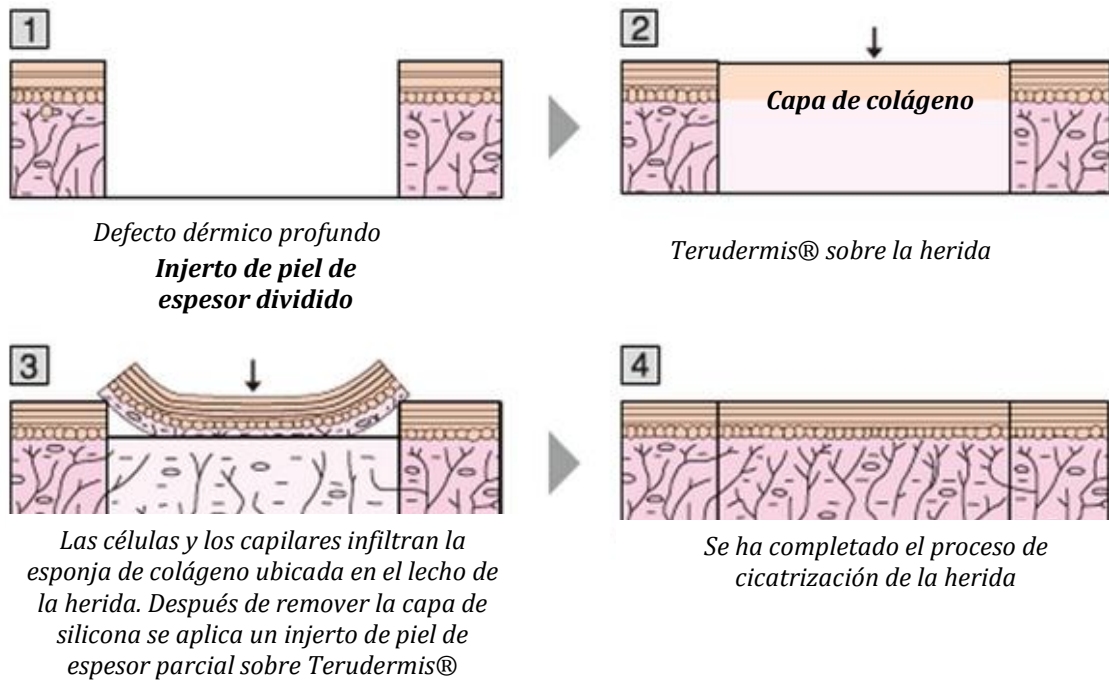


Figura 1-31: Mecanismo de acción de Terudermis®.
Tomada y adaptada de *Olympus Terumo Biomaterials Corp.* (2012)

1.3.3 Equivalentes dermo-epidérmicos

APLIGRAF®

Apligraf® (Organogenesis, USA) contiene dos tipos de células derivadas de prepucio neonatal: queratinocitos y fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno tipo I. Se usa para curar úlceras, como el pie diabético y las úlceras venosas de la pierna que no sanan después de 3-4 semanas, a pesar del tratamiento con las terapias convencionales (Shores *et al.*, 2007; Apligraf®, 2010).



Figura 1-32: Presentación comercial de Apligraf®.
Tomada de Apligraf® (2010)

KAROSKIN®

Karoskin® (Karocell Tissue Engineering AB, Suecia) es un aloinjerto (piel humana) de espesor parcial que sirve como cubierta temporal para cubrir la herida hasta que sea posible aplicar un injerto de espesor total. Puede ser usado fresco o liofilizado y se incorpora en la herida de forma provisional para aliviar el dolor y reducir los riesgos de infección y de deshidratación (Shevchenko *et al.*, 2010).

ORCEL®

OrCel® (Ortec International Inc, New York) es un equivalente dermo-epidérmico que contiene fibroblastos y queratinocitos obtenidos de prepucio neonatal. Los fibroblastos son sembrados en una esponja de colágeno tipo I, la cual es cubierta con un gel de colágeno no poroso, sobre el cual se depositan los queratinocitos hasta formar una capa confluyente. Esta bicapa compuesta sirve como matriz absorbible, con citoquinas y factores de crecimiento secretados por los fibroblastos alogénicos (Shores *et al.*, 2007). Al estar compuesto por células alogénicas, el producto desempeña un papel temporal, se reabsorbe en 7-14 días (similar a Apligraf®) y no se encuentran restos de ADN celular proveniente del producto 14-21 días posteriores a la aplicación (Shevchenko *et al.*, 2010).



Figura 1-33: Presentación comercial Orcel®.
Tomada de Ostrovsky (2006)

PERMADERM™

PermaDerm™ (Regenicin Inc., New Jersey-USA) está compuesto de fibroblastos y queratinocitos autólogos sobre un soporte de colágeno bovino (Jean *et al.*, 2011; Regenicin, 2011).

STRATAGRAFT®

Stratagraft® (Stratatech Corporation, USA) es un equivalente alogénico dermo-epidérmico que consiste en una capa epidérmica de queratinocitos humanos totalmente estratificados que

crecen en una capa dérmica compuesta por fibroblastos humanos embebidos en una matriz de colágeno no bovino. Estos queratinocitos son neonatales inmortalizados NIKS® (*neonatal immortalized keratinocytes*) y su caracterización arroja que están libres de virus, no son tumorigénicos y son consistentes genéticamente de lote a lote (Stratech-Corporation, 2010; Jean *et al.*, 2011).



Figura 1-34: Apariencia de Stratagraft®.
Tomada de Wisconsin-University (2007)

1.4 Referencias

Advanced Biohealing, I. (2010). "Dermagraft Active Living Cells." Consultado el 29 de mayo del 2012, de la página web <http://www.dermagraft.com/about/overview/>.

AM-Scientifics-Ltd. (2008). EZ-Derm TM: Biosynthetic wound dressing.

Amaral, M.; Gomes, P.S.; Lopes, M.A.; Santos, J.D.; Silva, R.F. and Fernandes, M.H. (2009). Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia*. **5**(2): 755-763.

Andersen, T.; Strand, B.L.; Formo, K.; Alsberg, E. and Christensen, B. (2012). Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Carbohydrate Chemical*. **37**: 227-258.

Apligraf®. (2010). "Apligraf® - Get to know living technology." Consultado el 23 de septiembre del 2012, de la página web http://www.apligraf.com/professional/pdf/APG_Factsheet.pdf.

Balasubramani, M.; Kumar, T.R. and Babu, M. (2001). Skin substitutes: a review. *Burns*. **27**(5): 534-544.

Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **28**(9): 409-412.

BioHorizons® (2008). AlloDerm® Regenerative Tissue Matrix. B. I. Systems.

Boston Scientific Corporation, I. (2004). "Repliform® Tissue Regeneration Matriz." Consultado el 3 de octubre del 2012, de la página web http://www.bostonscientific-international.com/templatedata/imports/collateral/Gynecology/broc_Repliform_01_ug_us.pdf.

Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T. and Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*. **36**(4): 450-460.

Celleno, L. and Tamburi, F. (2009). Chapter 1 - Structure and Function of the Skin. Nutritional Cosmetics. T. Aaron;Md;Ceo and M. B. Robert. Boston, William Andrew Publishing: 3-45.

Cepeda, F. (1999). Estudio preliminar de la formación de epidermis *in vitro*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogota, Universidad Nacional de Colombia. **Pregrado**.

Clark, R.A.F. and Singer, A.J. (2000). Chapter 61 - Wound Repair: Basic Biology to Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering (Second Edition). P. L. Robert;L. Robert;R. L. Joseph VacantiA2 - Robert P. Lanza and V. Joseph. San Diego, Academic Press: 857-878.

CookBiotech. (2013). "Oasis® wound matrix is a naturally derived structure that supports the Body's Healing Process." Consultado el 13 de agosto del 2012, de la página web <http://www.oasiswoundmatrix.com/aboutowm>.

Cotsarelis, G. (2006). Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric view. *Journal of Investigative Dermatology*. **126**: 1459-1468.

Coviden. (2012). "Permacol Surgical Implant." Consultado el 15 de julio del 2012, de la página web <http://www.autosuture.com/autosuture/pageBuilder.aspx?topicID=170603&breadcrumbs=0:63659,30707:0,170596:0>.

Croisier, F. and Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. **49**(4): 780-792.

De Beule, P.A.A.; Dunsby, C.; Galletly, N.P.; Stamp, G.W.; Chu, A.C.; Anand, U.; Anand, P.; Benham, C.D.; Naylor, A. and French, P.M.W. (2007). A hyperspectral fluorescence lifetime probe for skin cancer diagnosis. *Review of Scientific Instruments*. **78**(12).

Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. **1**(98): 1949-1953.

Dreesmann, L.; Ahlers, M. and Schlosshauer, B. (2007). The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials*. **28**(36): 5536-5543.

Enoch, S. and Leaper, D.J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **23**(2): 37-42.

Enoch, S. and Leaper, D.J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **26**(2): 31-37.

Eurosurgical. (2013). "Pelnac - Artificial dermis." Consultado el 12 de marzo del 2013, de la página web <http://www.eurosurgical.co.uk/wound-care-burns/pelnac/>.

Falanga, V. and Faria, K. (2007). Chapter seventy-seven - Bioengineered skin constructs. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). L. Robert;L. Robert;R. L. Joseph VacantiA2 - Robert Lanza and V. Joseph. Burlington, Academic Press: 1167-1185.

FDA. (2002). "INTEGRA® Dermal Regeneration Template." Consultado el 17 de septiembre del 2012, de la página web http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/P900033S008d.pdf.

Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J. and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. **24**(7): 1121-1131.

Genzime-Corporation®. (2013). "Epicel®:Important Safety Information." Consultado el Noviembre 16 del 2013, de la página.

Ghosh, K. and Clark, R.A.F. (2007). Chapter seventy-six - Wound repair. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). L. Robert;L. Robert and V. Joseph. Burlington, Academic Press: 1149-1166.

Goh, C.H.; Heng, P.W.S. and Chan, L.W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. **88**(1): 1-12.

Gomez, C.G.; Pérez Lambrecht, M.V.; Lozano, J.E.; Rinaudo, M. and Villar, M.A. (2009). Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*. **44**(4): 365-371.

Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S. and Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **63**(4-5): 352-366.

Grosskinsky, U. (2006). Biomaterial regulations for tissue engineering. *Desalination*. **199**(1–3): 265-267.

Hansaplast®. (2012). "Curación de heridas y heridas." Consultado el 25 de septiembre del 2012, de la página web <http://www.hansaplast.es/technology/wound-healing-and-wounds>.

Hansbiomedical. (2012). "SureDerm™." Consultado el 23 de septiembre del 2012, de la página web http://www.hansbiomed.com/english/2product/2.1/2.1.1_surederm.htm.

Hao, X.; Jeffery, J.L.; Le, T.P.T.; McFarland, G.; Johnson, G.; Mulder, R.J.; Garrett, Q.; Manns, F.; Nankivil, D.; Arrieta, E.; Ho, A.; Parel, J.-M. and Hughes, T.C. (2012). High refractive index polysiloxane as Injectable, in situ curable accommodating intraocular lens. *Biomaterials*. **33**(23): 5659-5671.

Healthcare-Ltd. (2011). "Biobrane." Consultado el 11 de noviembre del 2011, de la página web <http://www.woundcarehandbook.com/product/526/biobrane>.

Huang, L.; Gao, W.; Zhou, J. and Wang, R. (2010). Systems biology applications to explore secondary metabolites in medicinal plants. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. **35**(1): 7-12.

Integra®. (2012). "Integra® Product Description and Benefit." Consultado el 3 de marzo del 2011, de la página web http://www.ilstraining.com/idrt/idrt/brs_it_01.html.

Jacinto, A.; Martínez-Arias, A. and Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biology*. **3**: E117-E123.

Jean, J.; Garcia-Pérez, M.E. and Pouliot, R. (2011). Bioengineered Skin: The self-assembly approach. *Tissue Science & Engineering*. **S5:001**.

Jones, I.; Currie, L. and Martin, R. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*. **55**(3): 185-193.

Kim, B.-S.; Park, I.-K.; Hoshiba, T.; Jiang, H.-L.; Choi, Y.-J.; Akaike, T. and Cho, C.-S. (2011). Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. **36**(2): 238-268.

Kindred, C.; Oresajo, C.O. and Halder, R.M. (2009). Chapter 2 - Overview of the Structure and Function of Ethnic Skin. *Nutritional Cosmetics*. T. Aaron;Md;Ceo and M. B. Robert. Boston, William Andrew Publishing: 47-62.

Lai-Cheong, J.E. and McGrath, J.A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. **37**(5): 223-226.

Leshner, A.P.; Curry, R.H.; Evans, J.; Smith, V.A.; Fitzgerald, M.T.; Cina, R.A.; Streck, C.J. and Hebra, A.V. (2011). Effectiveness of Biobrane for treatment of partial-thickness burns in children. *Journal of Pediatric Surgery*. **46**(9): 1759-1763.

Liang, H.C.; Chang, Y.; Hsu, C.K.; Lee, M.H. and Sung, H.W. (2004). Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials*. **25**: 3541-3553.

LifeCell®. (2012). "Strattice™ Reconstructive Tissue Matrix." Consultado el 2 de febrero del 2012, de la página web <http://www.lifecell.com/health-care-professionals/lifecell-products/stratticetm-reconstructive-tissue-matrix/>.

Lindberg, K. and Badylak, S.F. (2001). Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. **27**(3): 254-266.

MacNeil, S. (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*. **11**(5): 26-35.

Menon, G.K.; Cleary, G.W. and Lane, M.E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. **435**(1): 3-9.

Mostow, E.N.; Haraway, G.D.; Dalsing, M.; Hodde, J.P. and King, D. (2005). Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: A randomized clinical trial. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery*. **41**(5): 837-843.

Nawaz, Z. and Bentley, G. (2011). Surgical incisions and principles of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **29**(2): 59-62.

Oblong, J.E. and Millikin, C. (2009). Chapter 2 - Skin Biology: Understanding Biological Targets for Improving Appearance. *Cosmetics Applications of Laser & Light-Based Systems*. S. A. Gurpreet. Boston, William Andrew Publishing: 37-48.

Olympus-Terumo-Biomaterials-Corp. (2012). "Terudermis." Consultado el 4 de noviembre del 2012, de la página web <http://www.biomaterial.co.jp/en/products/terudermis/product.html>.

Ortega-Zilic, N.; Hunziker, T.; Läuchli, S.; Mayer, D.O.; Huber, C.; Baumann Conzett, K.; Sippel, K.; Borradori, L.; French, L.E. and Hafner, J. (2010). EpiDex® Swiss Field Trial 2004–2008. *Dermatology*. **221**(4): 365-372.

Ostrovsky, G. (2006). "Orcel® Wound Sealant." Consultado el 14 de abril del 2011, de la página web <http://www.medgadget.com/2006/page/56>.

Parenteau, N.L.; Hardin-Young, J. and Ross, R.N. (2000). Chapter 62 - Skin. *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*. P. L. Robert; L. Robert; R. L. Joseph Vacanti A2 - Robert P. Lanza and V. Joseph. San Diego, Academic Press: 879-890.

Peter, S. (2001). Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*. **27**(5): 517-522.

Price, R.; Anthony, E.; Myers, S. and Navsaria, H. (2008). Chapter 17 - Tissue engineering for skin transplantation. *Tissue Engineering*. B. Clemens van; T. Peter; L. Andersset *al*. Burlington, Academic Press: 507-532.

Quinn, A.G. (2004). Biology of the skin and dermatological disease. *Medicine*. **32**(12): 1-3.

Regenicin. (2011). "About Permaderm." Consultado el 5 de noviembre del 2011, de la página web <http://www.regenicin.com/about/about-permaderm.html>.

Seal, B.L.; Otero, T.C. and Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. **34**(4–5): 147-230.

Seo, J.-H.; Matsuno, R.; Takai, M. and Ishihara, K. (2009). Cell adhesion on phase-separated surface of block copolymer composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and poly(dimethylsiloxane). *Biomaterials*. **30**(29): 5330-5340.

Shevchenko, R.V.; James, S.L. and James, E.S. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of The Royal Society Interface*. **7**: 229-258.

Shores, J.T.; Gabriel, A. and Gupta, S. (2007). Skin substitutes and alternatives: A review. *Advances in skin and wound care*. **20**: 493 - 508.

Silvera, L.A. and Barrios de Zurbarán, C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*. **16**: 9 -18.

Stokke, B.T.; Drager, K.I.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H. and Kajiwara, K. (1997). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. *Macromolecular Symposia*. **120**(1): 91-101.

Stratech-Corporation. (2010). "StrataGraft® skin tissue." Consultado el 5 de junio del 2012, de la página web <http://www.stratatechcorp.com/products/index.php>.

Sun, J.; Han, L. and Zhao, Z. (2008). Schizophrenia genes: Characteristics of function and protein interaction networks.

Sun, J. and Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Review. *Materials*. **6**: 1285-1309.

Szymonowicz, M.; Pielka, S.; aw; Owczarek, A.; Haznar, D. and Pluta, J. (2007). Study on Influence of Gelatin-Alginate Matrixes on the Coagulation System and Morphotic Blood Elements. *Macromolecular Symposia*. **253**(1): 71-76.

Thomas, D.W.; O'Neill, I.D.; Harding, K.G. and Shepherd, J.P. (1995). Cutaneous Wound Healing: A Current Perspective. *Oral Maxillofacial Surgery*. **53**: 6.

van der Veen, V.C.; van der Wal, M.B.A.; van Leeuwen, M.C.E.; Ulrich, M.M.W. and Middelkoop, E. (2010). Biological background of dermal substitutes. *Burns*. **36**(3): 305-321.

Velnar, T.; Bailey, T. and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*. **37**(5): 1528-1542.

Williamson, D. and Harding, K. (2004). Wound healing. *Medicine*. **32**(12): 4-7.

Wisconsin-University. (2007). "StrataGraft Tissue Sample." Consultado el 3 de mayo del 2011, de la página web <http://photos.uc.wisc.edu/photos/7653/view>.

Yildirim, L.; Thanh, N.T.K. and Seifalian, A.M. (2012). Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*. **30**(12): 638-648.

Young, A. and McNaught, C.-E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **29**(10): 475-479.

2. Material de soporte: Desarrollo y caracterización

2.1 Resumen

Los equivalentes tisulares son dispositivos artificiales que deben cumplir funciones similares a las del tejido que se quiere reemplazar. Muchas de las funciones de cada tejido son llevadas a cabo por células especializadas, cuyo crecimiento y supervivencia requiere de la existencia de un sustrato físico sobre el cual las células puedan anclarse. En el cuerpo humano tal sustrato es la matriz extracelular, pero en equivalentes tisulares al sustrato en mención, usualmente se le denomina soporte. El plasma sanguíneo humano (PH) es un material ampliamente estudiado para fabricar soportes usados en ingeniería de tejidos gracias a su contenido de fibrinógeno, proteína que es escindida por la trombina en condiciones específicas para formar monómeros, los cuales se polimerizan para formar una red de fibrina que puede servir de albergue para células y promover su proliferación, así como la síntesis de matriz extracelular. Además, es biocompatible, biodegradable y como puede obtenerse directamente de la sangre, hace posible su aplicación para trasplantes autólogos. Sin embargo, los geles de fibrina obtenidos a partir de PH son frágiles y difíciles de manejar, cualidades indeseables durante una cirugía para reemplazar

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de los geles obtenidos empleando plasma sanguíneo humano, en este capítulo se evaluaron dos estrategias: la primera consistió en la combinación del PH con alginato de sodio, sustancia que tiene el mismo mecanismo de gelificación que el fibrinógeno (intercambio iónico con Ca^{+2}); la segunda consistió en el aumento de la concentración de fibrinógeno mediante crioprecipitación de PH (PHCC). Las propiedades mecánicas de los geles obtenidos para las diferentes condiciones se evaluaron mediante reología dinámica; los resultados muestran que los geles fabricados a partir de PHCC tienen una resistencia mecánica mayor que los fabricados a partir de alginato de sodio, a partir de mezclas de alginato y PH o a partir de mezclas de alginato y PHCC; en todos los casos, la resistencia mecánica fue mayor a mayores concentraciones de Ca^{+2} . Las mejores propiedades mecánicas del gel de PHCC comparadas con las de PH, permiten sugerir su uso como material de soporte para ingeniería de tejidos sin las complicaciones adicionales de biocompatibilidad y biodegradabilidad que implica el uso de alginato de sodio. Sin embargo, el elevado tiempo de formación de gel con PHCC (de 10 a 30 min a exactamente 37°C) dificulta su uso para la generación de soportes a alta velocidad con formas preseleccionadas, como las requeridas para formar las microesferas de las que se hablará en el capítulo 3; en dicho caso, la mezcla PHCC - alginato de sodio al 1% p/v resulta más conveniente.

2.2 Introducción

Como resultado de un daño ocurrido en el organismo que implique el rompimiento de uno o varios vasos sanguíneos, se activa el proceso de coagulación, cuyo objetivo es detener la hemorragia (hemostasia). La **coagulación** es un proceso complejo en el cual interviene el **fibrinógeno**, una proteína presente en el plasma sanguíneo humano, que mediante proteólisis por la trombina forma monómeros, los cuales se polimerizan en presencia de calcio para formar una malla polimérica denominada **fibrina** que sirve de barrera inicial para detener el sangrado. Dicha red polimérica es estabilizada por entrecruzamiento adicional mediante factor XIIIa de la cascada de coagulación (Lauricella, 2007).

Bajo este principio, diversos investigadores han empleado plasma humano como fuente de fibrinógeno, para formar estructuras de soporte en ingeniería de tejidos (Meana *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2008) y su uso se ha extendido para la proliferación *in vitro* de condrocitos, fibroblastos, entre otros. Una de las principales dificultades que se ha encontrado es la baja resistencia mecánica de dichos soportes.

En el presente capítulo se desarrolla una metodología que tiene como objetivo evaluar alternativas que permitan **mejorar las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma sanguíneo humano**. Para tal fin se han abordado dos estrategias, la primera de ellas consiste en la mezcla del plasma humano (PH) con alginato de sodio, que es un material polimérico, ampliamente empleado en ingeniería de tejidos que tiene la cualidad de contar con un mecanismo de formación de gel similar al de PH y consiste en intercambio iónico con calcio (Ca^{++}). Los geles obtenidos con alginato de sodio son muy resistentes y el objetivo es impartirle esta cualidad a los obtenidos solamente con PH. La segunda estrategia considera el aumento de la concentración del fibrinógeno en el PH, empleando la parte insoluble en frío resultante de la descongelación entre 1 a 6 °C del plasma y se conoce con el nombre de plasma humano crio concentrado (PHCC). El PHCC se obtiene mediante un proceso de centrifugación a bajas temperaturas del PH que aumenta hasta 10 veces la concentración del fibrinógeno.

En el presente capítulo se presentan los resultados de la evaluación de la formación del gel para diferentes mezclas de PH y alginato de sodio, PHCC sólo y mezclado con alginato de sodio, variando la concentración de Ca^{++} en la mezcla final y las propiedades mecánicas de los geles obtenidos mediante **reología dinámica**. Los valores obtenidos se reportan en función de los módulos de almacenamiento y disipación, cada uno dando cuenta del carácter elástico y viscoso, respectivamente, del material.

2.3 Fibrinógeno y fibrina

La fibrina es un polímero natural obtenido a partir de fibrinógeno. El fibrinógeno es una proteína soluble presente en la sangre, de peso molecular 340kDa (Stokke *et al.*, 1997), que mediante proteólisis forma monómeros de **fibrina** a través de la acción de la trombina; dichos monómeros

se polimerizan en presencia de calcio. Luego otra enzima, la transglutaminasa o factor **XIIIa**, que es activada por la trombina, entrecruza la fibrina mediante enlaces de residuos de glutamina, dando lugar a la formación de una estructura más resistente (Lauricella, 2007; Shikanov *et al.*, 2009).

2.3.1 Estructura molecular del fibrinógeno

El fibrinógeno está formado por dos triples hélices unidas por sus cadenas N-terminales. Contiene péptidos alfa y beta, los cuales están unidos entre sí por puentes disulfuro, al igual que los péptidos gamma. Las regiones peptídicas terminales alfa y beta, mostradas en azul en la **Figura 2-1**, contienen residuos de glutamato y aspartato cargados negativamente que hacen que se repelan unas moléculas con otras y se prevenga la agregación (Smith *et al.*, 2004; Falvo *et al.*, 2010; Lebitasy *et al.*, 2011).

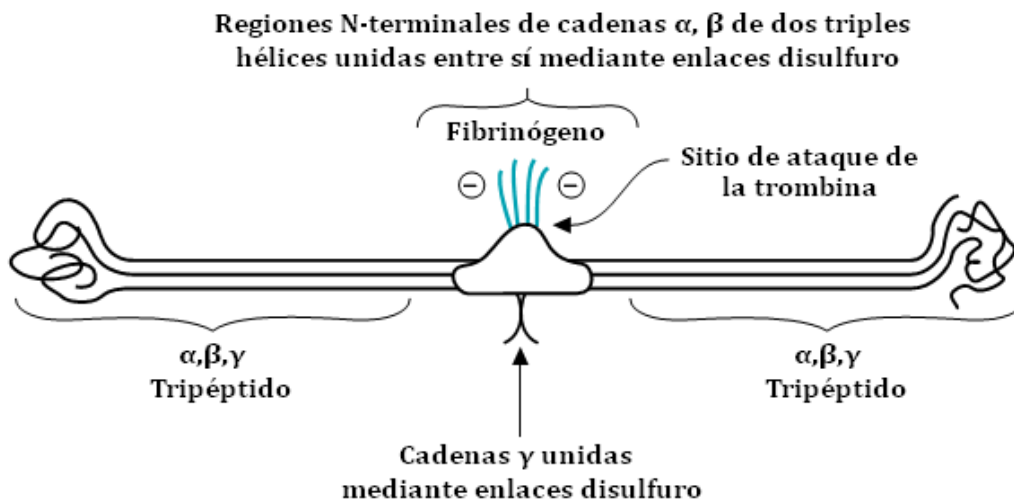


Figura 2-1: Estructura molecular del fibrinógeno.
Tomada y adaptada de Smith *et al.* (2004)

En la **Figura 2-2** se muestra la acción de la trombina, que es una serina proteasa (hidrolasa que degrada enlaces peptídicos de péptidos y proteínas y que poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática), encargada de romper las terminales del fibrinógeno que contienen las cargas negativas, permitiéndole a los monómeros de fibrina agregarse y formar un coágulo blando, el cual es entrecruzado subsecuentemente por otra enzima, la trasglutaminasa (Rand & Murray, 2000; Spicer & Mikos, 2010; Lebitasy *et al.*, 2011).

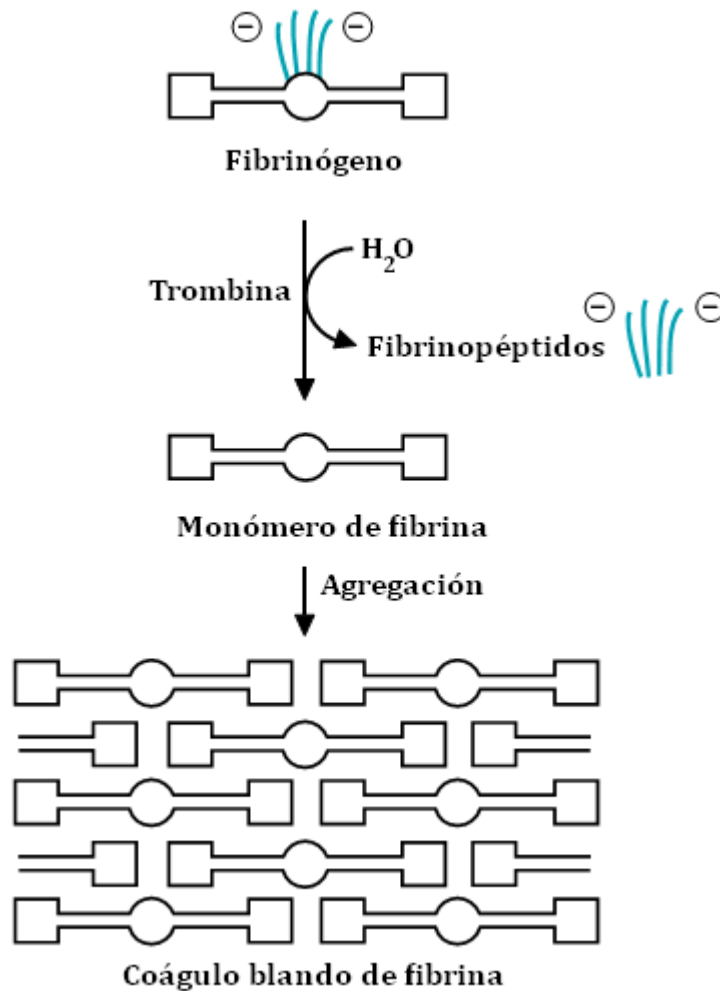


Figura 2-2: Formación del coágulo de fibrina.
Tomada y adaptada de Smith *et al.* (2004)

2.3.2 Obtención del fibrinógeno

El fibrinógeno puede obtenerse a partir de sangre humana, separando las fracciones presentes en la misma por centrifugación. La fracción celular contiene glóbulos rojos y blancos mientras que la fracción acelular, denominada **plasma sanguíneo**, es rica en agua, albúmina, plaquetas y fibrinógeno entre otros. Burnour *et al.* (2012), reportaron una concentración de fibrinógeno en el plasma de 0,11 mg/mL.

2.3.3 Función de la sangre en el cuerpo – cascada de coagulación

La sangre es el principal sistema de transporte en el cuerpo humano. Aunque el transporte y el suministro de oxígeno a las células de los tejidos se llevan a cabo por células especializadas, otros

componentes vitales, tales como nutrientes, metabolitos, electrolitos y hormonas son arrastrados en la fracción no celular de la sangre, el **plasma**.

Algunos componentes, tales como la glucosa, se disuelven en el plasma, mientras que otros, por ejemplo, lípidos y hormonas esteroidales, están unidos a proteínas transportadoras. La presión osmótica de las proteínas del plasma regula la distribución de agua entre la sangre y los tejidos. Las proteínas plasmáticas en conjunto con las plaquetas mantienen la integridad del sistema circulatorio a través del proceso de coagulación.

La sangre circula a través del endotelio, que es el tejido que recubre la zona interna de todos vasos sanguíneos, incluyendo los del corazón. Cuando un vaso sanguíneo se rompe, un coágulo de sangre se forma como parte de la **hemostasia**, que es la respuesta fisiológica del organismo para detener la hemorragia. Durante la hemostasia se forma en el sitio de la lesión un tapón hemostático primario, que consiste en agregados de plaquetas y un coágulo de fibrina. La formación de la red de fibrina es el proceso por el cual el fibrinógeno soluble en la sangre es convertido en fibrina insoluble por acción de la trombina y de la transglutaminasa o factor XIIIa. Dicho proceso comprende tres etapas principales: proteólisis del fibrinógeno por la acción de la trombina, polimerización de los monómeros de fibrina y estabilización de la fibrina por el factor XIIIa (Lauricella, 2007; Shikanov *et al.*, 2009).

La lesión del endotelio activa la cascada de coagulación de la sangre, que en última instancia activa la trombina (que a su vez activa la polimerización del fibrinógeno en fibrina) y el factor XIII que enlaza las hebras de los monómeros de fibrina para formar un coágulo estable. La cascada de la coagulación de la sangre se compone de una serie de enzimas, que son inactivos hasta que una enzima anterior en la cascada activa su acción. Otras proteínas (Factor V y Factor VIII) sirven para la unión de proteínas, ensamblando complejos de factores en el sitio de la lesión (Smith *et al.*, 2004).

2.3.4 Hemostasia - Cascada de coagulación

La **hemostasia** es la respuesta fisiológica del organismo para detener la hemorragia y tiene como objetivo detener la pérdida de sangre. Dentro de los mecanismos que se activan se encuentran (Beldon, 2010):

- Generación de espasmo vascular (estrechamiento súbito y leve del vaso sanguíneo)
- Formación de un tapón plaquetario
- Formación de un coágulo sanguíneo como resultado de la coagulación sanguínea
- Proliferación final del tejido fibroso en el coágulo sanguíneo (invasión por fibroblastos o disolución).

La **hemostasia** comprende las siguientes fases (Enoch & Leaper, 2008):

- Formación de un agregado plaquetario laxo y temporal en el sitio de la lesión.

- Formación de una malla de fibrina que se une al agregado plaquetario, formando un tapón hemostático o trombo.
- Disolución parcial o completa del tapón hemostático o trombo por plasmina.

En la **Figura 2-3** se presentan las reacciones implicadas durante la hemostasia, en las cuales el producto de un proceso inicia un proceso subsiguiente cuyo producto inicia a otro (de ahí el nombre de **cascada de coagulación**). Por proteólisis una proenzima inactiva es convertida a una enzima activa designada por una "a" después del número del factor. Los factores enzimáticos operan en blancos seleccionados en sustratos específicos (Smith *et al.*, 2004).

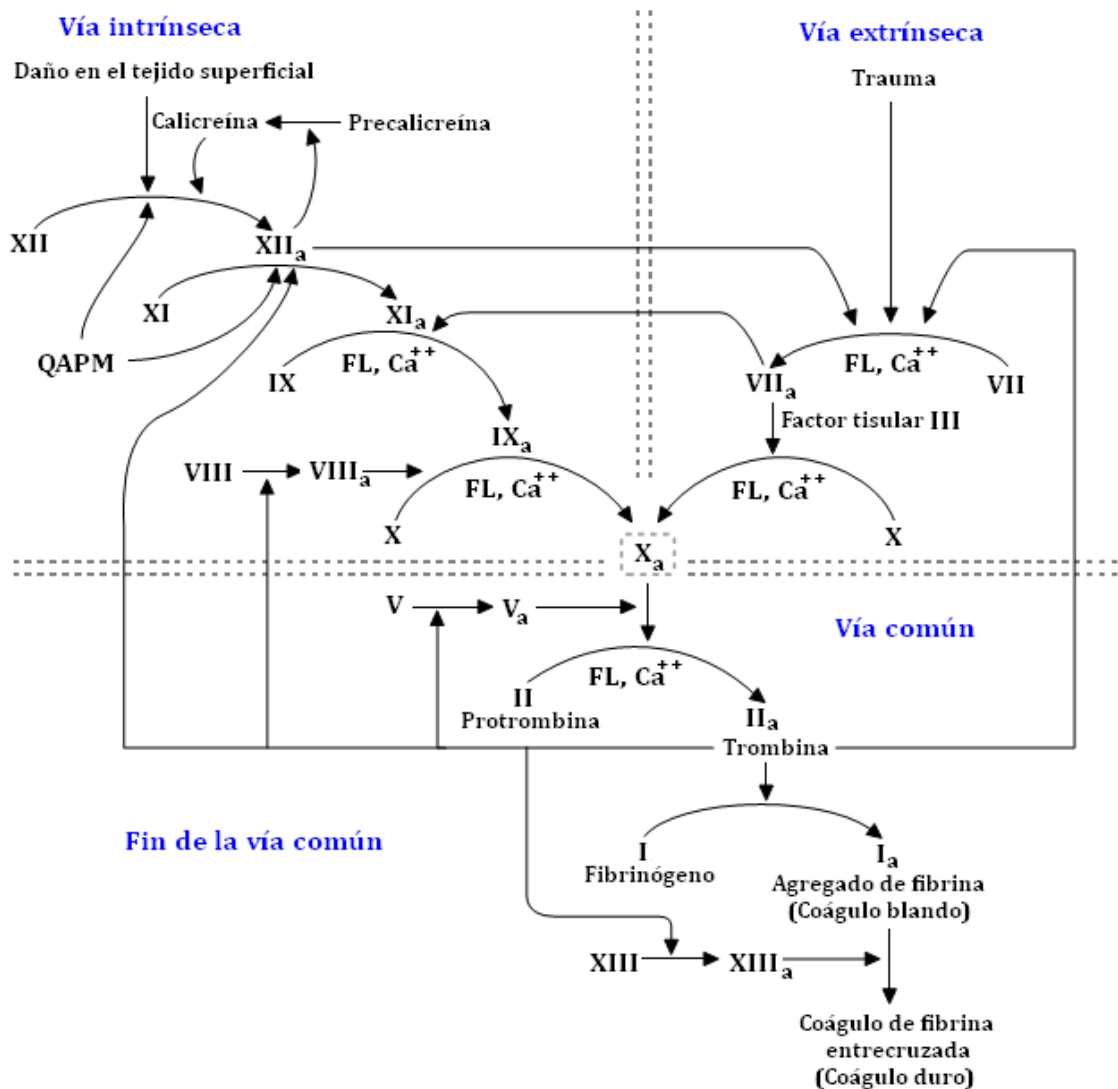


Figura 2-3: Cascada de coagulación.
Tomada y adaptada de Smith *et al.* (2004) Ver **Tabla 2-1** para la nomenclatura.

En la **Tabla 2-1** se presentan las proteínas que intervienen en el proceso de coagulación sanguínea, más conocidos como factores de coagulación (Rand & Murray, 2003; Smith *et al.*, 2004).

Tabla 2-1: Proteínas de la coagulación sanguínea. Factores de coagulación

Factor	Nombre	Función/ Forma activa
I	Fibrinógeno	Fibrina
II	Protrombina	Serín proteasa
III	Factor tisular	Receptor y cofactor
IV	Ca ²⁺	Cofactor
V	Proacelerina, factor lábil; Ac-globulina (Ac-G)	Cofactor
VII	Acelerador de la conversión de la protrombina sérica (SPCA); proconvertina; factor estable	Serín proteasa
VIII	Factor antihemofílico A –Globulina antihemofílica (GAH)	Cofactor
IX	Factor antihemofílico B, factor <i>Christmas</i>	Serín proteasa
X	Factor <i>Stuart Prower</i>	Serín proteasa
XI	Factor antihemofílico C, Tromboplastina antecedente del plasma	Serín proteasa
XII	Factor de Hageman	Serín proteasa
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Transglutaminasa dependiente de Ca ²⁺
Precalicroína		Serín proteasa
Quininógeno de alto peso molecular (QAPM)		Cofactor
Proteínas regulatorias		
Trombomodulina		Receptor celular endotelial, se une a la trombina
Proteína C		Activado por el enlace trombomodulina – trombina; es una Serín proteasa
Proteína S		Cofactor, se une a la proteína C activada

▪ **Transglutaminasa - Factor XIII**

La transglutaminasa o factor XIII de la cascada de coagulación es activada por la trombina en la presencia de calcio. Una vez activada, se denomina factor XIIIa y actúa sobre las moléculas de fibrina, formando enlaces cruzados intermoleculares, dando lugar a la formación de una red tridimensional insoluble. Así, la transglutaminasa tiene la capacidad de aportar resistencia mecánica, estabilidad térmica y capacidad de retención del agua. En la cascada de

coagulación la transglutaminasa es la encargada de estabilizar el trombo de fibrina. (Rand & Murray, 2003).

2.4 Alginato de sodio

El alginato es un polímero aniónico obtenido típicamente de algas pardas marinas y ha sido ampliamente investigado y usado en aplicaciones biomédicas, debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad y a la formación de gel en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} . El alginato disponible comercialmente, es principalmente extraído de algas marinas de la familia *Phaeophyceae*, incluyendo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, y *Macrocystis pyrifera*, mediante tratamiento con NaOH. El extracto producido es filtrado y mezclado con cloruro de sodio con el fin de precipitar el alginato. Esta sal de alginato se transforma en ácido algínico mediante la adición de ácido clorhídrico. Después de la purificación y conversión, se obtiene un polvo de alginato de sodio soluble en agua. El alginato también puede producirse por vía bacteriana a partir de *Azotobacter* o *Pseudomonas* (Ma, 2005).

2.4.1 Estructura y caracterización

El alginato es un copolímero lineal compuesto principalmente por bloques de (1,4)- β -manuronato (M) y α -L-guluronato (G). Estos bloques están compuestos de residuos G y M consecutivos o alternados así: (GGGGGG), (MMMMMM) y/o (GMGMGM). De acuerdo con la fuente de la que son extraídas esta configuración puede variar, así como su longitud, dando lugar a la formación de más de 200 tipos diferentes de alginato (Andersen *et al.*, 2012).

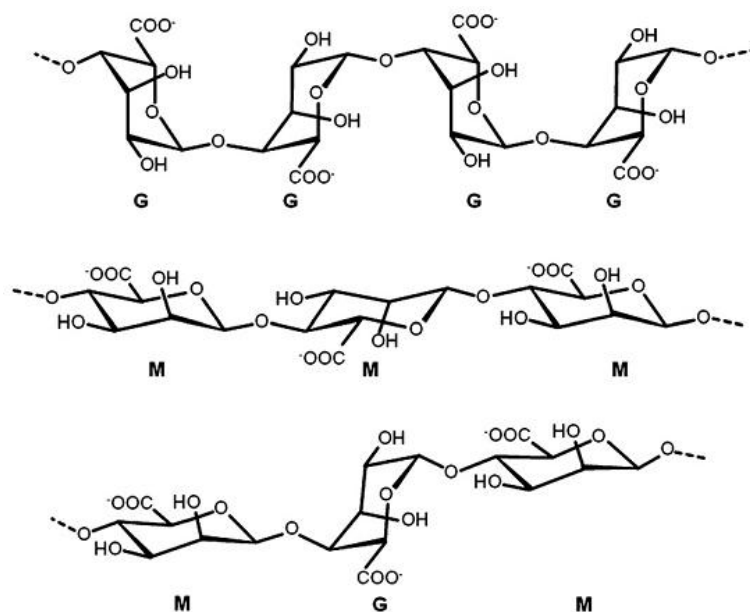


Figura 2-4: Estructura química de los bloques G y los bloques M del alginato
Tomado y adaptado de Lee *et al.* (2012)

Solo los bloques G del alginato participan en el entrecruzamiento intermolecular con cationes divalentes como el calcio para la formación de hidrogeles. La composición (relación M/G), la longitud de la secuencia G y el peso molecular son factores críticos que afectan las propiedades físicas del alginato y los hidrogeles resultantes. Las propiedades mecánicas del alginato son generalmente mejoradas incrementando la longitud de los bloques G y el peso molecular. Por ejemplo el alginato bacterial producido a partir de *Azotobacter* tiene una mayor concentración de bloques G y sus geles son relativamente más resistentes (Lee *et al.*, 2012).

2.4.2 Peso molecular y solubilidad

El peso molecular de los alginatos de sodio disponibles comercialmente oscila entre 32.000 a 400,000 g/mol. La viscosidad de las soluciones de alginato es inversamente proporcional al pH, alcanzando un máximo a pH entre 3- 3,5. El módulo elástico de los geles puede ser incrementado significativamente, usando combinaciones de alginato de alto y bajo peso molecular.

2.4.3 Biocompatibilidad

Los problemas de biocompatibilidad están más asociados a impurezas contenidas en los alginatos extraídos de fuentes naturales, que a una acción del alginato en sí mismo. Esto se afirma debido a que no se ha observado respuesta inflamatoria cuando se implantan geles obtenidos a partir de alginato altamente purificado (Lee *et al.*, 2012).

2.4.4 Adhesión celular

El alginato intrínsecamente carece de ligandos adecuados para favorecer la adhesión celular, por lo que en muchas aplicaciones biomédicas ha sido modificado químicamente adicionándole péptidos que incluyan la secuencia Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) que han sido usados como ligandos de adhesión celular, debido a la presencia de receptores de integrinas ($\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$) (Andersen *et al.*, 2012). La funcionalización química con restos de señalización celular es crucial para superar la baja afinidad de los alginatos a las superficies celulares (Pawar & Edgar, 2012).

2.4.5 Formación de hidrogeles de alginato

El método más común para la preparación de hidrogeles de alginato es combinar una solución acuosa de alginato con una solución que contenga el agente entrecruzante (iones divalentes como el calcio).

Se cree que los cationes divalentes se unen exclusivamente a los bloques de guluronato de las cadenas de alginato, ya que estos permiten un alto grado de coordinación con los iones divalentes. Los bloques de guluronato de un polímero forman uniones con los bloques de guluronato de otro, dando lugar a la formación de una estructura conocida como el **modelo de la caja de huevos** (*egg-box*), que resulta en la formación de un gel (Ma, 2005).

El cloruro de calcio es uno de los agentes entrecruzantes más empleado, sin embargo la formación del gel ocurre muy rápido lo que no permite un adecuado control de la forma del mismo. Uno de los aspectos críticos de los geles formados con alginato entrecruzado químicamente es la estabilidad a largo tiempo de los geles formados en condiciones fisiológicas, debido a que los geles se pueden disolver y liberar iones divalentes al medio debido a reacciones de intercambio con los cationes divalentes (Lee *et al.*, 2012).

Adicionalmente los iones de calcio liberados promueven la hemostasis mientras que el gel sirve de matriz para la agregación de plaquetas y eritrocitos. Esta cualidad puede ser positiva o negativa dependiendo del uso del alginato

2.4.6 Biodegradación del alginato y sus hidrogeles

El alginato no es degradable en mamíferos, ya que éstos carecen de la enzima alginasa, que es la que puede escindir las cadenas de dicho polímero. Los geles de alginato reticulados iónicamente se pueden disolver por la liberación de los iones divalentes en el medio circundante, mediante el intercambio iónico con cationes monovalentes como el sodio. Sin embargo, inclusive si es posible disolver el gel, los pesos moleculares promedio de muchos alginatos disponibles comercialmente son más altos que el umbral de aclaramiento renal de los riñones, y probablemente no serán eliminados por completo del cuerpo (Lee *et al.*, 2012).

2.5 Propiedades mecánicas

2.5.1 Reología dinámica

El comportamiento de flujo también puede denominarse comportamiento reológico cuando los materiales se evalúan acorde a los parámetros de la reología. La reología permite prever el comportamiento durante el manejo del material e inferir la microestructura del mismo.

Se distinguen dos tipos de comportamientos ideales de los materiales. Aquellos que se comportan como sólidos ideales elásticos siguiendo la **Ley de Hooke** o como fluidos viscosos que siguen la **Ley de Newton**.

Un material dado se deforma si una fuerza es aplicada. La deformación del material depende de las propiedades intrínsecas del mismo y de la forma cómo es aplicada la fuerza. Un material

elástico se deforma inmediatamente cierta longitud una vez aplicado el esfuerzo y retorna a su forma original una vez éste es removido. Los materiales que siguen este comportamiento obedecen a la **Ley de Hooke**. Si por el contrario la deformación permanece una vez removido el esfuerzo, se dice que el material se comporta siguiendo la **Ley de Newton**.

Para definir el término **deformación** (*strain*) considere un material en forma de cubo con su base fija a la superficie tal como se presenta en la **Figura 2-5**.

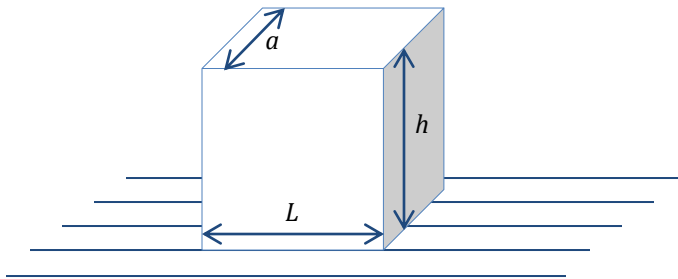


Figura 2-5: Sólido ideal con la base fija a la superficie

Si se considera que el cubo presentado en la **Figura 2-5** es un sólido ideal y si se aplica una fuerza de empuje constante **F** en la parte superior del mismo, éste obedecerá la **ley de Hooke** de la deformación elástica y se deformará a una nueva posición proporcional al esfuerzo aplicado, cambiando su forma pero conservando su volumen.

La **deformación de cizalla** γ (*shear deformation*) o **cizallamiento** se define como la relación entre la distancia horizontal (δu) que se desplaza la cara sobre la que se aplica la fuerza y la altura del cuerpo (h), tal como se aprecia en la **Figura 2-7**.

$$\gamma = \frac{\delta u}{h} \text{ [adimensional]} \tag{2-1}$$

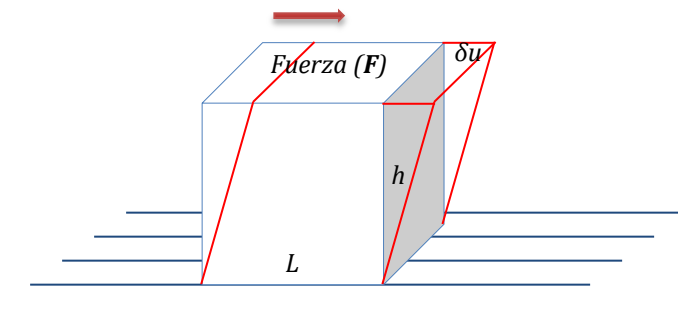


Figura 2-6: Deformación de cizalla

El **esfuerzo de corte** τ (*shear stress*) es definido como la relación entre la fuerza tangencial (F) y el área de la cara sobre la que se aplica ($A = a \cdot L$).

$$\tau = \frac{F}{A} \left[\frac{N}{m^2} \right] \quad (2-2)$$

Para un material puramente elástico, la **ley de Hooke** establece que el **esfuerzo** τ (*stress*) es proporcional a la **deformación** γ (*strain*), por lo tanto:

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (2-3)$$

Donde G es una constante que corresponde al **módulo de cizalla** o de **elasticidad transversal**.

Considérese de nuevo un material fluido en forma de cubo con su base fija a la superficie tal como se presenta en la **Figura 2-7**. Este material se comporta según la **Ley de Newton** si, al aplicarle una fuerza F en la parte superior del mismo, se deforma continuamente mientras se aplique la fuerza.

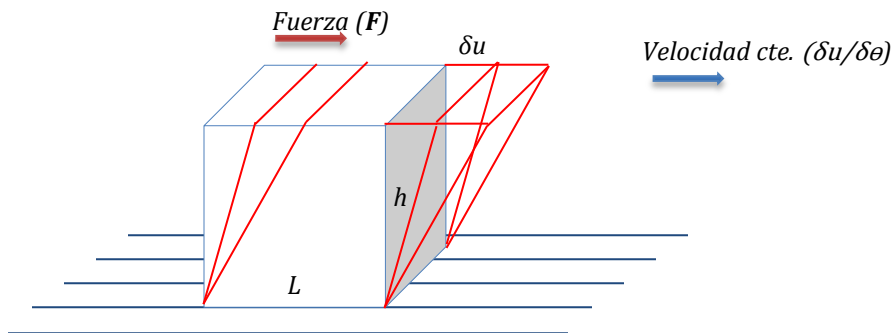


Figura 2-7: Ley de Newton

La relación de cambio en el tiempo de la deformación (*strain*) es definida como la **velocidad de deformación de cizalla** (*shear strain rate*) o **velocidad de cizallamiento** $\dot{\gamma}$ (*shear rate*) así:

$$\dot{\gamma} = \frac{\delta \gamma}{\delta \theta} \quad (2-4)$$

La **velocidad de cizallamiento** $\dot{\gamma}$ obtenida luego de aplicar un esfuerzo de corte τ (*shear stress*) será dependiente de la resistencia del material a fluir, es decir la **viscosidad** η .

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \left[\frac{N}{m^2} \cdot s = Pa \cdot s \right] \quad (2-5)$$

Si un material tiene una viscosidad que es independiente del esfuerzo de corte τ , entonces se comporta como un fluido ideal o **fluido Newtoniano**.

El comportamiento mecánico de algunos materiales es el resultado de una combinación entre la ley viscosidad de Newton y la ley de elasticidad de Hooke. La **ley de Hooke** establece una relación lineal simple que implica que al duplicar el esfuerzo aplicado, la deformación medida también se duplica. Si la deformación producida es suficientemente pequeña se puede decir que se está trabajando en la región de respuesta de deformación lineal. Antes de realizar los ensayos de oscilación sobre el material es necesario verificar esta condición. En los ensayos de oscilación a una frecuencia fija dada se incrementa lentamente la amplitud aplicada (deformación o esfuerzo). Los valores medidos de viscoelasticidad deben permanecer constantes. Cuando el esfuerzo aplicado es muy grande, la deformación inducida causa una ruptura del material.

Las técnicas oscilatorias pueden ser usadas para medir las propiedades viscoelásticas de los materiales. Esta técnica consiste en aplicar un esfuerzo o una deformación cuyo valor cambia continuamente de acuerdo con una función sinusoidal. La respuesta inducida (deformación o esfuerzo) también seguirá un función sinusoidal tal como se presenta en la **Figura 2-8**.

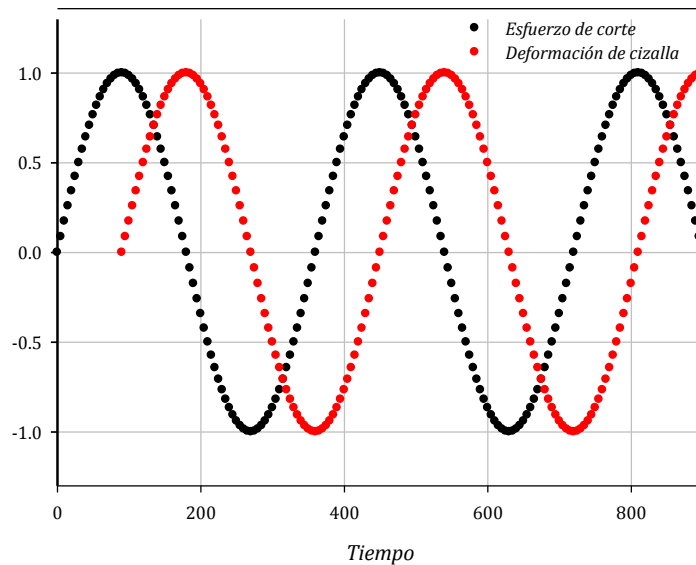


Figura 2-8: Respuesta sinusoidal al esfuerzo o deformación aplicada

El esfuerzo que desarrolla un material varía con la frecuencia (w), pero existe un desfase (δ) con respecto a la deformación comprendido entre 0 y $\pi/2$ radianes ($0-90^\circ$).

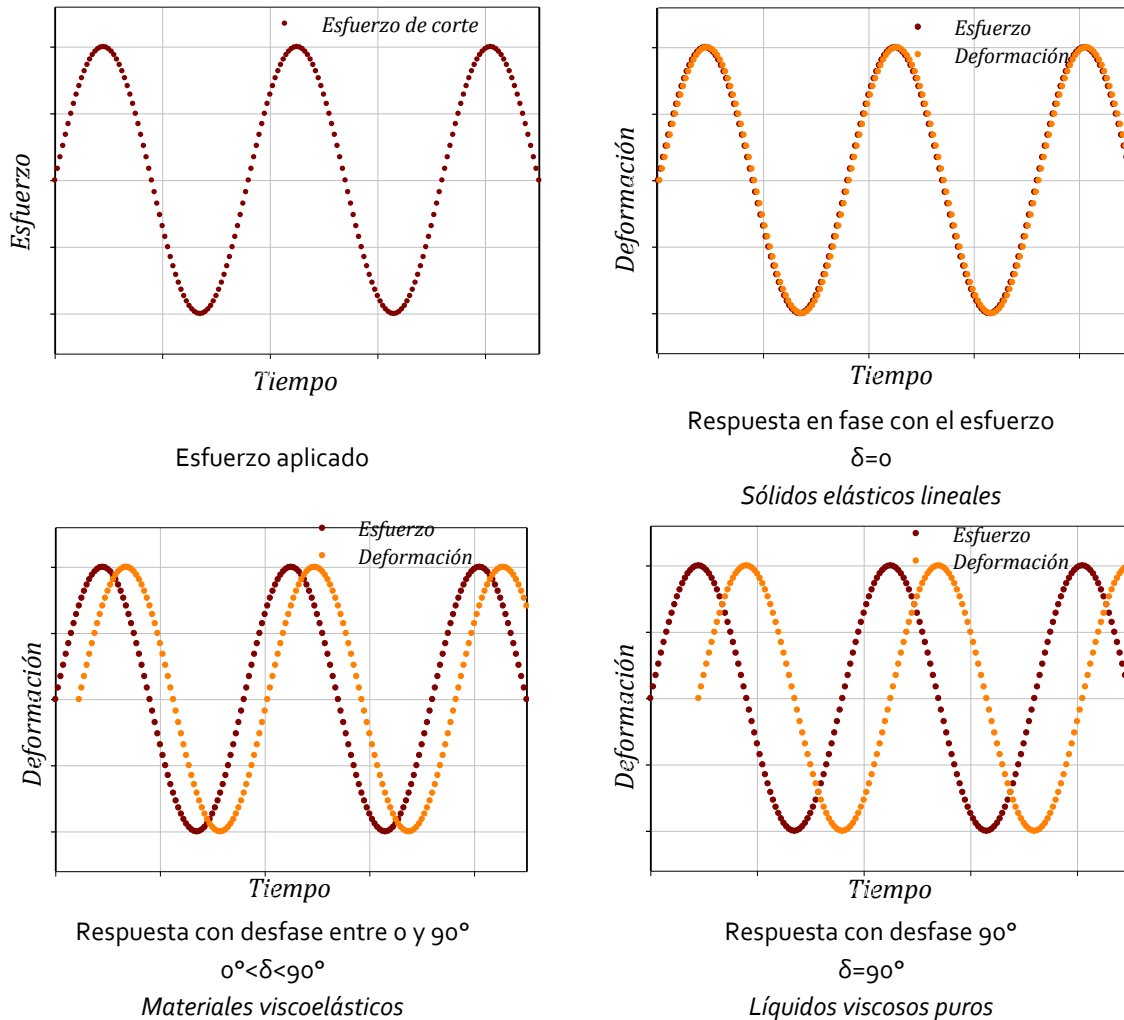


Figura 2-9: Tipo de material según la respuesta ante un esfuerzo o deformación aplicado

Para un sólido elástico la deformación es controlada por el valor absoluto del esfuerzo de corte, mientras que para un líquido la tasa de cambio de la deformación está controlada por el esfuerzo. Para un ciclo completo de una onda sinusoidal (360°) hay diferencias de fase entre las dos ondas que corresponde al ángulo de fase. En el caso de un sólido elástico, la respuesta de la deformación está totalmente en fase con el esfuerzo aplicado (ángulo de fase: 0°). Para un líquido viscoso newtoniano, cuando la tasa de deformación alcanza un valor máximo, la tasa de cambio de la misma es cero, así mismo, cuando la deformación es cero, la tasa de cambio tiene

un valor máximo. La deformación resultante total será 90° fuera de fase del esfuerzo aplicado (Nunamaker *et al.*, 2011a).

La ley de Hooke relaciona la deformación con el esfuerzo a través de una constante del material conocida como **módulo G** (ver **Ecuación 2-6**). En los ensayos de oscilación el **esfuerzo τ** y la **deformación γ** cambian constantemente, pero se pueden obtener valores instantáneos de G viscoelástico en cualquier de los puntos.

Esto se conoce como el **módulo complejo G^*** del material y es obtenido de la relación entre la amplitud del esfuerzo y la amplitud de la deformación. Este módulo, tal como se presenta en la **Ecuación 2-6** es la suma del **componente elástico G'** o módulo de almacenamiento de energía que describe la energía almacenada, esto es la deformación recuperable en un sólido elástico y el **componente viscoso G''** o módulo de pérdida que describe la disipación viscosa de energía a través de la deformación permanente en el fluido (Nunamaker *et al.*, 2011b).

$$G^* = G' + iG'' \tag{2-6}$$

Si se mide la relación del esfuerzo y la deformación (G^*) como un diferencia de fases entre los dos (**delta, δ**), G' y G'' pueden ser definidos en términos de una función de seno y coseno. G^* puede ser representada por una combinación de dos vectores, tal como se presenta en la **Figura 2-10**.

$$G' = G^* \cos \delta \tag{2-7}$$

$$G'' = G^* \sin \delta \tag{2-8}$$

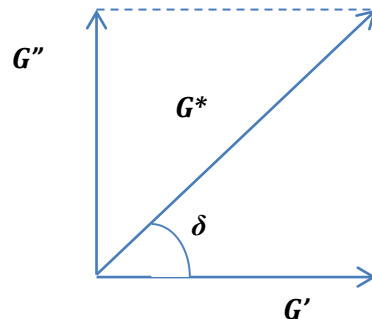


Figura 2-10: Modulo complejo como combinación de dos vectores

Una manera simple de determinar experimentalmente las propiedades viscoelásticas de una solución de macromoléculas es sometiéndola a una oscilación periódica; en tal caso, de acuerdo con sus propiedades viscoelásticas, la solución puede ser clasificada en tres categorías (Borzacchiello *et al.*, 2003).

Solución enmarañada

El comportamiento de red "enmarañada" se observa cuando las macromoléculas presentes en un solvente son suficientemente largas y/o se encuentran en altas concentraciones; en dicho caso, las moléculas comienzan a enredarse unas con otras, formando una estructura temporal tipo red.

Cuando dicha solución es sujeta a un cizallamiento, las moléculas enredadas tienden a oponerse al movimiento, acumulando cierto esfuerzo. Si la frecuencia de la oscilación es baja, el tiempo que el cizallamiento dura en una sola dirección es elevado; en tal caso, el movimiento propio de las moléculas (Browniano) puede ayudar a desenredar la red, alineando las moléculas en la dirección del cizallamiento, liberando parte del esfuerzo acumulado; y se dice por tanto que la solución presenta un comportamiento viscoso ($G'' > G'$ o $G'/G'' < 1$). Sin embargo, si la frecuencia de la oscilación es elevada, la dirección de movimiento del fluido cambia a menudo, por lo que las cadenas moleculares no tienen tiempo de organizarse y desenredarse y, por tanto, se comportan temporalmente como una red entrecruzada, mostrando un comportamiento elástico ($G' > G''$ o $G'/G'' > 1$).

La transición entre el comportamiento viscoso y el elástico, marcada por el cruce de las curvas del módulo viscoso y el módulo de almacenamiento como función de la frecuencia ($G' = G''$ o $G'/G'' = 1$) ocurre a una frecuencia específica (f^*) que corresponde a la velocidad intrínseca con la que se desenredan las cadenas poliméricas; dado que tal velocidad depende de la movilidad de la macromolécula, la frecuencia de cruce dependerá del peso molecular y la concentración de la solución polimérica.

Gel débil

En un gel débil, además de enredos entre macromoléculas, también existen entrecruzamientos físicos entre ellas, causados por interacciones electrostáticas, enlaces de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, entre otros. Tales interacciones reducen la movilidad de las moléculas poliméricas, creando una estructura con cierta rigidez lo que causan que el **módulo de almacenamiento** G' sea algo mayor que el **módulo de pérdida** G'' ($G' > G''$).

Clark & Ross-Murphy (1987) definen un gel débil como aquel en el que $1 < G'/G'' < 10$. A pesar de las interacciones físicas, el efecto de enredo entre moléculas aún resulta importante, por lo que aunque G' y G'' son prácticamente paralelos, existe una débil dependencia de tales módulos con la frecuencia de oscilación, lo cual también está relacionado con el hecho de que como las moléculas no tienen la misma longitud, entonces no existe un único valor de la velocidad de desenredo entre moléculas sino que existe una distribución de tales velocidades.

Gel robusto

En este tipo de gel existen **enlaces químicos covalentes** entre las diferentes macromoléculas; por ello, el comportamiento de los módulos de almacenamiento y de pérdida son dos líneas prácticamente horizontales sobre un amplio intervalo de frecuencias de oscilación ($\sim 10^{-2}$ a 10^2 Hz) y tienden a incrementarse ligeramente a frecuencias superiores. Debido a que el módulo de almacenamiento es típicamente uno o dos órdenes de magnitud mayor que el módulo de pérdida, (Clark & Ross-Murphy, 1987) definen un gel como robusto si $G' > 10 G''$ o $G'/G'' > 10$.

2.5.2 Reología dinámica del alginato de sodio

Diversos autores han evaluado el comportamiento reológico del alginato de sodio, variando su concentración, la cepa de origen o su estructura molecular. Tal es el caso de Choundary & Bhatia (2012), quienes, evaluaron alginatos modificados hidrofóbicamente a una concentración de 1% (p/v) de alginato y reportan valores del módulo elástico G' entre 700 y 150 Pa y del módulo viscoso G'' entre 3-10 Pa.

Stokke *et al.* (1997) obtuvieron valores de G' del orden de 3000 Pa empleando calcio en una concentración 20 mM para alginatos provenientes del tallo de *L. hyperborea*, a una temperatura de 20°C.

Amici *et al.* (2008) (Amici *et al.*, 2008) emplearon alginato al 0,9% p/p, con un peso molecular promedio de $9,7 \times 10^4$ g mol⁻¹ y un fracción de ácido gulurónico FG igual a 0,7. Ellos adicionan NaCl una azida de sodio NaN₃ para ajustar la viscosidad y evitar el crecimiento microbiano respectivamente. Se empleó CaCO₃ en una concentración 22 mM. Al realizar ensayos de reología dinámica hallaron en todos los casos una prevalencia del módulo elástico sobre el módulo viscoso para tiempos posteriores a los 1000 segundos. Los mayores valores de G' se obtuvieron para las mezclas con mayor contenido de alginato y calcio (0,72 % p/p de alginato y 17,6 mM de Ca⁺⁺). En todos los casos el G' excedió hasta en un 2000% al G'' .

Moresi & Bruno (2007) emplearon alginatos con alto contenido de bloques G, provenientes de *Laminaria hyperborea* con (FG: 57%, FM: 43%, n: 6,8 dL/g y Mn(kDa) de 84,4) obtuvieron valores de deformación crítica cercanos al 3% y de G' entre 15000 y 30000 Pa, mientras que para los geles provenientes de *Lessonia migrescens* con (FG: 40%, FM: 60%, n: 5,6 dL/g y Mn(kDa) de 68,9) se obtuvo un valor de deformación crítica superior al 10%, pero el módulo elástico se redujo de 5000 Pa.

(Liu *et al.*, 2003) Liu *et al.* (2003) realizaron ensayos de barrido de deformación para 4 tipos de alginato, con diferentes pesos moleculares y composición (bloques G y M). Emplearon una concentración de alginato 3%p/v y encontraron que a medida que aumenta la concentración de Ca⁺⁺, se incrementa el carácter elástico del gel formado. Empleando el alginato rotulado con el nombre MHGH-1 obtuvieron los geles con las mejores características elásticas, alcanzando valores para el G' hasta de 600 Pa.

Yuguchi *et al.* (2000) emplearon una solución de alginato de sodio (1% p/v) de alto contenido de bloques G proveniente de *Laminario hyperborea* y Ca-EDTA (10 mM) para obtener geles con valores de G' cercanos a los 5000Pa.

Stokke *et al.* (2000) encontraron que G' es dos órdenes superior a G'' . Ellos comparan los valores obtenidos luego de la gelificación instantánea y transcurridas 24 horas y encontraron un aumento considerable en la magnitud del módulo elástico, pasando de valores iniciales de G' de 2,53 Pa y alcanzando valores de 6120 Pa después de las 24 horas. (Stokke *et al.*, 2000)

2.6 Materiales y métodos

2.6.1 Plasma sanguíneo humano (PH)

Para realizar todos los experimentos de esta investigación se emplearon 5 unidades de PH tipo O+ (170-200 mL aprox./unidad), las cuales fueron suministradas por el Hemocentro Distrital de Bogotá (Colombia); en dicho Hemocentro se realizan análisis contra HIV, hepatitis B y C, *Tripanosoma cruzi*, HTLV tipo I y II y *Treponema pallidum*, con resultados negativos. Las unidades fueron transferidas desde el Hemocentro (en donde se mantienen almacenadas a -70°C) hasta el laboratorio en una nevera que se mantuvo a -20°C . Al llegar al laboratorio, las unidades fueron descongeladas sumergiendo las bolsas en un baño termostático a 37°C . Una vez descongeladas, se revisó cada unidad y se descartaron aquellas que presentasen cualquier signo de material precipitado. El contenido de todas las unidades restantes se mezcló en condiciones estériles para formar un lote homogéneo, de manera que, cualquier variación de los resultados por efecto de diferencias en las características del PH pudiese ser descartada. El lote fue dividido en alícuotas de 25 mL, las cuales fueron almacenadas en tubos Falcon transparentes de 50 mL y congeladas a -20°C hasta su uso. Los tubos fueron cubiertos exteriormente con Parafilm® M (Structure Probe, Inc., West Chester, USA) para reducir los riesgos de contaminación.

2.6.2 Plasma sanguíneo humano crioconcentrado (PHCC)

Para realizar todos los experimentos de esta investigación se emplearon 50 unidades de PHCC (17-20 mL aprox./unidad), las cuales fueron suministradas por el Hemocentro Distrital de Bogotá (Colombia). Al igual que el PH, las unidades de PHCC se encontraban almacenadas a -70°C . Se siguió el mismo protocolo de descongelación, creación de un lote homogéneo y almacenamiento usado para el PH.

2.6.3 Alginato de sodio 3% p/v.

Se disolvieron 31,02 gramos de alginato de sodio con una humedad del 3,3% p/p (Sigma-Aldrich A2033, Saint Louis MO, USA) en 700 mL de agua destilada. La mezcla se sometió a agitación magnética y a calentamiento (50°C) durante 12 horas, para favorecer la disolución del alginato

de sodio. Transcurrido este tiempo se dejó la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas y luego se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada en un matraz aforado para obtener una solución de alginato de sodio 3,0 % p/v. Dicha solución fue sometida a un proceso de esterilización por calor empleando un autoclave a 15 psig (25,8 psia) durante 30 minutos, con el doble objetivo de evitar que una posible degradación microbiológica cambiase las condiciones reológicas, y que el mismo proceso de esterilización, que sería necesario en etapas posteriores de la formación de equivalentes tisulares, alterase las características reológicas de la solución. La solución de alginato se mantuvo refrigerada a 4 °C y se descartó luego de un mes de preparada.

2.6.4 Soluciones de CaCl_2 a diferentes concentraciones

Se prepararon 3 soluciones de CaCl_2 (1%, 2% y 3% p/v) mediante adición de 13,25 g, 26,50 g y 39,74 g, respectivamente, de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba Reagents Ref: 433381, Rodano, France) en 700 mL agua destilada, agitando con una varilla de vidrio hasta completa disolución; una vez disuelto el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, la solución se llevó a un matraz aforado de 1000 mL y se completó a volumen con agua destilada, para dar lugar a soluciones de Ca^{+2} de 90, 180 y 270 mM, respectivamente.

2.6.5 Evaluación rápida de las condiciones de la formación de gel

Debido a la necesidad de acotar las condiciones para los ensayos de reología dinámica y a que no se tenía una idea clara de las condiciones en que se formarían geles, se decidió hacer establecer una prueba rápida basada en una determinación visual cualitativa en la que se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio en la formación de geles en mezclas con PH y PHCC. En la **Tabla 2-2** se presenta una matriz de los ensayos de los cinco tipos de mezclas evaluadas para la formación de gel mediante intercambio iónico del CaCl_2 con los diferentes agentes gelantes (PH, PHCC, alginato de sodio).

Los experimentos se realizaron en cajas plásticas de 24 pozos de fondo plano (Falcon® 353047, BD Biosciences, San José, CA, USA), cada uno de los cuales tiene una capacidad de 1,9 mL. Usando una micropipeta, se dispuso en cada pozo el volumen apropiado de la solución de alginato de sodio al 3% (descrita en la sección 2.6.3) y luego se completó hasta un volumen de 1 mL con PH, PHCC o agua destilada de acuerdo con lo señalado en la **Tabla 2-2**, mezclando apropiadamente por aspiraciones sucesivas con la micropipeta; finalmente se adicionó 0,5 mL del agente entrecruzante apropiado (soluciones de CaCl_2 descritas en la sección 2.6.4) y se dejaron las cajas en reposo en una incubadora a 37°C. Se evaluó la existencia de gel por inspección visual transcurridos 30 minutos luego de la adición del agente entrecruzante.

Tabla 2-2: Matriz de ensayos para determinar la formación de gel.

Ruta	Agente entrecruzante	Volumen agente entrecruzante	Agente gelante	Volumen de agente gelante	Volumen de Solución de Alginato de Na al 3,0 % p/v	Concentración final de Alginato de Na en el agente gelante
1 PH	CaCl ₂ [1, 2, 3% p/v]	500 µL	PH	1000 µL	0	0
2 PHCC	CaCl ₂ [1, 2, 3% p/v]	500 µL	PHCC	1000 µL	0	0
3 Alginato de Na (Control)	CaCl ₂ [1, 2, 3% p/v]	500 µL	Agua destilada	967 µL	33 µL	0,1%
				934 µL	66 µL	0,2%
				867 µL	133 µL	0,4%
				733 µL	267 µL	0,8%
				600 µL	400 µL	1,2%
				467 µL	533 µL	1,6%
4 PH + Alginato de Na	CaCl ₂ [1, 2, 3% p/v]	500 µL	PH	967 µL	33 µL	0,1%
				934 µL	66 µL	0,2%
				867 µL	133 µL	0,4%
				733 µL	267 µL	0,8%
				600 µL	400 µL	1,2%
				467 µL	533 µL	1,6%
5 PHCC+ Alginato de Na	CaCl ₂ [1, 2, 3% p/v]	500 µL	PHCC	967 µL	33 µL	0,1%
				934 µL	66 µL	0,2%
				867 µL	133 µL	0,4%
				733 µL	267 µL	0,8%
				600 µL	400 µL	1,2%
				467 µL	533 µL	1,6%

2.6.6 Evaluación de las propiedades mecánicas mediante reología dinámica

Se llevaron a cabo ensayos de reología dinámica de una serie de películas de gel en un reómetro Bohlin Instruments CVOR-200 (Malvern Instruments Ltd., England, UK) empleando una geometría de placas planas paralelas de diámetro 25 mm de superficie lisa (ver **Figura 2-12**). Todos los ensayos se realizaron a una temperatura constante de $37,0 \pm 0,1$ °C, la cual se controló con un sistema *Peltier* ubicado en el plato inferior (ver **Figura 2-11**). Se empleó una trampa de solventes para reducir las pérdidas de agua por evaporación. El espesor de las muestras de película de gel varió entre 500-1500µm. Inicialmente se llevaron a cabo ensayos de barrido de deformación (*amplitude sweep*) a una frecuencia de 1 Hz, con el fin de determinar la máxima deformación (*strain*) que soportaría el material sin afectar su estructura.

En estos ensayos de barrido de deformación se varió la deformación (*strain*) entre 0,001 y 10 (0,1 % y 1000%). Una vez determinada la región viscoelástica lineal (VLR), se realizaron ensayos de barrido de frecuencia (*frequency sweep*), variando la frecuencia entre 0,1 y 10 Hz, manteniendo constante la deformación en 0,005 (0,5%) para todas las condiciones, excepto para los experimentos de la ruta 5 (PHCC solo), en donde se empleó una deformación el 1%. La

temperatura se mantuvo constante a 37°C y se registraron como variables de respuesta el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'').

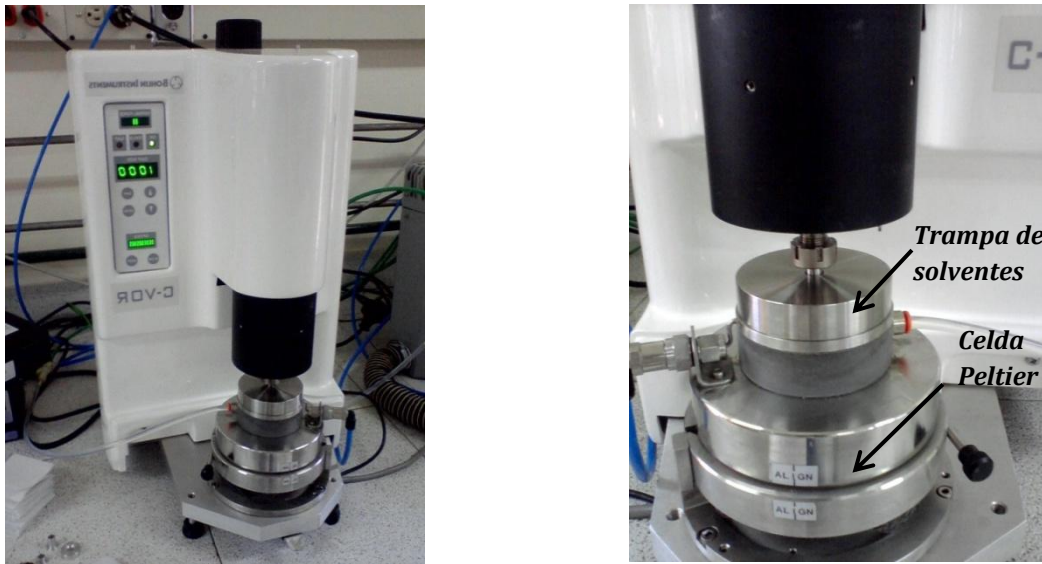


Figura 2-11: Reómetro y detalle de la trampa de solventes y el sistema Peltier

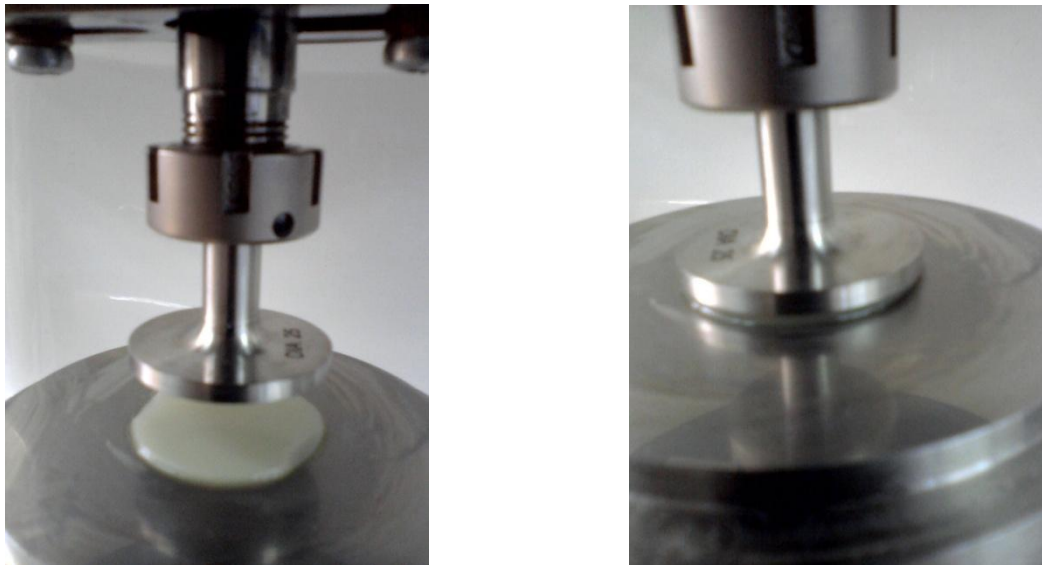


Figura 2-12: Geometría de placas planas paralelas y ubicación de la película de gel.

Para la elaboración de las películas de gel se emplearon cajas Petri medianas de vidrio (Diámetro interno \varnothing_{int} : 9,5 cm). A cada una de ellas se le adicionaron 10 mL de cada una de las mezclas a evaluar que se señalan en la **Tabla 2-2**, excepto la de PHCC sin alginato. Posteriormente se hizo aspersion de la solución de CaCl_2 a la concentración deseada usando una botella plástica con boquilla aspersora manual; la presencia de alginato causó la formación inmediata de un gel. Se continuó la aspersion de CaCl_2 hasta que la solución cubrió por completo el gel formado.

Entonces a las cajas de Petri se les colocó la tapa y se permitió el reposo de los geles formados durante 24 horas en la incubadora a 37 °C.

Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de solución de calcio y se troquelaron los geles empleando un molde como el que se ilustra en la **Figura 2-13** con un diámetro interno de 25 mm que corresponde al diámetro del dispositivo de platos paralelos empleado en las mediciones con el reómetro. Los geles troquelados se transfirieron rápidamente al dispositivo de platos paralelos, se removió el exceso de humedad de los geles moldeados empleando un papel filtro y se dio inicio a las mediciones.



Figura 2-13: Molde para troquelar los geles

En el caso de los geles de PHCC, éstos se formaron directamente en el reómetro siguiendo la metodología descrita por Eyrich *et.al.* (2007). Para ello, se mezclaron 2 mL de PHCC con 200 μ L de CaCl_2 a la concentración deseada, se permitió el descenso del émbolo, se retiró el exceso de la solución con una espátula (debido a su viscosidad) y se permitió la formación del gel durante 30 minutos a 37 °C, empleando la trampa para solvente para evitar la evaporación, antes de dar inicio a los ensayos de reología dinámica.

2.6.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Los valores obtenidos se promediaron y se calculó la desviación estándar.

2.7 Resultados y discusión

2.7.1 Evaluación rápida de las condiciones de la formación de gel

La **Figura 2-14** muestra los resultados de formación de gel para las rutas 1 y 4 indicadas en la **Tabla 2-2**, es decir para PH y para mezclas de PH con alginato de sodio; los resultados se resumen en la **Tabla 2-3**; el signo positivo (+) indica que visualmente se evidenció la formación de

gel. Como se aprecia en dicha Tabla, en las condiciones del experimento el PH sólo formó gel en presencia de alginato; sin alginato, el PH a las tres concentraciones de calcio forma una masa grumosa no homogénea que no se catalogó como gel y que se puede apreciar en la **Figura 2-15**. Como dato interesante, las mezclas con alginato en cualquier proporción formaron gel en forma instantánea una vez se adicionó el calcio. Para concentraciones de alginato inferiores o iguales a 0,4% p/v los geles se deforman con facilidad, impidiendo su manipulación. Este comportamiento fue similar al del alginato diluido con agua destilada para concentraciones similares (**Tabla 2-3**).

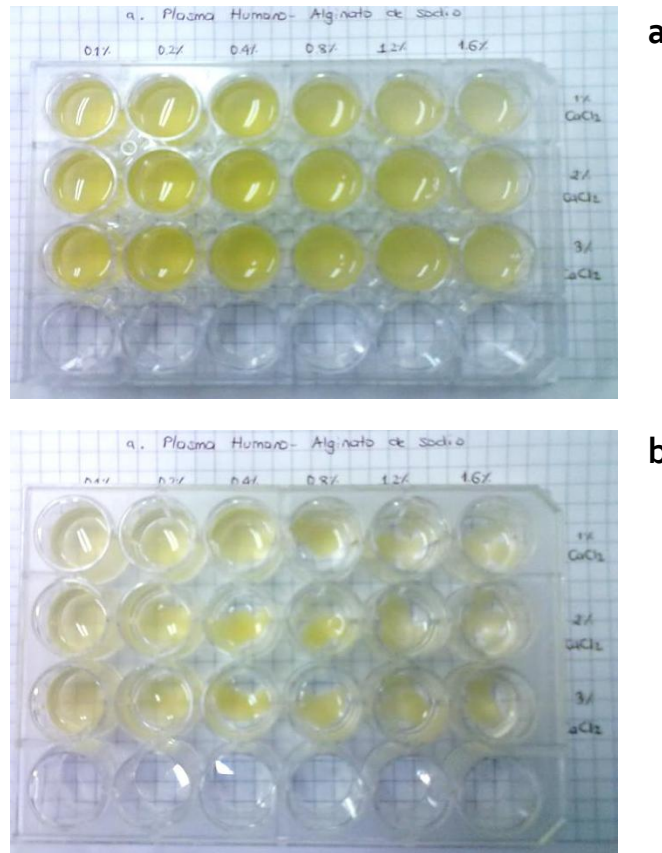


Figura 2-14: Formación de los geles de PH y alginato
 Registro fotográfico de la formación de geles en mezclas de plasma humano (PH) y alginato de sodio a diferentes concentraciones de cloruro de calcio. **(a)** Antes de la adición de CaCl_2 **(b)** Treinta minutos después de la adición de CaCl_2 a 37°C .

Tabla 2-3: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con PH

Concentración CaCl_2 en el agente entrecruzante (%p/v)	Concentración de alginato de sodio en el Plasma Sanguíneo Humano (PH) (%p/v)						
	Ruta 1	Ruta 4					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6
1	-	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	+



Figura 2-15: Estructura grumosa del PH a concentraciones de calcio de 3% p/v.

Los resultados para el PHCC y para mezclas de PHCC – alginato de sodio se aprecian en la **Figura 2-16** y se resumen en la **Tabla 2-4**, allí se puede observar que el PHCC formó gel en todas las condiciones evaluadas (con y sin alginato). A diferencia del PH, la formación del gel cuando las concentraciones de alginato fueron inferiores a 0,6% p/v no fue instantánea, sino que se requirió un tiempo adicional (~10 minutos) en la incubadora a 37°C.

Tabla 2-4: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con PHCC

Concentración en el agente entrecruzante CaCl ₂ (%p/v)	Concentración final de alginato de sodio en la dilución con Plasma Sanguíneo Humano Crioconcentrado (PHCC) (%p/v)						
	Ruta 2	Ruta 5					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+

Con respecto al alginato de sodio, se encontró que éste forma geles con el CaCl₂ para todas las concentraciones evaluadas, como se aprecia en la **Tabla 2-5**. Se encontró que concentraciones de alginato inferiores a 0,4% p/v producen geles difíciles de manipular en todas las condiciones evaluadas. Cuando la concentración de alginato supera el 0,8% p/v se obtiene un gel más resistente; lo mismo ocurre al aumentar la concentración de CaCl₂.

De otra parte, cuando no se emplea alginato las diluciones con agua destilada y PH no forman gel, sin embargo el PHCC sí forma un gel resistente y manipulable, comparable con el que se forma sólo con alginato a concentraciones superiores al 1% p/v.

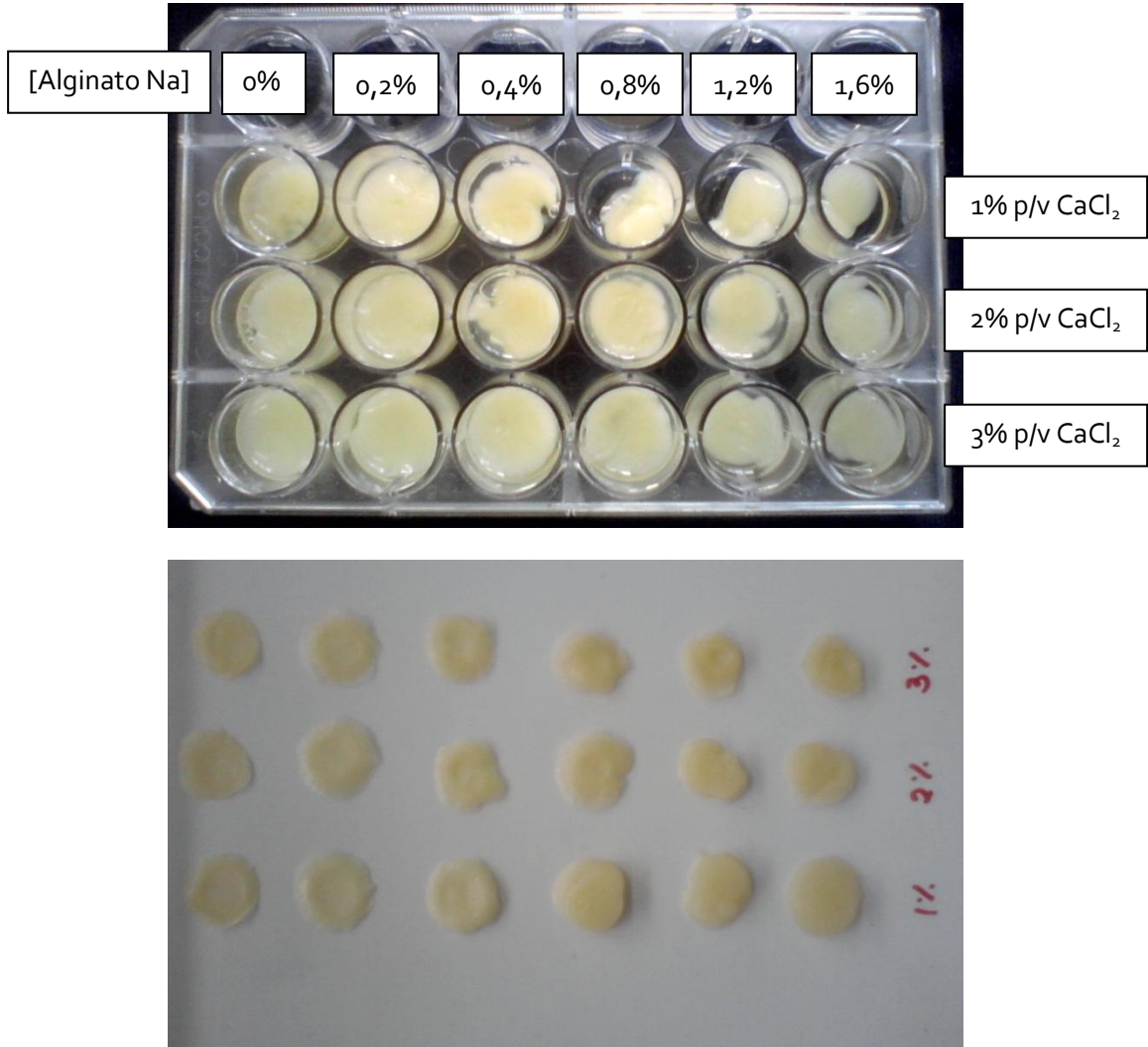


Figura 2-16: Registro fotográfico de la formación de geles de PHCC y alginato. Geles formados a partir de mezclas de plasma humano crioconcentrado (PHCC) y alginato de sodio, treinta minutos después de la adición de CaCl_2 a 37°C .

Tabla 2-5: Evaluación de la formación de gel del alginato de sodio al 3% diluido con agua destilada

Concentración CaCl_2 (%p/v)	Concentración final de alginato de sodio en la dilución con agua destilada (%p/v)						
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6
1	-	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	+

Los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de formación de gel indican que, para la metodología de formación de geles planteada, es necesario utilizar concentraciones de alginato superiores al 0,4% p/v para obtener geles con una resistencia mecánica suficiente para su manipulación. Por otro lado, como se discutió previamente, el alginato carece de sitios de adhesión específicos para células de mamífero y, debido a su naturaleza altamente hidrofílica, geles hechos con alginato presentan mínima adsorción de proteínas, lo cual no fomenta la adhesión celular, lo que resulta preocupante si se considera que la formación casi instantánea de geles en mezclas con alginato sugiere que este polisacárido queda en elevadas concentraciones en la superficie, justamente donde estarán las células, puesto que el fibrinógeno en la superficie, al demorarse mucho más tiempo en formar gel, se podrá desplazar hacia el líquido remanente, reduciendo su concentración en la parte externa del gel recién formado.

Como resultado, se decidió omitir geles hechos con elevadas concentraciones de alginato (1,2 y 1,6 %) y, acordemente, evaluar mediante reología dinámica (**Tabla 2-6**) geles fabricados con dos concentraciones de alginato (0,5 y 1 %p/v) y aquellos formados por PHCC sin alginato. En todos los casos se decidió emplear la concentración más alta de CaCl_2 evaluada (3%p/v), ya que los geles parecían tener mayor consistencia a dicha concentración.

Tabla 2-6: Condiciones evaluadas mediante reología dinámica

Concentración de alginato (%p/v)	PHCC	PH	Agua
0	+ (PHCC)	-	-
0,5	+ (PHCC-Alg 0,5% p/v)	+ (PH-Alg 0,5% p/v)	+ (Alginato 0,5% p/v)
1	+ (PHCC-Alg 1,0% p/v)	+ (PH-Alg 1,0% p/v)	+ (Alginato 1,0% p/v)

2.8 Reología dinámica

2.8.1 Pruebas de barrido de deformación

Inicialmente se realizaron ensayos de barrido de deformación a baja frecuencia ($f = 1$ Hz) para todas las condiciones evaluadas, con varios propósitos; uno de ellos fue el de confirmar la formación de estructuras que se comportaran como un material sólido (geles), es decir, estructuras en las que $G' > G''$. Los resultados se presentan en la **Figura 2-17** para geles obtenidos a partir de PHCC y en la **Figura 2-18** para geles obtenidos a partir de PH o de Alginato; efectivamente se observa la formación de geles en todos los casos ensayados. Es de resaltar que en todas las figuras de reología dinámica se presenta únicamente uno de cada cuatro datos para hacer las curvas menos saturadas.

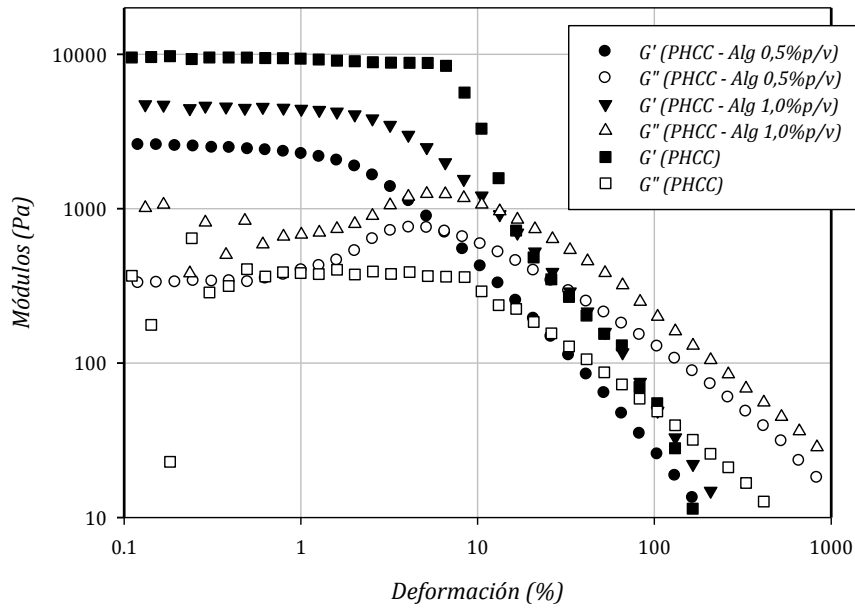


Figura 2-17: Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') como función de la deformación para los geles fabricados con Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) a diferentes concentraciones de alginato de sodio (Alg). $F=1$ Hz. $T=37^{\circ}\text{C}$.

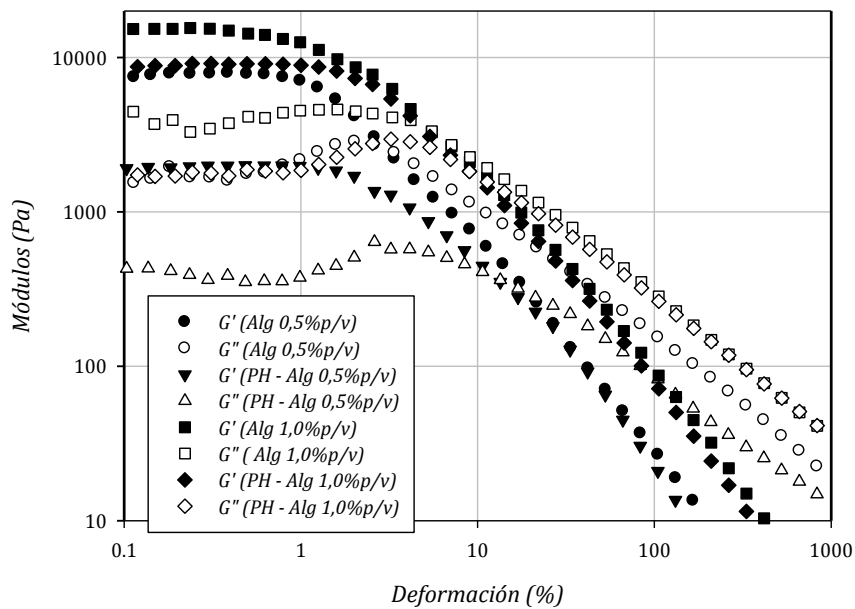


Figura 2-18: Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') como función de la deformación para los geles fabricados con Plasma Humano (PH) y/o alginato de sodio (Alg). $F=1$ Hz. $T=37^{\circ}\text{C}$.

La **Figura 2-19** muestra en detalle el comportamiento del barrido de deformación de uno de los geles presentados en la **Figura 2-18**, correspondiente a PH con alginato al 1% p/v. En dicha figura es posible distinguir 3 regiones claramente diferenciadas: una región de deformación hasta un valor γ_{crit} , denominada la región viscoelástica lineal (VLR por sus siglas en inglés) y mostrada con símbolos de color blanco, en la cual G' y G'' son aproximadamente constantes porque la estructura del gel es capaz de soportar la deformación a la que está sometida; al aumentar la deformación es posible apreciar una región mostrada con símbolos de color negro, en la que el módulo de almacenamiento (G') empieza a disminuir mientras que el módulo de pérdida (G'') empieza simultáneamente a crecer; en esta zona el comportamiento viscoelástico del material se vuelve no lineal probablemente debido a una ruptura de la estructura del gel.

Finalmente, se aprecia una región a partir de una deformación γ_{dest} , mostrada con símbolos de color rojo, en la que los valores de los módulos caen vertiginosamente, aunque de manera mucho más pronunciada para G' que para G'' ; en esta región probablemente se presenta un deslizamiento efectivo entre el disco de gel y las placas del reómetro, por lo que cualquier información derivada de los datos obtenidos en esta zona no corresponderá a ninguna característica efectiva del material.

Como resulta evidente, la determinación de las propiedades del gel debería ser realizada en condiciones que no destruyan la estructura molecular del mismo, lo que equivale a decir que los ensayos deben realizarse en la VLR. No existe, a conocimiento del autor, un protocolo estándar establecido para fijar inequívocamente los valores límites de dicha región; para el caso de la **Figura 2-19** la asignación se realizó de manera visual juzgando subjetivamente los puntos a partir de los cuales el valor de G'' deja de ser constante y empieza a aumentar (γ_{crit}) o a partir del cual empieza a descender (γ_{dest}).

Este método presenta, sin embargo, muchas dificultades: si bien el comportamiento de los demás geles es muy similar al discutido para el gel de PH con alginato al 1% p/v, la determinación de los límites de las tres regiones resulta mucho más compleja en algunos casos como los de PHCC y PHCC + alginato al 1% p/v, en los cuales se presenta un comportamiento errático del módulo de pérdida G'' a deformaciones entre 0,1 y 0,5 %; de otro lado, los geles de Alginato al 1% y PH + alginato al 0,5% p/v, aunque no presentaron un comportamiento errático del módulo de pérdida G'' a bajas deformaciones, sí presentan un descenso leve en el valor de G'' a frecuencias bajas que dificulta establecer con precisión la zona de viscoelasticidad lineal aparente.

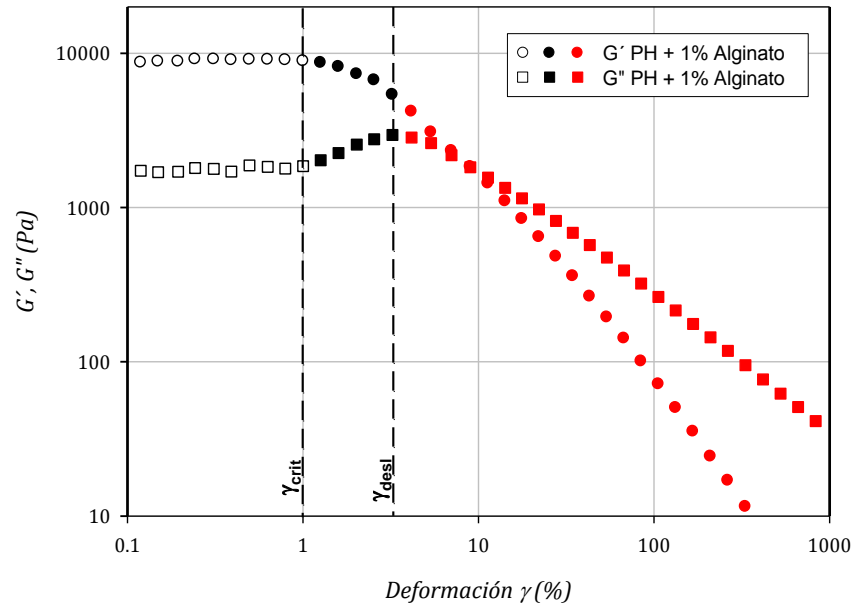


Figura 2-19: Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') como función de la deformación para geles fabricados con mezclas de Plasma Humano (PH) y alginato de sodio al 1% p/v. $F=1$ Hz. $T=37^{\circ}\text{C}$.

Para determinar el valor de γ_{crit} de pastas gelatinizadas de almidón de maíz, (Navarro *et al.*, 1997) utilizan un método que consiste en determinar el valor máximo del módulo complejo (G^*), ya que en dicho material el módulo complejo aumenta ligeramente con la deformación, alcanza un máximo y luego vuelve a disminuir; dichos autores usaron la deformación asociada con el valor máximo del módulo complejo como el límite superior de la VLR.

La **Figura 2-20** muestra el módulo complejo $G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$ para todos los geles preparados en este trabajo. Como se puede apreciar en la parte B de dicha Figura, que corresponde a una versión ampliada de la zona de bajas deformaciones, aunque hay geles que sí presentan un máximo del módulo complejo, como es el caso del gel de alginato al 0,5 % p/v, la mayoría no presentan dicho máximo, como por ejemplo el gel de PHCC + 0,5% p/v de alginato, por lo que la metodología planteada por Navarro *et al.* (1997) no resulta de utilidad en este caso.

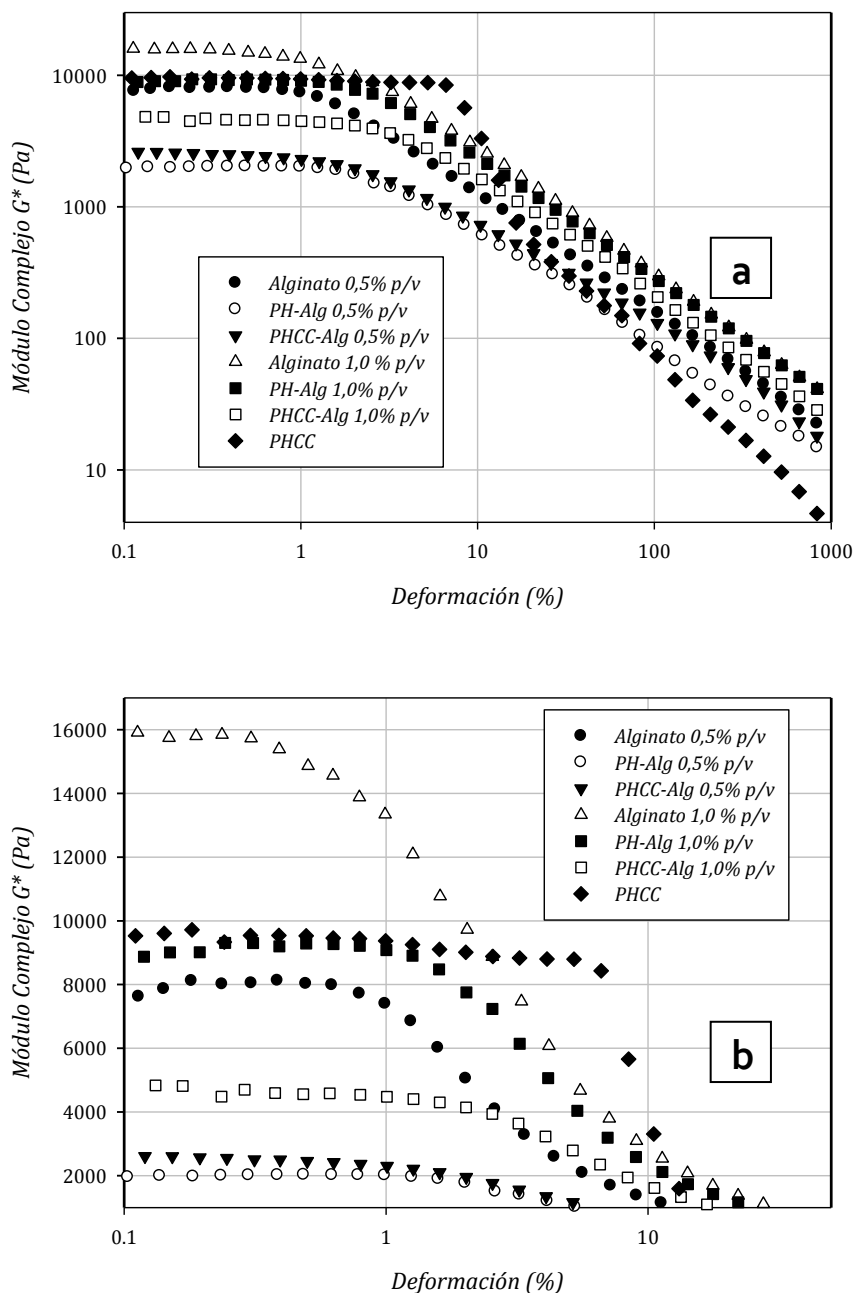


Figura 2-20: (a) Evolución del módulo complejo (G^*) como función de la deformación para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg). (b) Ampliación de la escala para la región de baja deformación. $F=1$ Hz. $T=37^\circ\text{C}$.

Moresi *et.al.* (2001) usaron un método diferente para determinar el límite superior de deformación de la región VLR para geles de alginato: ellos hicieron el barrido de deformación a tres muestras del mismo material; partiendo del valor más pequeño de deformación del barrido

(0,2%), calcularon el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta = G'/G''$) de las tres réplicas; en seguida, tomaron los tres valores de $\tan\delta$ medidos para el valor de deformación inmediatamente superior a 0,2% y los procesaron con los anteriores, calculando un nuevo valor del coeficiente de variación para los seis datos; el proceso se repite nuevamente para el siguiente valor de la deformación, calculándose el CV con un número de datos cada vez mayor hasta considerar todos los datos en el barrido.

Como se supone que en la VLR el valor de G' y G'' se mantiene aproximadamente constante, el valor de $\tan\delta$ también ha de mantenerse constante, por lo que el valor del CV debe mantenerse en un valor bajo. Después de superar el límite de deformación crítico, la estructura del gel empieza a afectarse, por lo que el valor de G' se reduce y el valor de G'' aumenta, haciendo que el valor de $\tan\delta$ empiece a aumentar, por lo que al agregar un nuevo dato, el CV empieza a alterarse, aumentando. Moresi *et al.* (2001) (Moresi *et al.*, 2001) graficaron el CV como función de la deformación y asignaron un valor arbitrario de 3%, de manera que el límite superior de la VLR se determinó cuando $CV > 3\%$.

El principal problema con la metodología de Moresi *et al.* (2001) es que el CV asignado para la selección del γ_{crit} es arbitrario. En el presente trabajo se propone una metodología similar que tiene la ventaja de no necesitar ningún valor arbitrario. La **Figura 2-21** presenta el comportamiento de la tangente del ángulo de fase para todos los geles evaluados en la presente investigación. En dicha Figura se puede apreciar que, a pesar de tener algunas excursiones más o menos grandes a valores de deformación inferiores a 0,5%, la $\tan\delta$ llega a un valor aproximadamente constante que se mantiene por un cierto intervalo de deformación y luego empieza a aumentar; aunque en algunos casos (como el de PHCC) es evidente el punto a partir del cual hay un incremento y, por tanto, es muy fácil definir γ_{crit} , en la mayoría de los casos el incremento es muy gradual, por lo que definir el γ_{crit} resulta difícil.

Para definir γ_{crit} con precisión, se siguió exactamente la misma metodología propuesta por Moresi *et al.* (2001) (Moresi *et al.*, 2001), y se graficó CV como función de la deformación (γ), con la única diferencia que el inicio del intervalo de deformación era más pequeño (0,1%). La **Figura 2-22** muestra el comportamiento de la $\tan\delta$ y del CV para el gel de PH con 0,5% de alginato de sodio. El comportamiento de las dos variables es similar, pero hay dos grandes diferencias que se notan mejor en el recuadro en la parte superior izquierda de la misma figura; en primer lugar, al incluir todos los datos (y no solo de 4 en 4 datos como en la **Figura 2-21**), se puede apreciar una mayor dispersión de los datos de la $\tan\delta$, dispersión que se reduce enormemente en CV, que luce mucho más parecida a una función continua. La otra diferencia es que el CV presenta un mínimo claramente identificable (señalado por la flecha roja en la **Figura 2-22**) que no se aprecia tan fácilmente en la función de la $\tan\delta$. La razón del mínimo es inherente a la definición del CV y al comportamiento de la $\tan\delta$ en la zona VLR: Si se asume que en tal región los valores de G' y G'' son aproximadamente constantes, entonces la $\tan\delta = G''/G'$ también es aproximadamente constante en la misma región; si ello sucede, el valor promedio incremental de todos los datos de la $\tan\delta$ a medida que se avanza en la deformación es un valor casi constante, por lo que la

desviación estándar tiende a reducirse al aumentar el tamaño de la muestra. Ello implica que al reducirse la desviación estándar y mantenerse constante el promedio, el CV tiende a reducirse. Sin embargo, al salir de la región VLR, el valor de G' disminuye y el valor de G'' aumenta, por lo que la $\tan\delta$ aumenta. Esto hace que al avanzar a valores de deformación superiores, el promedio ya no se mantiene constante y la desviación estándar se incrementa muy rápidamente, lo que hace que el CV crezca. Este comportamiento del CV (primero reducirse y luego aumentar) crea necesariamente un mínimo que se considerará en este trabajo como el valor límite superior de la deformación que define la VLR (γ_{crit}).

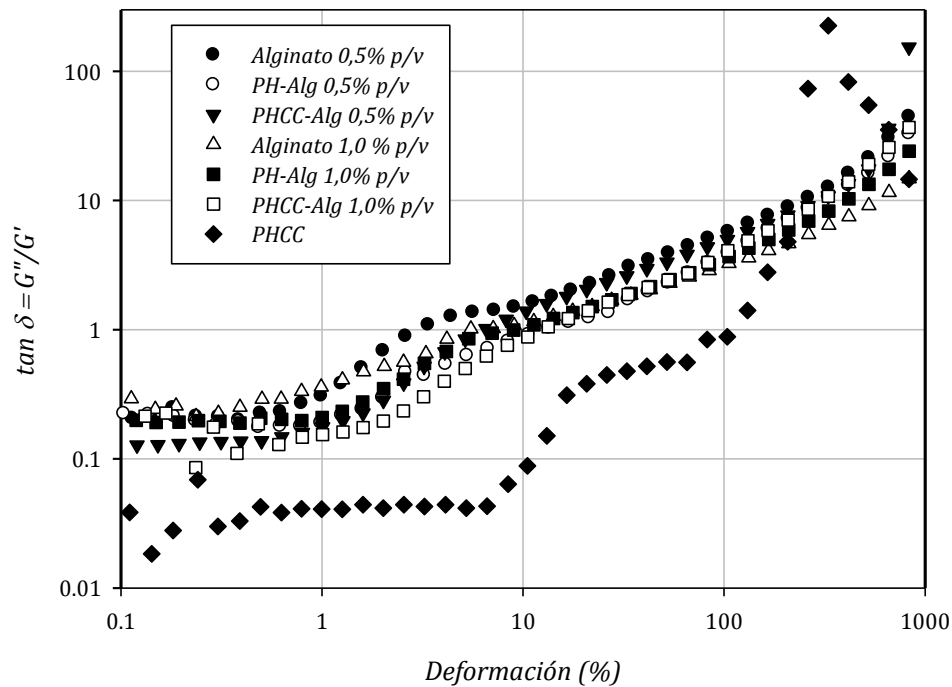


Figura 2-21: (a) Comportamiento de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) como función de la deformación para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg). (b) Ampliación de la escala para la región de baja deformación. $F=1$ Hz. $T=37^\circ\text{C}$.

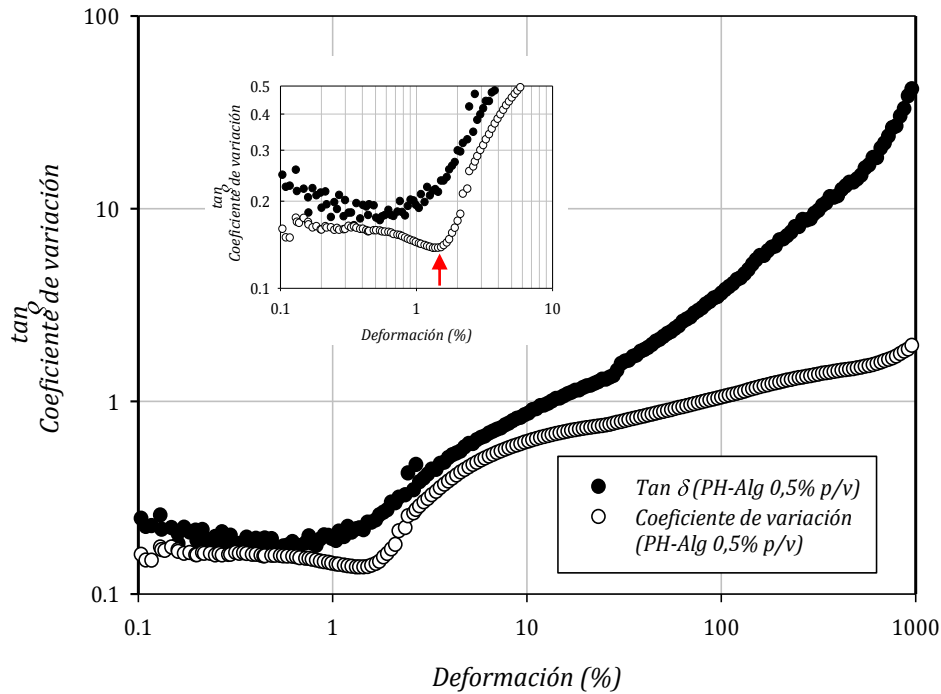


Figura 2-22: Comportamiento de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) y del CV como función de la deformación para el gel fabricado con Plasma Humano (PH) y alginato de sodio al 0,5% (Alg).

La **Tabla 2-7** presenta los valores correspondientes al límite superior de la zona VLR para todos los geles evaluados en el presente trabajo, determinados con la metodología previamente descrita. El valor de $\overline{\tan\delta}$ corresponde al valor promedio de la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) para el intervalo de porcentajes de deformación desde 0,1% hasta γ_{crit} .

El porcentaje de deformación crítica indica el fin de la región viscoelástica lineal; por tanto, en los ensayos de barrido de frecuencia se deben usar deformaciones inferiores a γ_{crit} , para asegurar que el esfuerzo aplicado sea linealmente proporcional a la deformación; con base en estos resultados se seleccionó una deformación de 0,005 (0,5%) para llevar a cabo los ensayos de barrido de frecuencia de todas las muestras, de tal forma que todas las mediciones fueran realizadas en la región viscoelástica lineal y se empleara en todos los casos la misma deformación; la única excepción fue el PHCC, para el cual se usó una deformación del 1% debido a que su γ_{crit} resultó mucho más elevado que en los demás casos.

En la **Tabla 2-7** se observa que la presencia de PH o PHCC en la mezcla incide en el porcentaje de deformación crítica, aumentando su valor respecto al correspondiente a las mezclas de alginato diluidas en agua destilada con la misma concentración. Un fenómeno similar se aprecia en el valor del módulo complejo: al incrementar la concentración de alginato se observa un incremento en G^* ; sin embargo, el módulo complejo es mucho más alto en la solución de

alginato puro en agua destilada que en solución del alginato con PH o PHCC, lo cual indica una interferencia destructiva entre los dos agentes gelantes.

Tabla 2-7: Valores característicos del punto crítico para todos los geles fabricados con Plasma Humano (PH), Plasma Humano Crioconcentrado (PHCC) y/o alginato de sodio (Alg).

Material	γ_{crit} (%)	G^*_{crit} (Pa)	Ángulo de fase (δ_{crit})	$\tan \delta_{crit}$	$\overline{\tan \delta}$	Referencia
Alginato 0,5% p/v	0,5398	8067	12,7	0,225	0,214	Este trabajo
Alginato 1,0% p/v	0,5694	14753	14,5	0,258	0,251	Este trabajo
Alginato 1,0% p/v	0,7	2900±200	3,94±0,34	0,069±0,006	0,069±0,002	Moresi et al., 2001
PH-Alg 0,5% p/v	1,3752	1954	12,2	0,215	0,202	Este trabajo
PH-Alg 1,0% p/v	0,6503	9292	11,1	0,196	0,195	Este trabajo
PHCC-Alg 0,5% p/v	0,5002	2455	7,8	0,138	0,133	Este trabajo
PHCC-Alg 1,0% p/v	2,4280	3983	12,7	0,225	0,164	Este trabajo
PHCC	8,0791	6735	3,1	0,054	0,041	Este trabajo

Si se tienen en cuenta los criterios de Clark & Ross-Murphy (1987), según los cuales los geles formados pueden agruparse como geles débiles si $1 < G'/G'' < 10$ (ó equivalentemente $0,1 < G''/G' = \tan \delta < 1$) o como geles robustos si $G'/G'' > 10$ (ó $\tan \delta < 0,1$), es posible apreciar en la **Tabla 2-7** que todos los geles son débiles pues para todos los casos el valor de $\overline{\tan \delta}$ en la VLR fue mayor que 0,1, excepto para el PHCC, el cual posee el ángulo de fase crítico del PHCC más cercano a cero y por tanto es el que tiene características elásticas más cercanas a las de un sólido ideal comparadas con las de los demás materiales evaluados.

Finalmente, para propósitos de comparación es importante comparar los datos obtenidos en el presente trabajo con los correspondientes a la misma referencia de alginato evaluada por Moresi *et.al.* (2001). La **Tabla 2-7** muestra que aunque el gel de alginato al 1% tiene una VLR ligeramente más amplia (γ_{crit} pasa de 0,57 a 0,7), hay una diferencia significativa en el módulo complejo y en el ángulo de fase: el gel obtenido por Moresi *et.al.* (2001) es mucho más parecido a un sólido elástico ideal que el obtenido en el presente trabajo, pero tiene un valor del módulo complejo mucho menor (2900 Pa vs 14700 Pa); esta diferencia puede deberse, probablemente, a que el método de formación del gel fue muy diferente: mientras que Moresi *et.al.* (2001) formaron el gel de manera lenta por liberación controlada del calcio cambiando pH, lo cual garantiza una distribución homogénea de dicho ión divalente, en el presente trabajo se estableció un método de formación instantánea del gel por aspersion de calcio, lo cual pudo dar lugar a una estratificación de la concentración del gel, haciéndolo mucho menos homogéneo; el bajo ángulo de fase del PHCC parece soportar esta hipótesis, pues el PHCC se demora mucho más tiempo en formar el gel, por lo que la homogeneidad de la concentración de calcio en solución es fácil de garantizar. De otro lado, resulta difícil evaluar si la solución de cloruro de

calcio asperjada pudo entrar a “diluir” las capas exteriores de la solución de alginato antes de formarse el gel, lo que equivaldría a una concentración efectiva del alginato diferente a la formulada en la solución original antes de asperjar. Resultaría interesante evaluar este efecto cambiando el método de entrega del calcio en futuros trabajos.

2.8.2 Pruebas de barrido de frecuencia

Una de las hipótesis centrales de la presente investigación se relaciona con el mejoramiento de las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma humano (PH) a través dos rutas. La primera de ellas consiste en la mezcla de PH con alginato de sodio, que forma gel mediante intercambio iónico con Ca^{++} y posee mejores propiedades mecánicas que los geles elaborados solo con PH. Un acercamiento similar fue llevado a cabo por Ionescu *et.al.* (2011), quienes realizaron ensayos de reología dinámica para fibrina proveniente de plasma humano y mezclas de éste con agarosa y obtuvieron valores del módulo elástico del orden de 35 Pa que decreció a medida que aumentó la frecuencia hasta 10 Pa y de G'' desde 5 hasta 10 Pa, prevaleciendo al final el módulo viscoso sobre el elástico para una mezcla de fibrina agarosa al 0,025% de ésta última. Akpalo *et.al.* (2011) también mejoraron la resistencia mecánica de geles de fibrina, mediante la formación de una red polimérica con óxidos de polietileno, encontrando en todos los casos un aumento de las propiedades mecánicas con el aumento de la concentración de fibrina (5 a 20% p/p), con valores del módulo elástico que van desde 1000 hasta 4000 Pa.

Se siguió la metodología empleada por Llames *et.al.* (2011) para la formación de geles de PH, sin embargo se obtuvo una solución grumosa como la presentada en la **Figura 2-15**. Con el fin de aprovechar los componentes del PH para favorecer la adhesión celular, se realizaron mezclas de éste con alginato de sodio y se evaluaron las propiedades mecánicas de los geles obtenidos mediante intercambio iónico con una solución de CaCl_2 al 3% p/v.

En la **Figura 2-23** se presenta el efecto de la adición de alginato de sodio en el comportamiento reológico de los geles obtenidos a partir de las mezclas de éste con PH y se comparan con las de los geles obtenidos a partir de alginato de sodio diluido en agua destilada. Se observan dos efectos particulares. Por un lado, cualitativamente se observó que el aumento de la concentración de alginato de sodio en la mezcla dio lugar a la formación de geles más resistentes y fáciles de manipular. Al contrastar estas observaciones con los valores obtenidos para el módulo de almacenamiento G' (o elástico), se encuentra que en la medida que disminuye la concentración de alginato de 1% al 0,5 % p/v, se observa una reducción del componente elástico del material. Este efecto es similar para las respectivas mezclas con PH, sin embargo, al analizar las magnitudes de los módulos elásticos para los materiales con igual concentración de alginato de sodio en la mezcla final se encuentran diferencias considerables. Es decir, la mezcla con PH reduce el componente elástico de los geles a tal punto que el módulo de almacenamiento para el

PH – Alginato de sodio al 1% es inferior al obtenido para el alginato de sodio al 0,5 % p/v diluido en agua. Cuando la concentración de alginato es menor, el efecto del PH es aún más apreciable. A partir de estas observaciones, es posible considerar que las proteínas presentes en el PH generan interferencia en la formación de la red tridimensional del alginato de sodio, impidiendo el entrecruzamiento iónico con los iones de Ca^{++} .

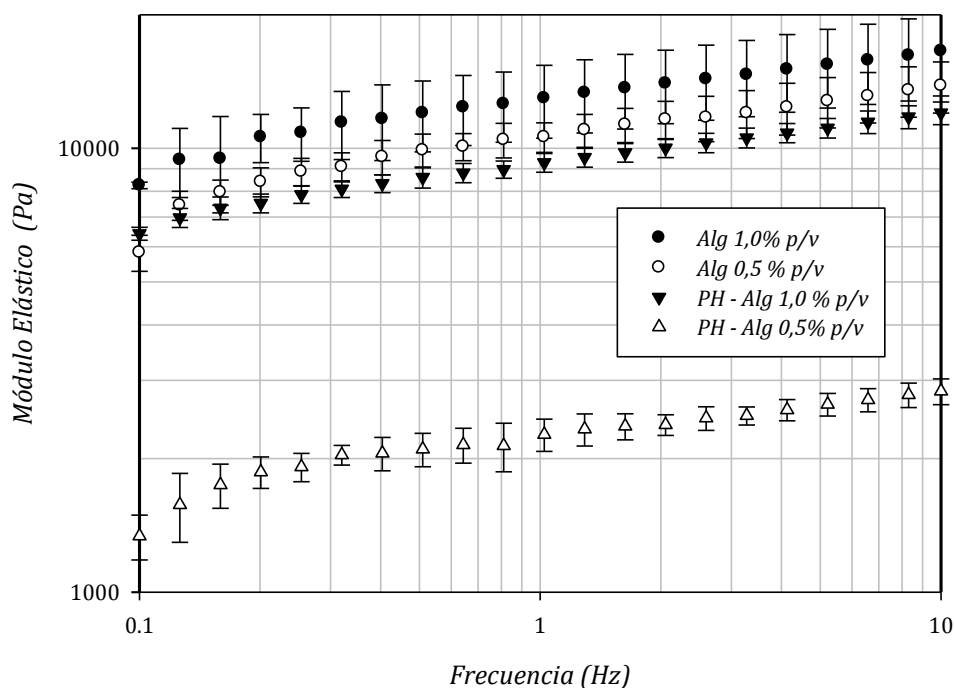


Figura 2-23: Efecto de la adición de alginato en las propiedades mecánicas de los geles formados con PH, empleando una solución de CaCl_2 al 3% p/v.

La segunda ruta considerada para el aumento de las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de plasma humano (PH) es el uso de plasma humano crio concentrado (PHCC) que tiene un contenido hasta 10 veces mayor de fibrinógeno que el del PH convencional. Diversos autores reportan no solo el efecto de la concentración de fibrinógeno en la resistencia de los geles obtenidos mediante la polimerización de este a fibrina, sino que también evalúan el efecto del calcio en el grosor de las fibras, la rigidez y la resistencia mecánica de los geles de fibrina obtenidos a partir de fibrinógeno (Hardy *et al.*, 1983; Weisel, 2004).

Las fibras de fibrina tienen una estructura compleja y son conocidas por contener casi un 80% de agua (Piechocka *et al.*, 2010). Estudios llevados a cabo empleando fibrinógeno purificado concluyen que el aumento de los iones de calcio en presencia de fibrinógeno y trombina, genera un aumento en la fuerza iónica, que se a su vez se traduce en la formación de una estructura de

fibrina más compacta y estable(Hardy *et al.*, 1983; Weisel, 2004). Con el objetivo de evaluar este mismo comportamiento en geles obtenidos a partir de PHCC, cuya concentración de fibrinógeno aproximada fue de $24,3 \text{ mg mL}^{-1}$, se aumentó la concentración de calcio, pasando de una concentración de CaCl_2 de 2% p/v a una de 3% p/v.

Los geles se formaron mezclando 1 mL de PHCC con 100 μL de la solución de CaCl_2 a la concentración deseada (2 o 3% p/v) e incubando a 37°C durante 30 minutos. En la **Figura 2-24** se comparan las propiedades mecánicas de los geles obtenidos con PHCC variando la concentración de CaCl_2 . Se puede apreciar un comportamiento acorde con lo reportado por Hardy (1983), dado que el aumento de la concentración de calcio (Ca^{++}) aumenta las características elásticas del gel, es decir favoreció la formación de una estructura tridimensional más estable.

Estos resultados también son comparables con los presentados por Eyrich *et.al.* (2007), quienes caracterizaron mediante reología dinámica geles de fibrina, obteniendo, para concentraciones de fibrinógeno de 50 mg/mL, valores del módulo elástico entre 3000 y 10000 Pa, y del módulo viscoso entre 80 y 4000 Pa. Así mismo, cuando aumentaron la concentración de calcio obtuvieron geles más rígidos y estables.

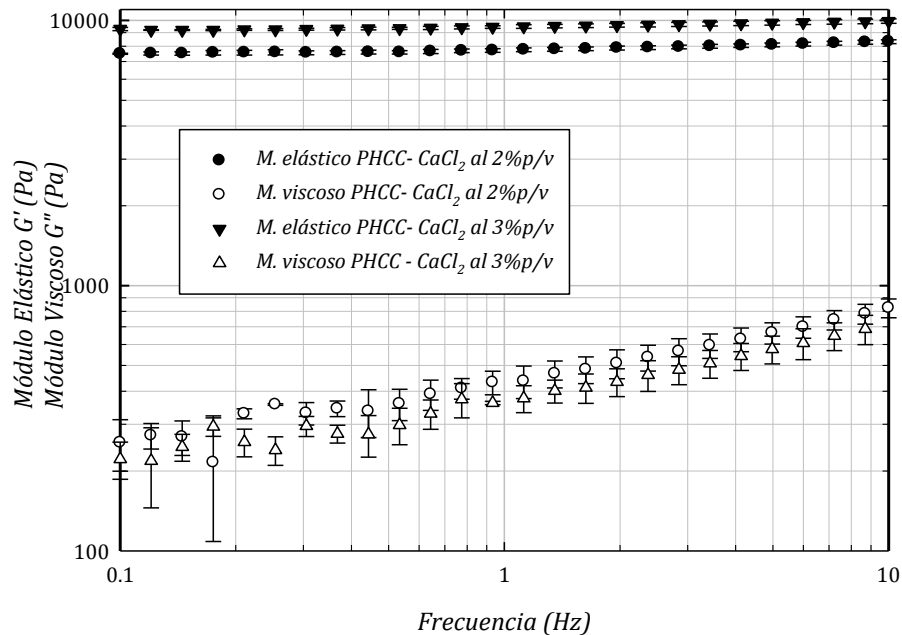


Figura 2-24: Barrido de frecuencia para el PHCC sin alginato variando la concentración de calcio.

En la **Figura 2-24** se observa que el aumento de la concentración de calcio en la mezcla con PHCC no tiene un efecto significativo en el comportamiento reológico de los geles formados. Al comparar el comportamiento reológico de los geles formados solo con PHCC con los obtenidos para el alginato de sodio en agua destilada al 1% p/v (**Figura 2-25**) se encuentra que no hay

diferencia significativa en el módulo de almacenamiento de ambos materiales, es decir, tienen un comportamiento elástico similar, sin embargo, al comparar las magnitudes del módulo viscoso se encuentra que el de menor magnitud es el del PHCC. Si se analiza la relación entre el módulo viscoso y el módulo elástico y se tiene en cuenta el criterio de Clark & Ross-Murphy (1987), se tiene que el gel formado con PHCC es un gel robusto ya que $G'/G'' > 10$, mientras que el formado con alginato de sodio al 1% p/v a pesar de tener magnitudes del módulo elástico muy cercanas o hasta mayores, se agrupa dentro de los geles débiles por tener valores de G'/G'' entre 1 y 10.

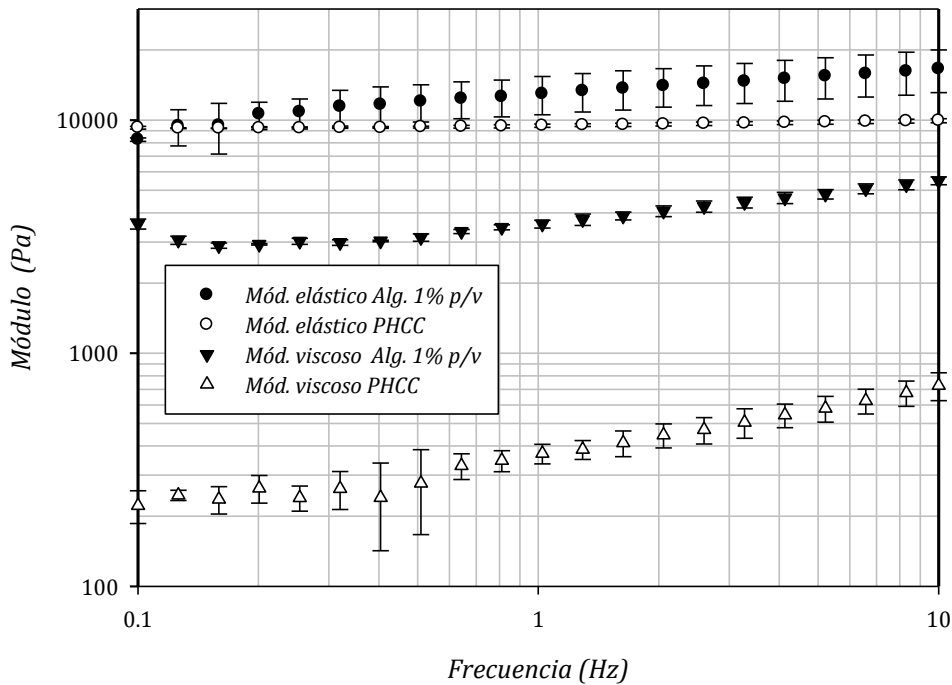


Figura 2-25: Comparación entre el PHCC y el alginato de sodio al 1% p/v

Por lo tanto, desde el punto de vista del mejoramiento de las propiedades mecánicas de los geles de PH contemplado como el aumento del comportamiento elástico del material, se encuentra que este objetivo ha sido alcanzado a través de cualquiera de las dos rutas planteadas: ya sea mezclando con alginato de sodio o aumentando la concentración de fibrinógeno en el PH.

El siguiente objetivo de la presente investigación estaba relacionado con la obtención de microportadores a partir del material con las mejores propiedades mecánicas. Hasta el momento, los resultados desde el punto de vista de la reología dinámica, arrojan que en los geles formados con PHCC prevalece el comportamiento elástico sobre el viscoso, sin embargo, dado que éstos no se forman de manera instantánea, no es posible emplearlo para la elaboración de microportadores usando un sistema de aspersión como el que se describe en el capítulo 3.

Se planteó entonces, evaluar el comportamiento reológico de mezclas de PHCC con alginato de sodio al 0,5% y al 1,0% p/v. Los resultados de esta evaluación se presentan en la **Figura 2-26**. Aunque en principio era de esperarse que la mezcla del PHCC con el alginato de sodio al 1% p/v resultara en un aumento conjunto del comportamiento elástico del material, lo que se observa es el efecto contrario, similar al obtenido con las mezclas de PH y alginato, en donde en lugar de potenciarse las características elásticas de ambos materiales, lo que ocurre es una interposición entre los mecanismos de formación de gel de los mismos.

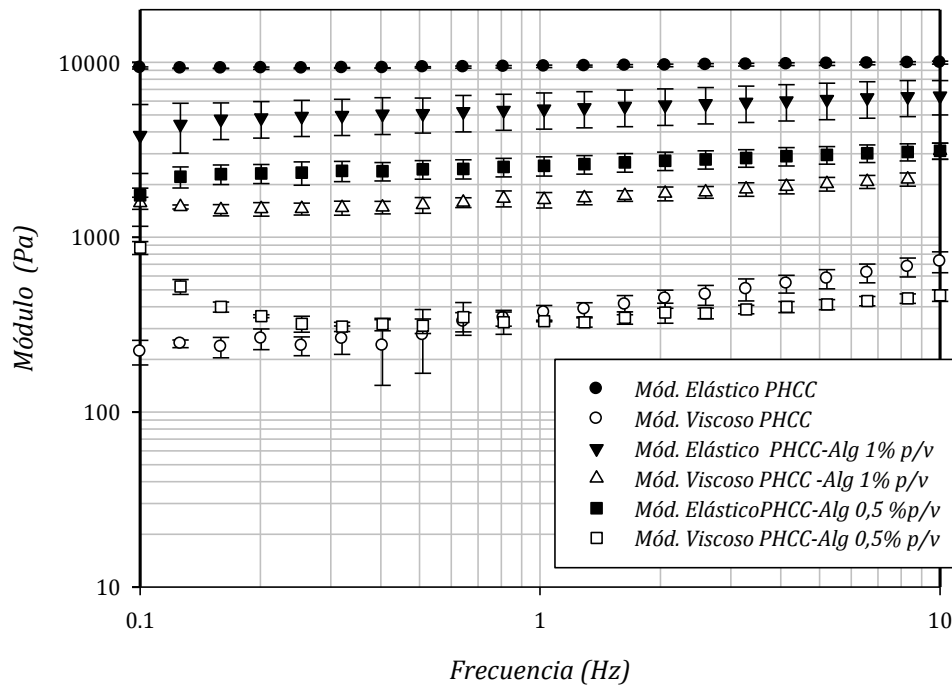


Figura 2-26: Efecto de la adición de alginato en el comportamiento reológico de los geles formados con PHCC empleando una solución de CaCl_2 al 3% p/v.

2.8.3 Comportamiento del ángulo de fase

En la **Figura 2-27** se presenta la variación del ángulo de fase con la frecuencia para las mezclas estudiadas. Para un sólido elástico, la respuesta de la deformación está totalmente en fase con el esfuerzo aplicado (ángulo de fase: 0°), mientras que para un líquido viscoso newtoniano, la deformación resultante total será 90° fuera de fase del esfuerzo aplicado (Nunamaker *et al.*, 2011b). Por lo tanto, los geles formados solo con PHCC se comportan más como sólidos elásticos que aquellos formados a partir de las mezclas con alginato de sodio o las diluciones de éste en agua destilada y PH.

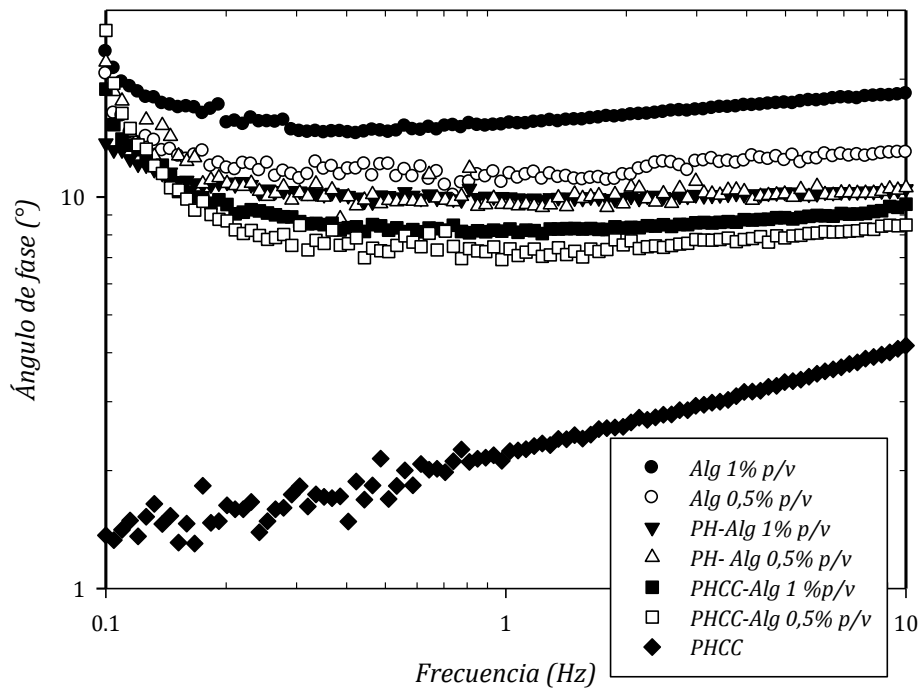


Figura 2-27: Ángulo de fase de los geles formados

Al comparar el comportamiento del alginato respecto a las mezclas, se observa que en todos los casos, un aumento de la concentración de alginato, trae consigo un aumento en el ángulo de fase, es decir, a pesar que la magnitud de los módulos se incrementa, la distancia entre ambos es menor y por tanto se obtienen valores del ángulo de fase más grandes.

Estos resultados están acorde con los obtenidos por Moresi *et.al.* (2004) quienes midieron el ángulo de fase para 4 tipos de alginato con diferentes relaciones de ácido manurónico y gulurónico empleando dos concentraciones diferentes (1 y 1,5 %p/v), y en todos los casos, encontraron que el ángulo de fase se incrementa con el aumento de la concentración de alginato en el gel, es decir se incrementa el carácter viscoso del material. Así mismo, se contrastan con los reportados por Sosa *et.al.* (2012), quienes realizaron ensayos de reología dinámica para geles de alginato de sodio de 0,1 % p/p y obtuvieron valores de G' entre 30 y 60 Pa y de G'' entre 7 y 9 Pa, encontrando para bajas concentraciones de alginato un predominio del módulo elástico sobre el viscoso.

2.9 Conclusiones

Mediante ensayos de reología dinámica se encontró que las dos rutas planteadas para el mejoramiento de los geles obtenidos a partir de plasma humano (PH): mezcla con alginato de sodio y aumento de la concentración del fibrinógeno en el PH, empleando plasma humano crioconcentrado (PHCC), arrojan resultados favorables, siendo el PHCC el material con un comportamiento más cercano al de un sólido elástico.

Se encontró que la mezcla ya sea de PH o PHCC con alginato de sodio interfiere en la formación de la estructura tridimensional del mismo, lo cual se vio reflejado en una disminución de sus propiedades elásticas respecto a los geles obtenidos a las mismas concentraciones de alginato de sodio pero diluido solo en agua destilada.

2.10 Referencias

Akpalo, E.; Bidault, L.; Boissière, M.; Vancaeyzeele, C.; Fichet, O. and Garde, V.L. (2011). Fibrin–polyethylene oxide interpenetrating polymer networks: New self-supported biomaterials combining the properties of both protein gel and synthetic polymer. *Acta Biomaterialia*. **7**(6): 2418-2427.

Amici, E.; Tetradis-Meris, G.; de Torres, C.P. and Jousse, F. (2008). Alginate gelation in microfluidic channels. *Food Hydrocolloids*. **22**(1): 97-104.

Andersen, T.; Strand, B.L.; Formo, K.; Alsberg, E. and Christensen, B. (2012). Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Carbohydrate Chemical*. **37**: 227-258.

Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **28**(9): 409-412.

Borzacchiello, A.; Ambrosio, L.; Netti, P. and Nicolais, L. (2003). Rheology of Biological Fluids and Their Substitutes. Tissue engineering and novel delivery systems. M. J. Yaszemski; D. J. Trantolo; K.-U. Lewandrowski et al. New York. USA: 330-350.

Burnouf, T.; Lee, C.-Y.; Luo, C.-W.; Kuo, Y.-P.; Chou, M.-L.; Wu, Y.-W.; Tseng, Y.-H. and Su, C.-Y. (2012). Human blood-derived fibrin releasates: Composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals*. **40**(1): 21-30.

Clark, A.H. and Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Biopolymers. Advances in polymer science. A. H. Clark; K. Kamide; S. B. Ross-Murphy and M. Saito. New York, USA, Springer-Verlag. **83**: 57-192.

Choudhary, S. and Bhatia, S.R. (2012). Rheology and nanostructure of hydrophobically modified alginate (HMA) gels and solutions. *Carbohydrate Polymers*. **87**(1): 524-530.

Enoch, S. and Leaper, D.J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **26**(2): 31-37.

Eyrich, D.; Brandl, F.; Appel, B.; Wiese, H.; Maier, G.; Wenzel, M.; Staudenmaier, R.; Goepferich, A. and Blunk, T. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*. **28**(1): 55-65.

Falvo, M.R.; Gorkun, O.V. and Lord, S.T. (2010). The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophysical Chemistry*. **152**(1-3): 15-20.

Hardy, J.J.; Carrell, N.A. and McDonagh, J. (1983). Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. (408): 279-287.

Ikada, Y. (2006). Chapter 3 Basic Technologies Developed for Tissue Engineering. Interface Science and Technology. I. Yoshito, Elsevier. **Volume 8**: 235-421.

Ionescu, A.-M.; Alaminos, M.; Cardona, J.d.I.C.; García-López Durán, J.d.D.; González-Andrades, M.; Ghinea, R.; Campos, A.; Hita, E. and Pérez, M.d.M. (2011). Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**(8): 1963-1973.

Lauricella, A.M. (2007). Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **41**(1): 7-19.

Lebitasy, M.P.; Latinne, D.; Maisin, D.; Vertommen, D. and Eeckhoudt, S. (2011). Clauss assay and fibrinogen protein estimated by capillary zone electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **49**(4): 689-693.

Lee, B.-H.; Li, B. and Guelcher, S.A. (2012). Gel microstructure regulates proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells encapsulated in alginate beads. *Acta Biomaterialia*. **8**(5): 1693-1702.

Liu, X.; Qian, L.; Shu, T. and Tong, Z. (2003). Rheology characterization of sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*. **44**(2): 407-412.

Llames, S.; García, E.; García, V.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Jorcano, J.L.; López, E.; Holguín, P.; Miralles, F.; Otero, J. and Meana, A. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*. **7**: 47-53.

Ma, P.X. (2005). Alginate for Tissue Engineering. Scaffolding in Tissue Engineering. P. X. Ma and J. Elisseeff. **1**: 13-21.

Meana, A.; Iglesias, J.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Madrigal, B.; Fresno, M.F.; Martin, C.; San Roman, F. and Tevar, F. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. **24**(7): 621-630.

Moresi, M. and Bruno, M. (2007). Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. *Journal of Food Engineering*. **82**(3): 298-309.

Moresi, M.; Bruno, M. and Parente, E. (2004). Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Food Engineering*. **64**(2): 179-186.

Moresi, M.; Mancini, M.; Bruno, M. and Rancini, R. (2001). Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Texture Studies*. **32**: 375-396.

Navarro, A.S.; Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. (1997). Viscoelastic properties of frozen starch-triglycerides systems. *Journal of Food Engineering*. **34**(4): 411-427.

Nunamaker, E.A.; Otto, K.J. and Kipke, D.R. (2011a). Investigation of the material properties of alginate for the development of hydrogel repair of dura mater. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**: 16-33.

Nunamaker, E.A.; Otto, K.J. and Kipke, D.R. (2011b). Investigation of the material properties of alginate for the development of hydrogel repair of dura mater. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**(1): 16-33.

Pawar, S.N. and Edgar, K.J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*. **33**(11): 3279-3305.

Piechocka, I.; Bacabac, R.G.; Potters, M.; MacKintosh, F.C. and Koenderink, G. (2010). Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophysical Journal*. **98**: 2281-2289.

Rand, M.L. and Murray, R. (2000). Chapter 51. Hemostasis & Thrombosis. Harper's Illustrated Biochemistry. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill. **26**.

Rand, M.L. and Murray, R.K. (2003). Hemostasis & Thrombosis. Harper's Illustrated Biochemistry. J. Foltin; J. Ransom and J. Matragrano. United States, McGraw-Hill Companies. **26**: 702.

Shikanov, A.; Xu, M.; Woodruff, T.K. and Shea, L.D. (2009). Interpenetrating fibrin–alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials*. **30**(29): 5476-5485.

Smith, C.; Marks, A.D. and Lieberman, M. (2004). Chapter 45. Blood Plasma Proteins, Coagulation and Fibrinolysis. 'Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. L. W. Wilkins. **2**: 900.

Sosa Herrera, M.G.; Lozano Esquivel, I.E.; Ponce de León Ramírez, Y.R. and Martínez Padilla, L.P. (2012). Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. **29**(1): 175-184.

Spicer, P.P. and Mikos, A.G. (2010). Fibrin glue as a drug delivery system. *Journal of Controlled Release*. **148**(1): 49-55.

Stokke, B.T.; Drager, K.I.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H. and Kajiwar, K. (1997). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. *Macromolecular Symposia*. **120**(1): 91-101.

Stokke, B.T.; Draget, K.I.; Smidsrød, O.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H. and Kajiwar, K. (2000). Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca–Alginate Gels. *Macromolecules*. **33**(5): 1853-1863.

Weisel, J.W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*. **112**(2–3): 267-276.

Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K.; Draget, K.I. and Stokke, B.T. (2000). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 2. Time-resolved studies on ionotropic gels. *Journal of Molecular Structure*. **554**(1): 21-34.

Zhao, H.; Ma, L.; Zhou, J.; Mao, Z.; Gao, C. and Shen, J. (2008). Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomedical materials*. **3**: 1-9.

3. Desarrollo de una metodología para la elaboración de microportadores

3.1 Resumen

En este capítulo se describe la metodología desarrollada para la elaboración de microportadores basados en una solución de alginato de sodio al 2% p/v. Todas las etapas que se llevaron a cabo y los problemas que se abordaron y se solucionaron, dieron lugar a la obtención de un montaje y unas condiciones finales. Esta metodología fue posteriormente extrapolada a la elaboración de microportadores basados en mezclas de plasma sanguíneo crioconcentrado (PHCC) y alginato de sodio al 1% p/v.

3.2 Introducción

Uno de los principales problemas en ingeniería de tejidos es la disponibilidad de un número suficiente de células con el apropiado fenotipo para ser liberadas en el sitio de la herida. Esto requiere una rápida amplificación celular para reparar el tejido y restaurar la función (Malda & Frondoza, 2006).

Dentro de las alternativas biomédicas existentes para la rápida amplificación celular se encuentra la elaboración de partículas de tamaño reducido (típicamente entre 100-400 μm) a partir de un material, que no solo permita la adhesión celular sino que además le otorgue a las células un área superficial de anclaje mayor a la obtenida en los métodos convencionales.

El uso de microportadores incrementa el área superficial por unidad de volumen. Este principio se explica mejor a partir de la **Tabla 3-1**. En el extremo izquierdo donde se presenta un cubo de 4 cm de lado, que proporciona un área superficial de 16 cm^2 para cada una de las caras y un área superficial total de 96 cm^2 . Si este cubo se divide en 8 partes iguales, se obtendrían 8 cubos con un área superficial de 32 cm^2 cada uno, que darían un área superficial total de 192 cm^2 . Si este procedimiento se repite hasta obtener cubos de 0,03125 cm de lado (312,5 μm), se obtendrían 2'097.152 partículas que proporcionarían un área superficial total de 12288 cm^2 , similar a la alcanzada con 163 frascos T75 (**Tabla 3-2**).

Tabla 3-1: Relación entre el tamaño de partícula y el área superficial

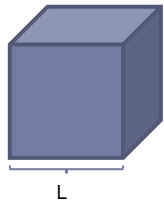
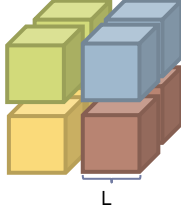
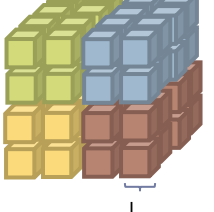
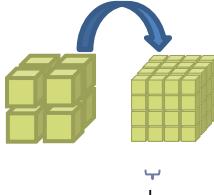
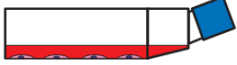
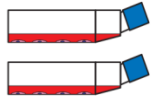
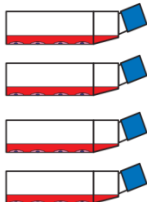
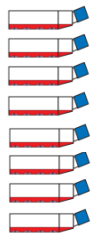
			
$L = 4 \text{ cm}$, $As_{\text{cara}} = 16 \text{ cm}^2$ $N_{\text{caras}} = 6$, $N_{\text{cubos}} = 1$ $As_T = 96 \text{ cm}^2$	$L = 2 \text{ cm}$, $As_{\text{cara}} = 4 \text{ cm}^2$ $N_{\text{caras}} = 6$, $N_{\text{cubos}} = 8$ $As_T = 192 \text{ cm}^2$	$L = 1 \text{ cm}$, $As_{\text{cara}} = 1 \text{ cm}^2$ $N_{\text{caras}} = 6$, $N_{\text{cubos}} = 64$ $As_T = 384 \text{ cm}^2$	$L = 0,5 \text{ cm}$, $As_{\text{cara}} = 0,25 \text{ cm}^2$ $N_{\text{caras}} = 6$, $N_{\text{cubos}} = 512$ $As_T = 768 \text{ cm}^2$
<p>L: Longitud de la cara As_{cara}: Área superficial de una cara N_{caras}: Número de caras por cada cubo N_{cubos}: Número de cubos que equivalen al mismo volumen del cubo original As_T: Área superficial total</p>			
			
Frasco T75 $As_T = 75 \text{ cm}^2$	2 Frascos T75 $As_T = 150 \text{ cm}^2$	4 Frascos T75 $As_T = 300 \text{ cm}^2$	8 Frascos T75 $As_T = 600 \text{ cm}^2$

Tabla 3-2: Relación entre el tamaño de partícula y el área superficial total

Longitud cara (cm)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
Longitud cara (μm)	40000	20000	10000	5000	2500	1250	625	312,5
Área superficial cara (cm^2)	16	4	1	0,25	6,25E-02	1,56E-02	3,91E-03	9,77E-04
Número de caras	6	6	6	6	6	6	6	6
Número de cubos	1	8	64	512	4096	32768	262144	2097152
Área superficial total (cm^2)	96	192	384	768	1536	3072	6144	12288

La aproximación del aumento del área superficial total obtenida a partir de la división de las partículas cúbicas permite visualizar cómo a partir de partículas de tamaño micrométrico se pueden alcanzar grandes áreas superficiales. Dado que el método de fabricación de microportadores hace difícil su construcción en forma cúbica, se adoptará la forma esférica que es la más común y se adoptará como medida característica el diámetro de partícula.

3.2.1 Características generales de los microportadores

Entre las principales características que deben tener los microportadores se encuentran: la distribución de tamaño, la densidad específica, la composición química y las características estructurales.

- Dado que el número de células que se adhieren a la superficie depende del diámetro del portador, la distribución de tamaño debe ser lo más estrecha posible para proveer un cultivo homogéneo. La densidad específica de los microportadores deberá ser ligeramente mayor que el medio de cultivo (típicamente entre 1.02 y 1.10) para permitir que estos se mantengan en suspensión durante la agitación.
- La composición química de los microportadores determina su biodegradabilidad. Es de esperarse que el material sea biodegradable para disminuir una respuesta inmune por parte del organismo. Deben ser esterilizables sin comprometer su integridad estructural (Malda & Frondoza, 2006).

En la **Tabla 3-3** y la **Tabla 3-4** se describen diferentes tipos de microportadores comerciales, empleados en ingeniería de tejidos (Malda & Frondoza, 2006; Chen *et al.*, 2011). Es posible observar que los tamaños de partícula oscilan entre 100-400 μm , permitiendo áreas superficiales entre 255 y 4400 cm^2/gramo . Dentro de los materiales empleados para su fabricación se encuentran dextrán, plástico, vidrio, celulosa, gelatina y colágeno entre otros y aunque predomina la forma esférica, también es posible encontrar portadores cilíndricos.

3.2.2 Microportadores comerciales. Principales materiales empleados

Quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal semicristalino compuesto de unidades de N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina (Yang *et al.*, 2010). Ha sido ampliamente usado en ingeniería de tejidos por sus características biodegradables, su biocompatibilidad y la ausencia de toxicidad. La formación de geles puede ser obtenida mediante entrecruzamiento con glutaraldehído o intercambio iónico con polifosfatos y sulfatos (Sinha *et al.*, 2004). Dentro de las técnicas para la elaboración de microesferas a partir de quitosano se encuentran: aspersión/secado, intercambio iónico y entrecruzamiento por emulsión, entre otros (Eibes *et al.*, 2010). A partir de este último método Chen *et al.* (2006) obtuvieron microportadores con tamaños entre 100 y 200 μm , que soportaron apropiadamente fibroblastos murinos y humanos, sin presentar efectos citotóxicos.

Tabla 3-3: Microportadores comerciales.

	Nombre comercial	Fabricante	Tamaño (μm)	As (cm^2g^{-1})	Cant, (g^{-1})	Dens, (gmL^{-1})	Material
Dextran	Cytodex 1	Amersham Biosciences, Suecia	147-248	4400	$4,3 \times 10^6$	1,03	Matriz de dextran sustituida con grupos N-dimetilaminoetil
	Cytodex 2	Amersham Biosciences, Suecia	135-200	3300	$4,1 \times 10^6$	1,04	Matriz de dextran sustituida con una capa superficial de grupos N,N,N-trimetil-2-hidroxiaminopropil
	Hillex	SoloHill, USA	150-210	350	$5,0 \times 10^5$	1,1	Matriz de dextran con capa superficial tratada
Plástico	Cubierta de plástico	SoloHill, USA	150-210	380	$4,5 \times 10^5$	1,02-1,04	Plástico cubierto con colágeno desnaturalizado
	Plastic Plus	SoloHill, USA	150-210	380	$4,5 \times 10^5$	1,02-1,04	Plástico cubierto con colágeno desnaturalizado, que promueve la rápida adhesión
	Biosilon	Nunc, Dinamarca	160-300	255	$5,1 \times 10^4$	1,05	Poliestireno
	Cytoline 2	Amersham Biosciences, Suecia	400-2500	>1000	n/a*	1,03	Polielileno y silica
Vidrio	Vidrio cubierto	SoloHill, USA	150-210	380	$4,5 \times 10^5$	1,02-1,04	Plástico cubierto con vidrio
Celulosa	Cytopore 1	Amersham Biosciences, Suecia	200-280	Aprox, 1200	n/a*	1,03	Celulosa
Gelatina	Cultispher G	Percell Biolitica, Suecia	130-380	n/a*	$1,0 \times 10^6$	1,04	Gelatina porcina entrecruzada
	Cultispher S	Percell Biolitica, Suecia	130-380	n/a*	$8,0 \times 10^5$	1,04	Gelatina porcina entrecruzada
Colágeno	Cytodex 3	Amersham Biosciences, Suecia	141-211	2700	$3,0 \times 10^6$	1,04	Matriz de dextran con una capa delgada de colágeno de piel de cerdo desnaturalizada
	Cellagen	MP Biomedicals, USA	100-400	n/a*	n/a*	n/a*	Colágeno bovino tipo I altamente entrecruzado

*n/a: No aplica. **Adaptado de Malda & Frondoza (2006).

Tabla 3-4: Microportadores evaluados para el crecimiento de hESC (*human Embryonic Stem Cells*).

Microportador***	Fabricante	Dimensión	Área superficial (cm ² g ⁻¹)	Matriz	Material de cobertura
DE53	Whatman, UK	Cilindro L 130± 60 μm x D 35±7 μm	6800	Celulosa	Dietilaminoetil
DE52	Whatman, UK	Cilindro L 130± 60 μm x D 35±7 μm	6800	Celulosa	Dietilaminoetil
QA52	Whatman, UK	Cilindro L 130± 60 μm x D 35±7 μm	6800	Celulosa	Amonio cuaternario
CM52	Whatman, UK	Cilindro L 130± 60 μm x D 35±7 μm	6800	Celulosa	Carboximetil
Cytodex 1	GE Healthcare, Suecia	Esfera 190±58 μm	4400	Dextran entrecruzado	N-dimetilaminoetil
Cytodex 3	GE Healthcare, Suecia	Esfera 175 ±36 μm	2700	Dextran entrecruzado	Colágeno desnaturalizado
Cultispher G	Hyclone	Esfera 255±125 μm	40000	Gelatina entrecruzada	Gelatina
Cytopore 2	GE Healthcare, Suecia	Esfera 240±40 μm	11000	Celulosa de algodón entrecruzada	Dietilaminoetil
Toyopeart AF-Tresyl-650M (Tosoh 65PR)	Tosoh Bioscience, Japón	Esfera 65±25 μm	4200	Metacrilato hidroxilado	Amina primaria
TSKge1 Tresyl-5PW (Tosoh 10 PR)	Tosoh Bioscience, Japón	Esfera 10 μm	9000	Metacrilato hidroxilado	Amina primaria

***Adaptado de Chen *et al.* (2011)

Gelatina. Las microesferas porosas Cultispher® (Percell Biolytica AB, Suecia), son los portadores a base de gelatina más conocidos y empleados en la expansión de células animales. Se obtienen a partir de gelatina porcina y han sido empleados con éxito en la proliferación de queratinocitos humanos, mejorando etapas cruciales en el tratamiento de heridas cutáneas como son el cultivo, transporte y trasplante de las células al sitio de herida, perfilándose como un tratamiento promisorio para pacientes con quemaduras u otro tipo de heridas cutáneas

(Gustafson *et al.*, 2007; Seland *et al.*, 2011). Así mismo, se han empleado como soporte para el cultivo de condrocitos nasales, encontrando una mejor expansión y diferenciación respecto al cultivo tradicional en dos dimensiones (Sommar *et al.*, 2010) y se han usado con éxito en la producción a gran escala de osteoblastos y condrocitos en medios libres de suero (Alfred *et al.*, 2011).

Diversos autores reportan el uso de microportadores basados en gelatina para el cultivo de células endoteliales humanas (Tashiro *et al.*, 2012), fibroblastos autólogos (Huang *et al.*, 2008) y osteoblastos autólogos, obteniendo en todos los casos células viables, correctamente diferenciadas y sobre un material que presenta una adecuada biocompatibilidad (Lau *et al.*, 2010).

Cytodex 1. Los microportadores de Cytodex® 1 (GE Healthcare, USA) están formados de una matriz de dextran cargada positivamente con grupos de N-dimetilaminoetil distribuidos de forma uniforme en toda la matriz. Dentro de las principales aplicaciones de estos portadores se encuentran:

- Multiplicación y diferenciación de células animales, entre las que se destacan células multipotentes de rata, expandidas y diferenciadas a células hepáticas (Park *et al.*, 2010) y células mesenquimales de ratón (Yang *et al.*, 2007), ambos tipos celulares anclaje dependientes.
- Cultivo de células Vero a nivel de biorreactor (Petiot *et al.*, 2010), cultivo de células CHO en un reactor Taylor tipo vortex (Santiago *et al.*, 2011)
- Propagación de virus: Souza *et al.* (2009) propagaron virus de la fiebre amarilla (17DD) en células Vero cultivadas en microportadores de Cytodex-1, en un reactor agitado con medio libre de suero. Hu *et al.* 2008 usaron Cytodex-1 para producir la vacuna de la influenza H5N1 y Hundt *et al.* (2007) usaron Cytodex-1 para la producción de la vacuna contra enteritis a escala de 1L empleando biorreactor.

Los microportadores que se encuentran disponibles comercialmente ofrecen una alternativa para mejorar los tiempos de propagación celular respecto al método de cultivo tradicional, sin embargo, a conocimiento del autor aún no se han desarrollado microportadores que puedan ser implantados directamente en el sitio de la herida. Uno de los objetivos de la presente investigación fue desarrollar un mecanismo de elaboración de partículas esféricas de tamaño micrométrico, a partir de un material biodegradable y biocompatible, que permita su implante en heridas cutáneas y que a su vez favorezca la proliferación celular. Así mismo, se buscó desarrollar una metodología económica y fácil de replicar a nivel clínico, de tal forma que fuera aplicable en países de desarrollo como Colombia, cuyo sistema de salud tiene grandes carencias.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Alginato de sodio 1% p/v.

Se disolvieron 31,02 gramos de alginato de sodio (Sigma-Aldrich A2033, Saint Louis MO, USA) en 700 mL de agua destilada. Se sometió a agitación magnética y a calentamiento (50°C) durante 12 horas, para favorecer la disolución del alginato de sodio. Transcurrido este tiempo se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas para permitir el ascenso de las burbujas y luego se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada en un matraz aforado para obtener una solución de alginato de sodio 3% p/v. Seguido de esto fue disuelta con agua destilada hasta alcanzar una concentración final de alginato de sodio 1% p/v.

3.3.2 Solución de CaCl₂ al 3% p/v

Se disolvieron 39,74 gramos de CaCl₂·2H₂O grado analítico (Carlo Erba Reagents, Rodano, France) en 700 mL de agua destilada en un vaso de precipitado y se mezclaron empleando un agitador de vidrio. Una vez disuelto el CaCl₂·2H₂O, se llevó la solución a un matraz aforado de 1000 mL y se completó el volumen con agua destilada, para obtener una solución de CaCl₂ al 3% p/v (270mM).

3.3.3 Montaje empleado para la elaboración de los microportadores

En la **Figura 3-1** se presenta un esquema del montaje empleado para la elaboración de las microesferas, similar al usado por Mazzitelli *et.al.* (2011). El sistema consta de una boquilla de aspersión en acero inoxidable 316, que fue provista por la compañía *Spraying Systems Co*[®], la cual está constituida por un cabezal de aire (*air cap*), un cabezal de salida de líquido (*fluid cap*) y un cuerpo con dos entradas coaxiales, perpendiculares a la dirección del flujo que permiten el ingreso del líquido y el aire (**Figura 3-2**). Se empleó una bomba peristáltica para alimentar el alginato de sodio al 1% p/v a la boquilla y la presión del aire de alimentación se midió mediante un manómetro, seguido de un filtro de membrana de tamaño de poro 0,45 μm. La mezcla se asperjó en 100 mL de CaCl₂ (3% p/v) contenidos en una caja de Petri de 10 cm de diámetro.

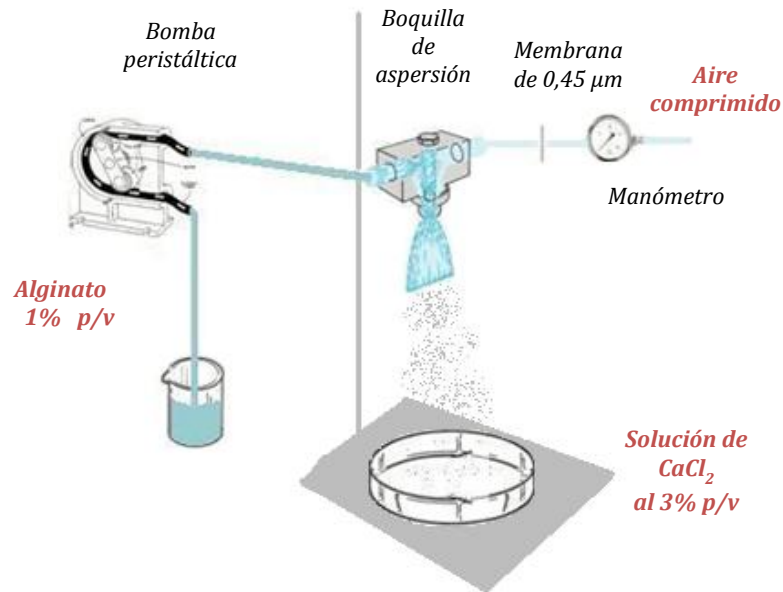


Figura 3-1: Montaje para la elaboración de microportadores

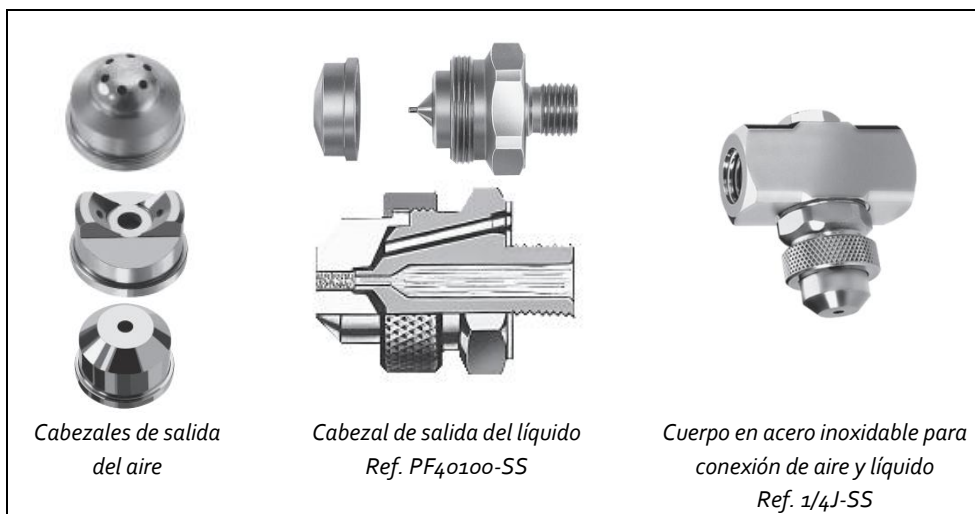








Figura 3-2: Sistema empleado en la aspersión. Tomado de (*Spraying-Systems-Co.*, 2012)

3.3.4 Selección del cabezal de salida de aire

En la **Tabla 3-5** se presentan los tres tipos de cabezales de salida de aire empleados para la fabricación de microportadores mediante aspersión de alginato de sodio (1% p/v) sobre una solución de CaCl_2 al 3% p/v. Los cabezales varían respecto al tipo de mezcla (interna o externa) y al patrón de rociado que generan.

Tabla 3-5: Cabezales de aire evaluados

Boquilla Nº	Esquema	Referencia	Descripción	Patrón de rociado
1		Ref. PA140-6-37-70° SS	Cabezal que permite la mezcla interna del líquido y el aire.	
2		Ref. 122281-60° SS	Cabezal que permite la mezcla externa del líquido y el aire	
3		Ref. PA1401110 SS	Cabezal que permite la mezcla interna del líquido y el aire.	

En la **Tabla 3-6** se presentan las condiciones de presión y altura a las que se evaluaron cada uno de los tres cabezales de aire descritos en la **Tabla 3-5**. Se realizó un diseño factorial que dio lugar a 18 experimentos, con los cuales se buscaba seleccionar un sistema que fuera extrapolable a condiciones de trabajo estériles y que a su vez permitiera la formación de esferas con diámetros entre 100-300 μm .

Tabla 3-6: Condiciones de operación y cabezales de aire evaluados

Experimento Nº	Presión (psig)	Boquilla Nº	Altura (cm)	Experimento Nº	Presión (psig)	Boquilla Nº	Altura (cm)
1	10	1	20	10	10	2	30
2	15	1	20	11	15	2	30
3	20	1	20	12	20	2	30
4	10	1	30	13	10	3	20
5	15	1	30	14	15	3	20
6	20	1	30	15	20	3	20
7	10	2	20	16	10	3	30
8	15	2	20	17	15	3	30
9	20	2	20	18	20	3	30

3.3.5 Condiciones de operación para el cabezal de salida de aire seleccionado

Una vez seleccionado el cabezal de aire, se evaluó la influencia de la presión de entrada de aire, el caudal de alimentación del alginato de sodio y la altura de la boquilla en la morfología y el tamaño de partícula. En la **Tabla 3-7** se presentan los parámetros medidos, su significado y rangos en que fueron evaluados. Se realizó un diseño factorial tal como se presenta en la **Figura 3-3**. El ensayo se realizó por duplicado, para un total de 24 experimentos. La variable de respuesta fue la el porcentaje de partículas con diámetros entre 100 y 300 μm . Se seleccionaron las condiciones de operación que generaron un mayor número de partículas respecto al total en este intervalo.

Tabla 3-7: Parámetros evaluados generación de microportadores

<i>Parámetro</i>	<i>Significado</i>	<i>Valores evaluados</i>
Caudal	Flujo volumétrico de alginato de sodio al 1,6% alimentado a la boquilla de aspersión	2.1 mL·min ⁻¹ 5.7 mL·min ⁻¹
Altura	Distancia medida entre la boquilla de aspersión y la superficie de la solución de cloruro de calcio al 3% p/v contenida en una caja de Petri	20 cm 30 cm
Presión	Hace referencia a la presión manométrica de aire que se inyecta coaxialmente a la boquilla para generar el aerosol	5 psig 7 psig 9 psig

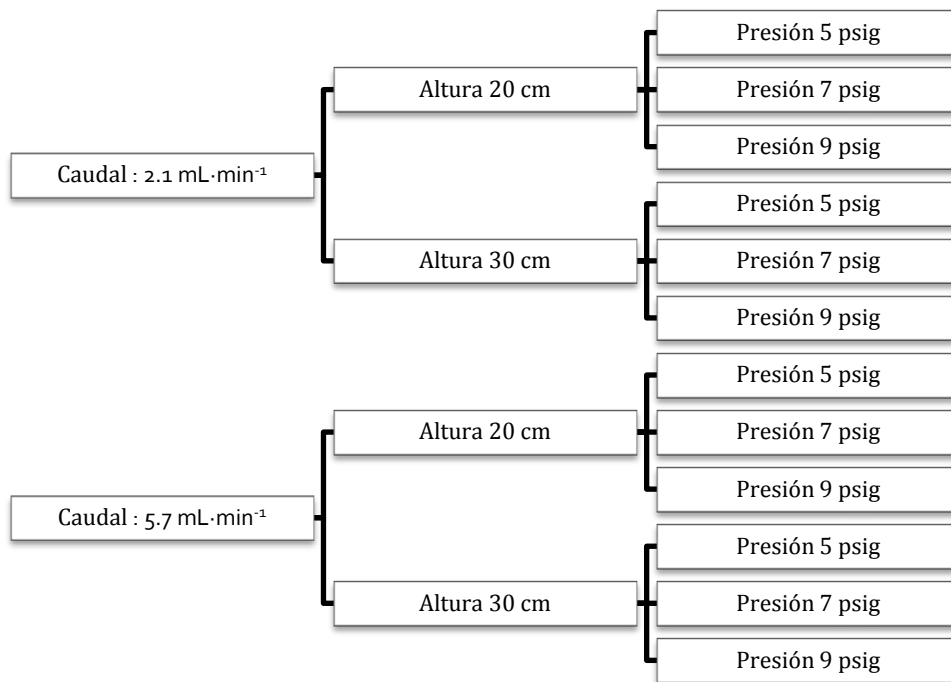


Figura 3-3: Variables involucradas en el tamaño de partícula y su distribución

3.3.6 Caracterización morfológica y dimensional de los microportadores

La morfología de los microportadores fue evaluada mediante microscopía óptica (*Motic B1 Series*). Los ensayos se realizaron por duplicado. Se tomaron (5) cinco microfotografías para cada ensayo. El tamaño de partícula y su distribución fueron determinados mediante el análisis de las fotografías empleando el software de distribución libre *Image J*[®], siguiendo la metodología de Wang *et.al.* (2008) y el programa *Motic Images Plus 2.0* asociado al microscopio. Se empleó tinción con azul de toluidina al 0,5%p/v en metanol, en una relación de volumen 1:5 con respecto a la solución con las partículas de alginato suspendidas. En el anexo C se describe detalladamente el procedimiento empleado en el procesamiento de las imágenes. (Wang *et al.*, 2008)

3.3.7 Análisis estadístico

El tamaño de partícula se presenta como el índice *SPAN* que corresponde a una medida del ancho de la distribución respecto a la mediana y se calcula con los percentiles $D_{90\%}$, $D_{10\%}$ y $D_{50\%}$, tal como se expresa en la ecuación 3-1, siguiendo la metodología empleada por Andreas *et.al.* (2011) y Wen *et.al.* (2011).

$$SPAN = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}} \quad (3-1)$$

Así mismo, se presenta el gráfico de tolerancia que permite apreciar visualmente la cantidad de partículas por fuera del rango de especificación.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Cabezal de aire N°1

En la **Tabla 3-8** se presentan las fotografías de las esferas obtenidas con el cabezal de aire N°1. El sistema consta de un cabezal de mezcla interna de líquido y aire y seis (6) aberturas dispuestas de forma tal que generan un patrón de rociado circular (**Figura 3-4**), cuyo diámetro es proporcional a la altura de la boquilla y a la presión del aire.

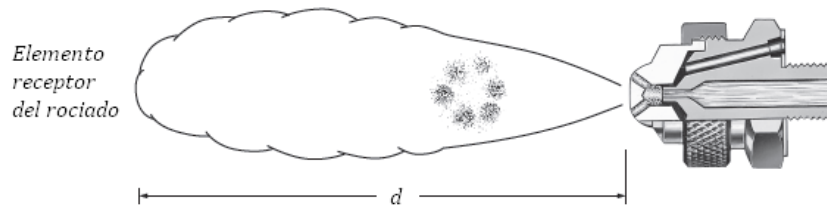



Figura 3-4: Patrón de rociado cabezal de aire N°1

Tabla 3-8: Microesferas obtenidas con el cabezal de aire N° 1

Cabezal de aire N° 1	Presión de entrada del aire: 10 psig
Altura de la Cabezal de aire N°: 20 cm	Altura de la boquilla N°: 30 cm
	<p>El diámetro de salida de la mezcla líquida excede el diámetro de la caja Petri (\varnothing:10 cm)</p> <p>Esta configuración y las posteriores (mayor presión y diferentes alturas) no son apropiadas para la formación de microesferas en condiciones estériles porque la mezcla asperjada excede el tamaño de la caja de Petri.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños que oscilan entre 50 y 1000 μm. La distribución del tamaño de partícula es heterogénea - Las partículas no presentan una forma bien definida y algunas se encuentran fracturadas 	

A medida que se incrementa la distancia entre la boquilla (d) y el elemento receptor del rociado, se aumenta el radio de aspersión. Lo mismo ocurre con el aumento de la presión. Dado que el patrón de rociado excede el diámetro de la caja de Petri empleada (\varnothing =10cm) para las condiciones más bajas evaluadas (presión: 10 psig y altura: 20 cm), se descartó la posibilidad de emplear este cabezal, considerando además que su uso dificultaría la conservación de las condiciones estériles.

3.4.2 Cabezal de aire N°2

El cabezal de aire N°2, a diferencia del N°1, permite conformar un sistema de mezcla externa de líquido y aire con dos (2) aberturas dispuestas una en frente de la otra, formando un patrón de rociado horizontal (**Figura 3-5**). En la **Tabla 3-9** se presentan los resultados de las esferas obtenidas con esta configuración. Para la presión más baja evaluada ($P=10$ psig) se observa que se obtienen partículas de forma bien definida, sin embargo su tamaño excede en más de cinco veces el promedio de partícula ($200\mu\text{m}$) del intervalo de interés ($100\text{-}300\mu\text{m}$). Con el aumento de la presión ($P=15$ y 20 psig) se disminuye el tamaño de partícula, pero se pierde homogeneidad en la distribución de tamaño y se va perdiendo la forma esférica de las partículas.

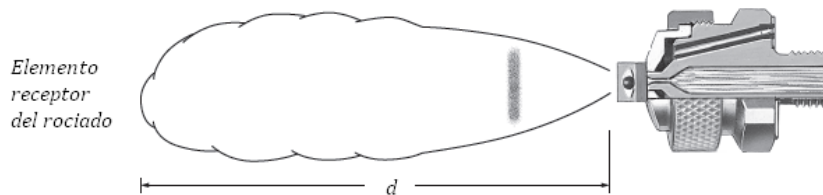
**Figura 3-5:** Patrón de rociado cabezal de aire N°2

Tabla 3-9: Microesferas obtenidas con el cabezal de aire N° 2

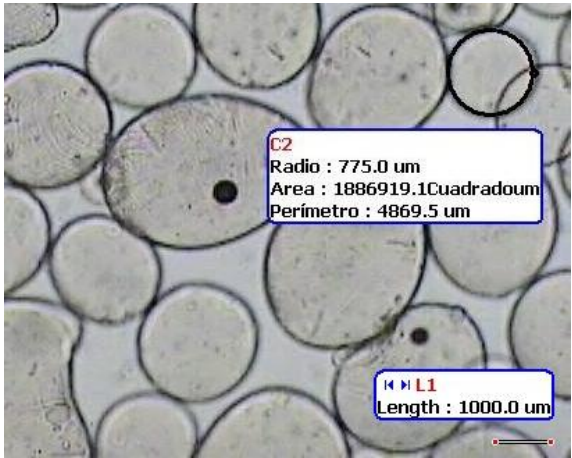
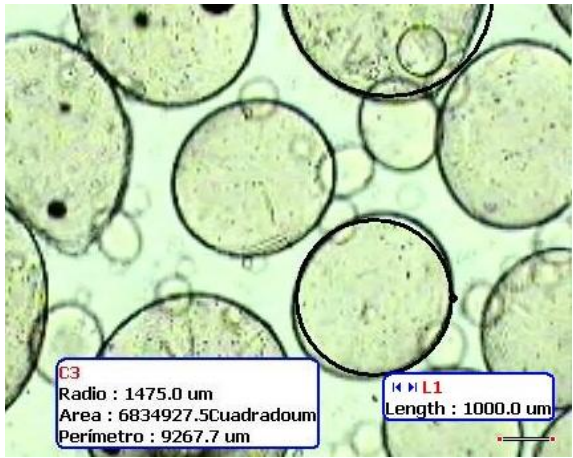
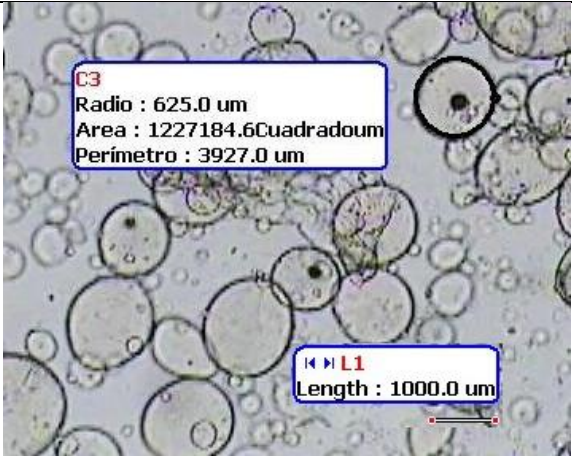
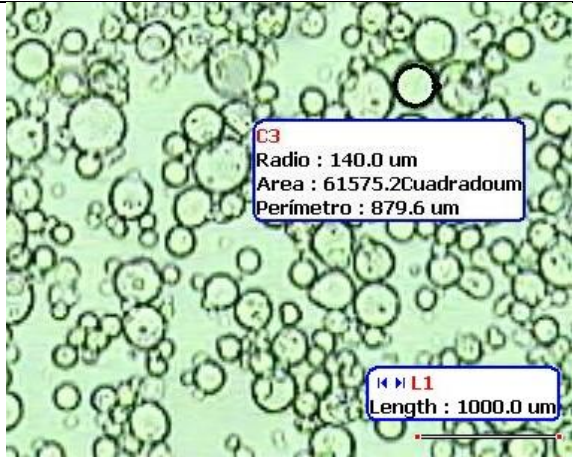
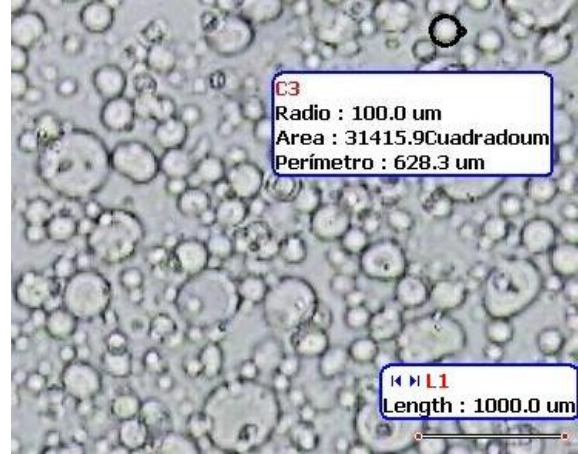
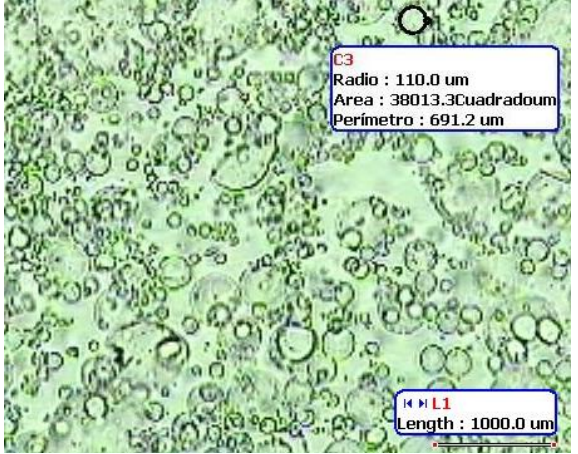
Cabezal de aire N°2	Presión de entrada del aire: 10 psig
Altura de la boquilla: 20 cm	Altura de la boquilla: 30 cm
 <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas esféricas, bien definidas y con una distribución de tamaño homogénea - El diametro obtenido con esta configuración excede 1000µm 	 <ul style="list-style-type: none"> - Al aumentar la altura de la boquilla y mantener la presión, se obtienen partículas de mayor diámetro y se observa la aparición de partículas de diámetro inferior a 1000µm dando lugar a una distribución heterogénea del tamaño.
Cabezal de aire N°2	Presión de entrada del aire: 15 psig
Altura de la boquilla: 20 cm	Altura de la boquilla: 30 cm
 <ul style="list-style-type: none"> - Con el aumento de la presión se disminuye el tamaño de partícula pero se pierde homogeneidad. - El diametro obtenido con esta configuración excede 1000µm. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Al aumentar la altura de la boquilla y aumentar la presión, se obtienen partículas de forma esférica bien definida y con una distribución de tamaño más homogénea.

Tabla 3-9: (Continuación)

Cabezal de aire N°2	Presión de entrada del aire: 20 psig
<p>Altura de la boquilla: 20 cm</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños que oscilan entre 50 y 1000 μm. La distribución del tamaño de partícula es heterogénea - Algunas partículas se encuentran fracturadas - El aumento de presión da lugar a la formación de partículas más pequeñas pero con forma menos definida. 	<p>Altura de la boquilla: 30 cm</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Se forman pocas esferas - Se observa material fracturado y sin forma definida - El aumento simultáneo de la presión y la altura afectan tanto el tamaño con la forma de las partículas

3.4.3 Cabezal de aire N°3

En la **Tabla 3-10** se presentan los resultados obtenidos con el cabezal de aire N° 3, el cual da lugar a la formación de un patrón de rociado circular similar al del cabezal N° 1, sin embargo por tener solo un orificio, el líquido asperjado se concentra en un solo punto (**Figura 3-6**). Para la altura más baja evaluada (20 cm) se observa una fractura de las partículas con el aumento de la presión, esto se debe al fuerte choque entre el líquido asperjado y la solución receptora. Cuando la presión se lleva hasta 20 psig, el líquido asperjado desplaza la solución de calcio fuera de la caja Petri y no se da lugar a la formación de microsferas. Con el aumento de la altura (30cm) se consigue una distribución homogénea del tamaño de partícula para la presión intermedia (15 psig) evaluada.

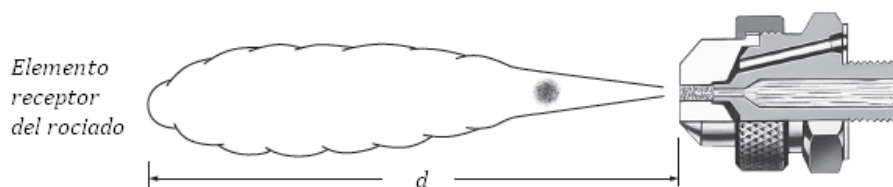


Figura 3-6: Patrón de rociado cabezal de aire N°3

Tabla 3-10: Microesferas obtenidas con el cabezal de aire N° 3

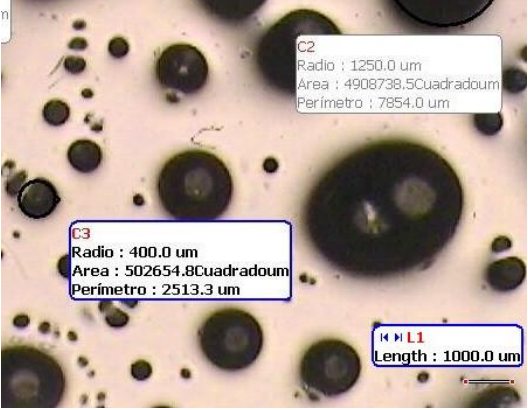
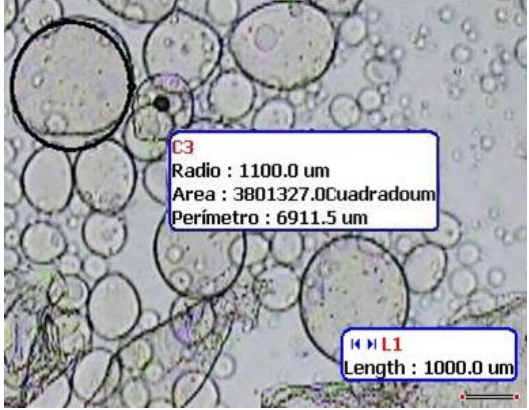

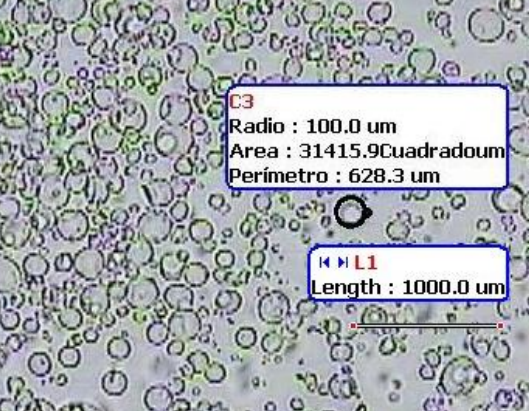
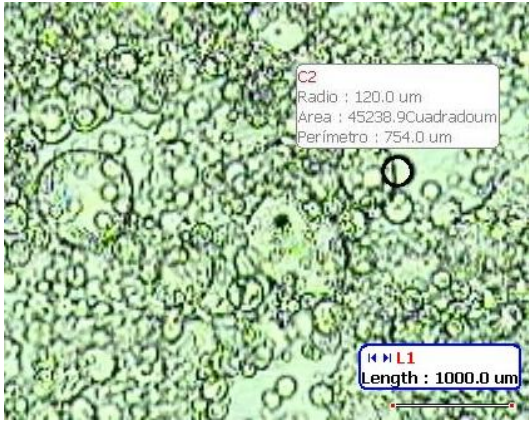
<p>Cabezal de aire N° 3</p>	<p>Presión de entrada del aire: 10 psig</p>
<p>Altura de la boquilla: 20 cm</p>	<p>Altura de la boquilla: 30 cm</p>
 <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños superiores a 1000µm. - Presentan una forma bien definida - No hay aglomerados 	 <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños superiores a 1000µm. - Algunas partículas presentan una forma bien definida. Hay una distribución heterogénea del tamaño de partícula
<p>Cabezal de aire N° 3</p>	<p>Presión de entrada del aire: 15 psig</p>
<p>Altura de la boquilla: 20 cm</p>	<p>Altura de la boquilla: 30 cm</p>
 <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños superiores entre 100 y 1000µm. - Las partículas no presentan una forma bien definida y se encuentran fracturadas - Hay una distribución heterogénea del tamaño de partícula - El aumento de la presión da lugar a la formación de partículas más pequeñas. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Se forman partículas de tamaños que oscilan entre 50 y 200 µm. - Las partículas presentan una forma bien definida, aunque algunas de ellas se encuentran fracturadas - El aumento simultáneo de la presión y la altura dan lugar a una distribución más homogénea del tamaño de partícula.

Tabla 3 -10. (continuación)

Cabezal de aire N° 3	Presión de entrada del aire: 20 psig
Altura de la boquilla: 20 cm	Altura de la boquilla: 30 cm
<p>- Esta configuración no es apropiada para la formación de esferas porque debido a la alta presión de ingreso del aire, el líquido salpica fuera de la caja Petri y no se da lugar a la formación de microesferas.</p>	 <p>- Se forman partículas de tamaños que oscilan entre 50 y 1000 μm. La distribución del tamaño de partícula es heterogénea</p> <p>- Las partículas no presentan una forma bien definida y algunas de ellas se encuentran fracturadas</p>

Las diferentes observaciones obtenidas como resultado de la evaluación de los tres cabezales permitieron dilucidar la influencia de la presión en el tamaño y forma de las partículas, encontrando en todos los casos una relación inversamente proporcional, esto indica que con el aumento de la presión se obtienen partículas de menor tamaño y esfericidad. Así mismo se encontró que la altura y el tipo de boquilla pueden afectar la funcionalidad del sistema al ser extrapolado a condiciones estériles. Teniendo en cuenta los criterios de tamaño y distribución de partícula, así como la funcionalidad del sistema, **se seleccionó el sistema formado con el cabezal de aire N° 3 para los ensayos posteriores.**

3.4.4 Selección de las condiciones de operación para el cabezal N° 3

Empleando el montaje presentado en la **Figura 3-1** y variando las condiciones de operación (**Tabla 3-7**) se obtuvieron las distribuciones de tamaño de partícula descritas a continuación. Cada una de las tablas contiene las condiciones de presión, flujo y altura evaluados. A su vez se presentan a manera de ejemplo, dos de las imágenes obtenidas, ya procesadas siguiendo la metodología descrita en el anexo C. Así mismo, se presenta un gráfico de tolerancia que se construyó tomando el diámetro de cien (100) partículas de forma aleatoria, con el fin de visualizar la distribución del tamaño de partícula frente al intervalo de interés comprendido entre 100 y 300 μm . Finalmente se presenta un histograma, que relaciona la frecuencia del número de partículas, expresada en porcentaje, con intervalos de tamaño de partícula entre 0 y 50 μm , hasta 800 μm .

Tabla 3-11: Ensayo 1

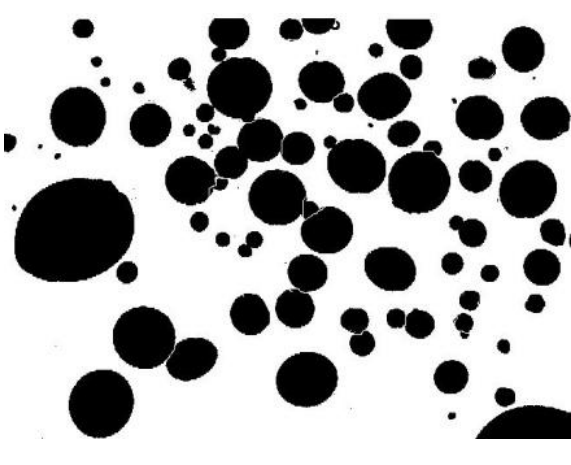
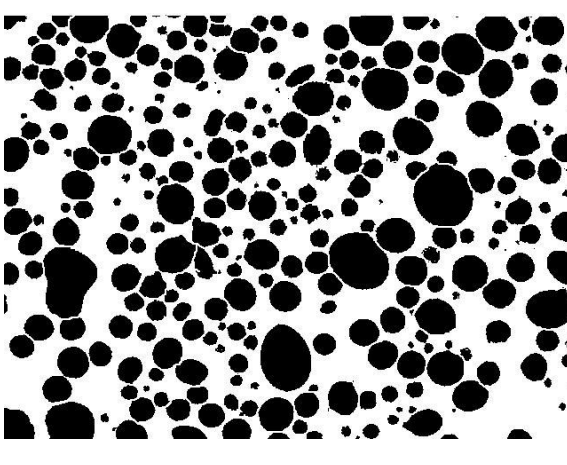
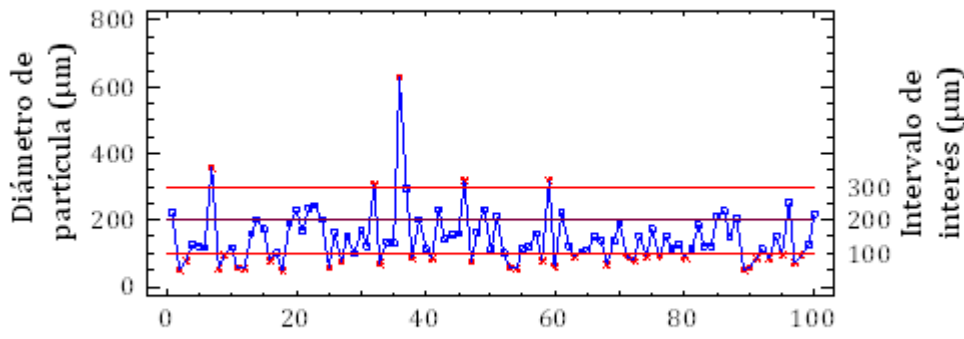
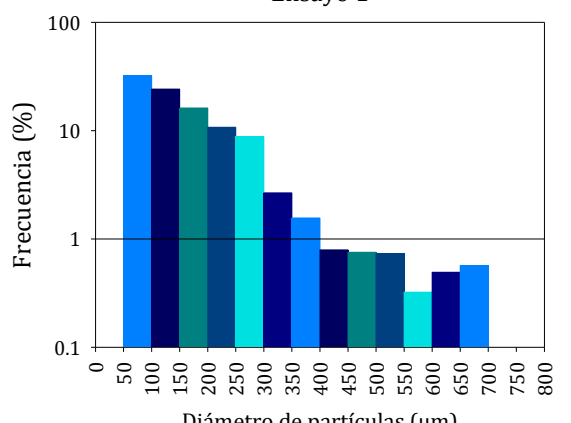
Presión: 5 psig	Flujo: 2.1 mL·min ⁻¹	Altura: 20 cm
		
<p style="text-align: center;">Gráfico de tolerancia</p>  <p style="text-align: center;">Número de observaciones</p>		
<p style="text-align: center;">Ensayo 1</p>  <p style="text-align: center;">Diámetro de partículas (µm)</p>	<p>Frecuencia partículas entre 100-300µm: 60%</p> <p>No se observan partículas fracturadas. Prevalece la forma esférica de las partículas en los campos visuales observados.</p> <p>El ensayo 1 corresponde a las condiciones más bajas evaluadas de presión, altura y flujo de líquido. Se obtiene una distribución homogénea del tamaño de partícula y éstas no se encuentran fracturadas.</p>	

Tabla 3-12: Ensayo 2

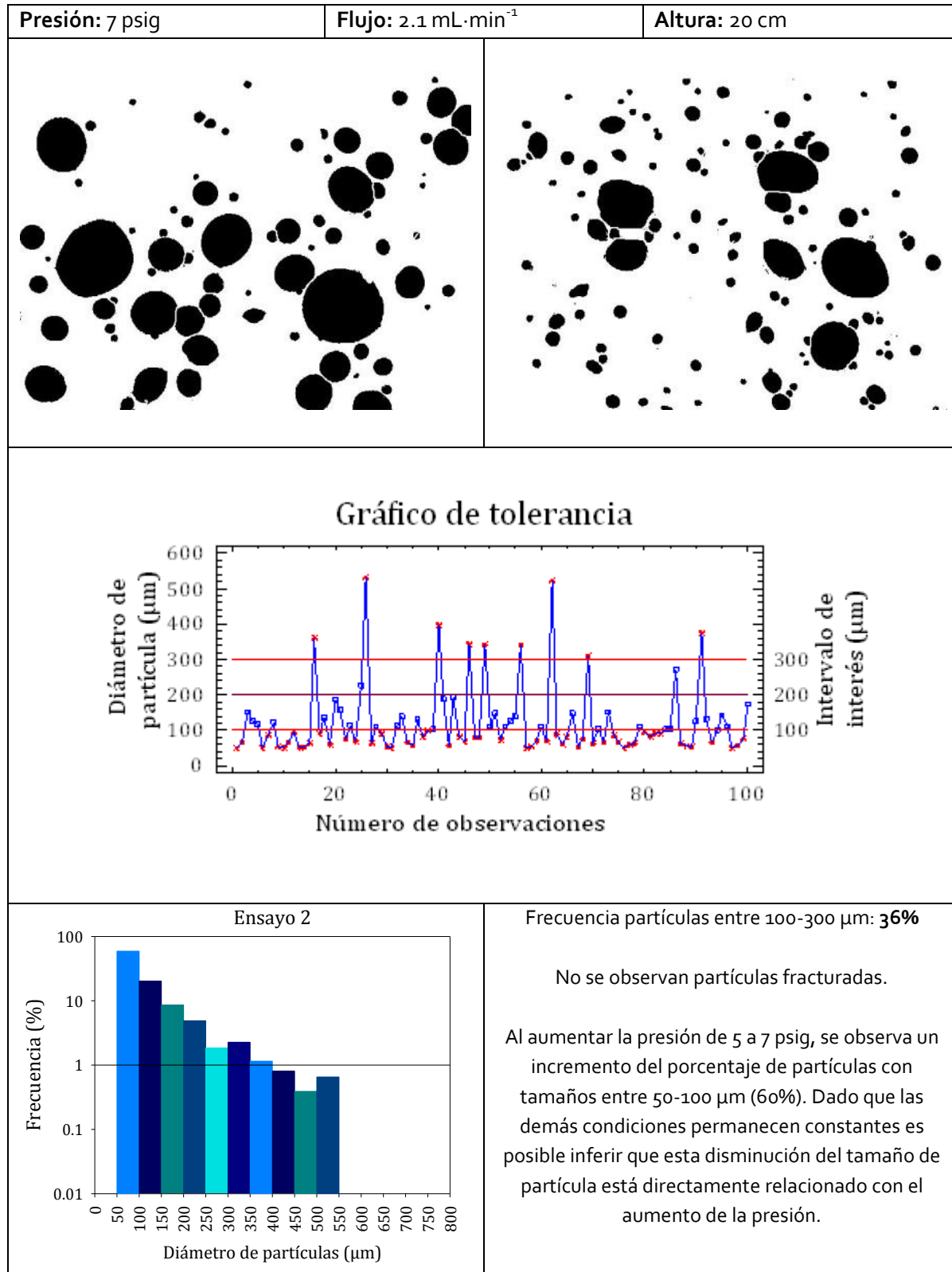


Tabla 3-13: Ensayo 3

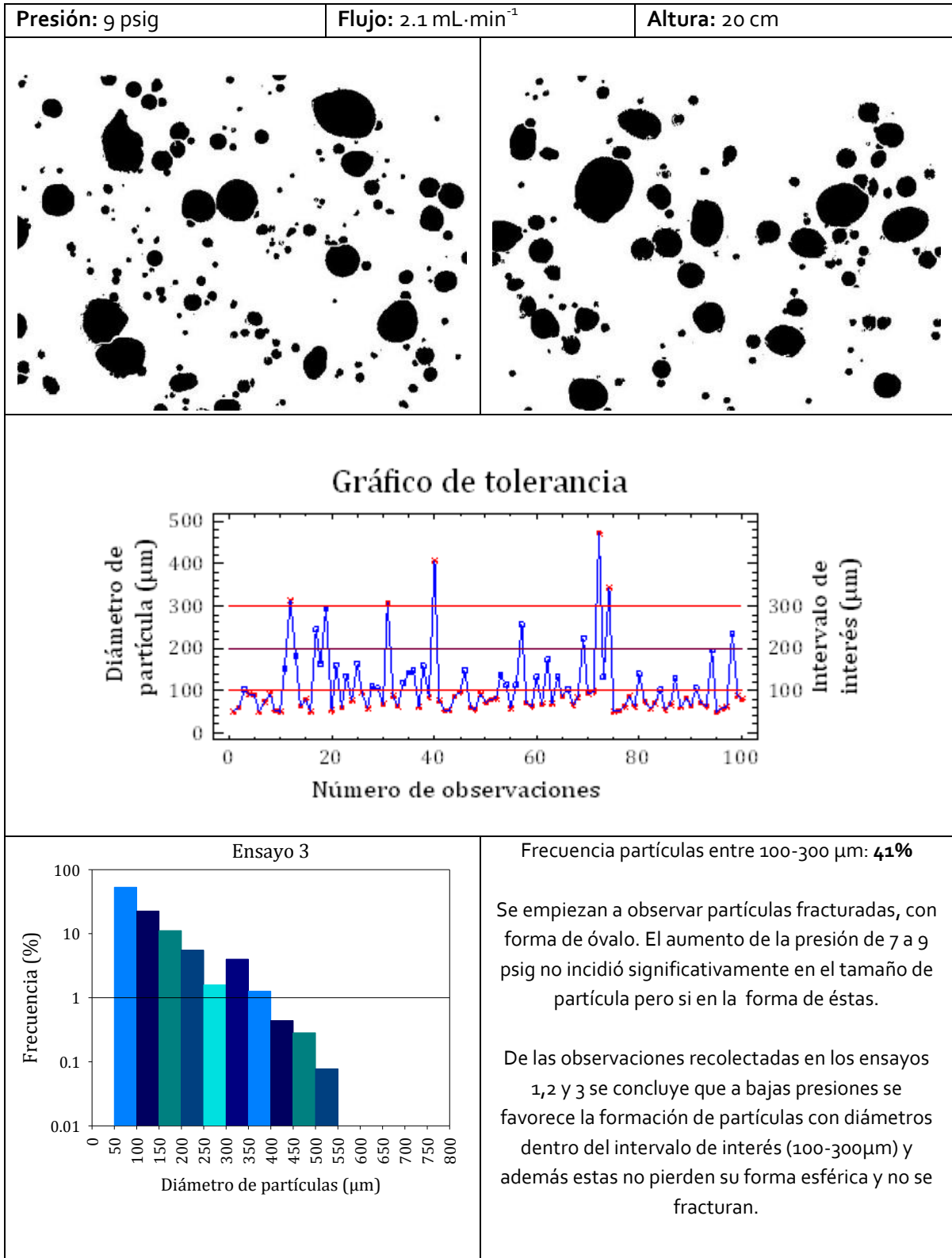


Tabla 3-14: Ensayo 4

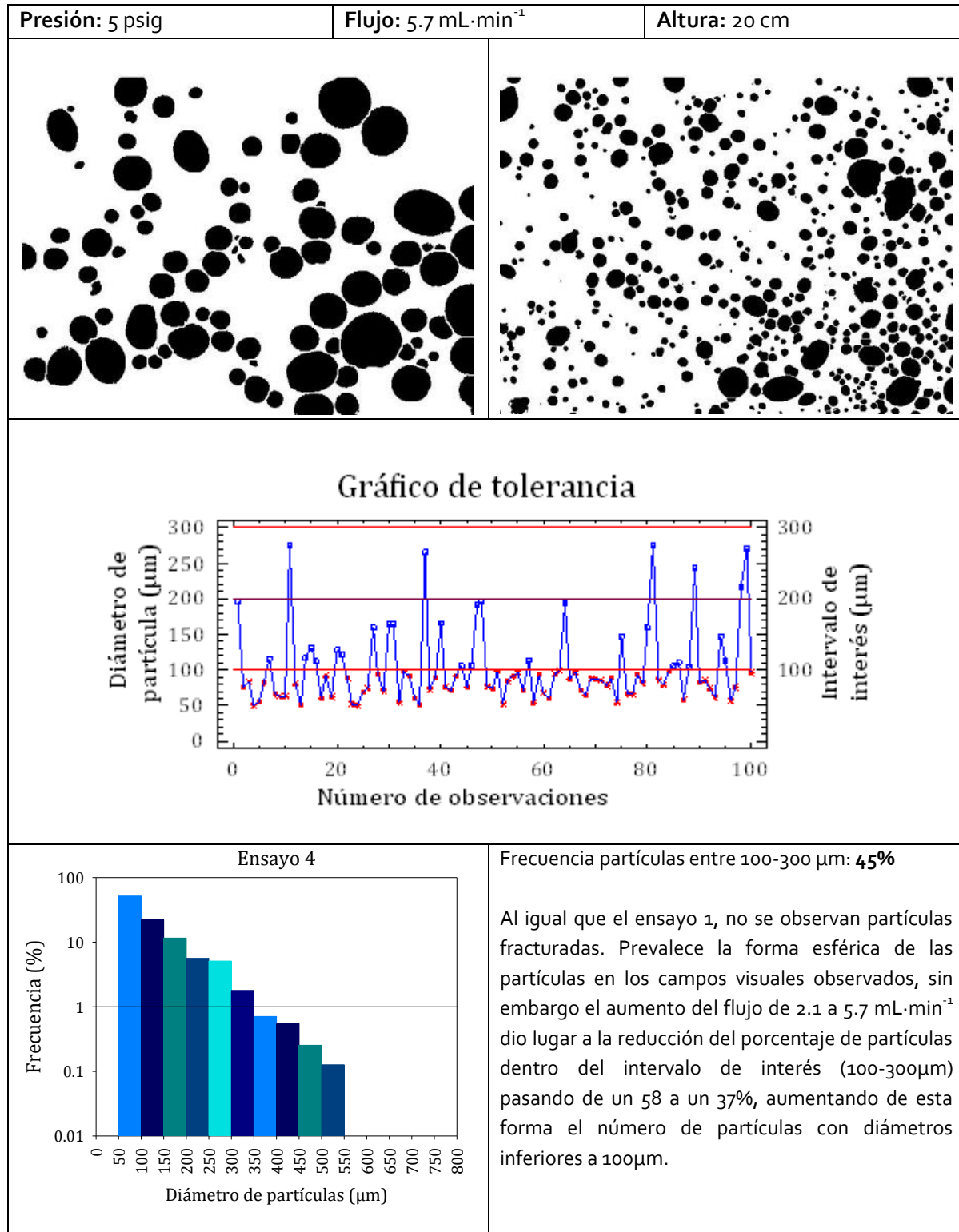


Tabla 3-15: Ensayo 5

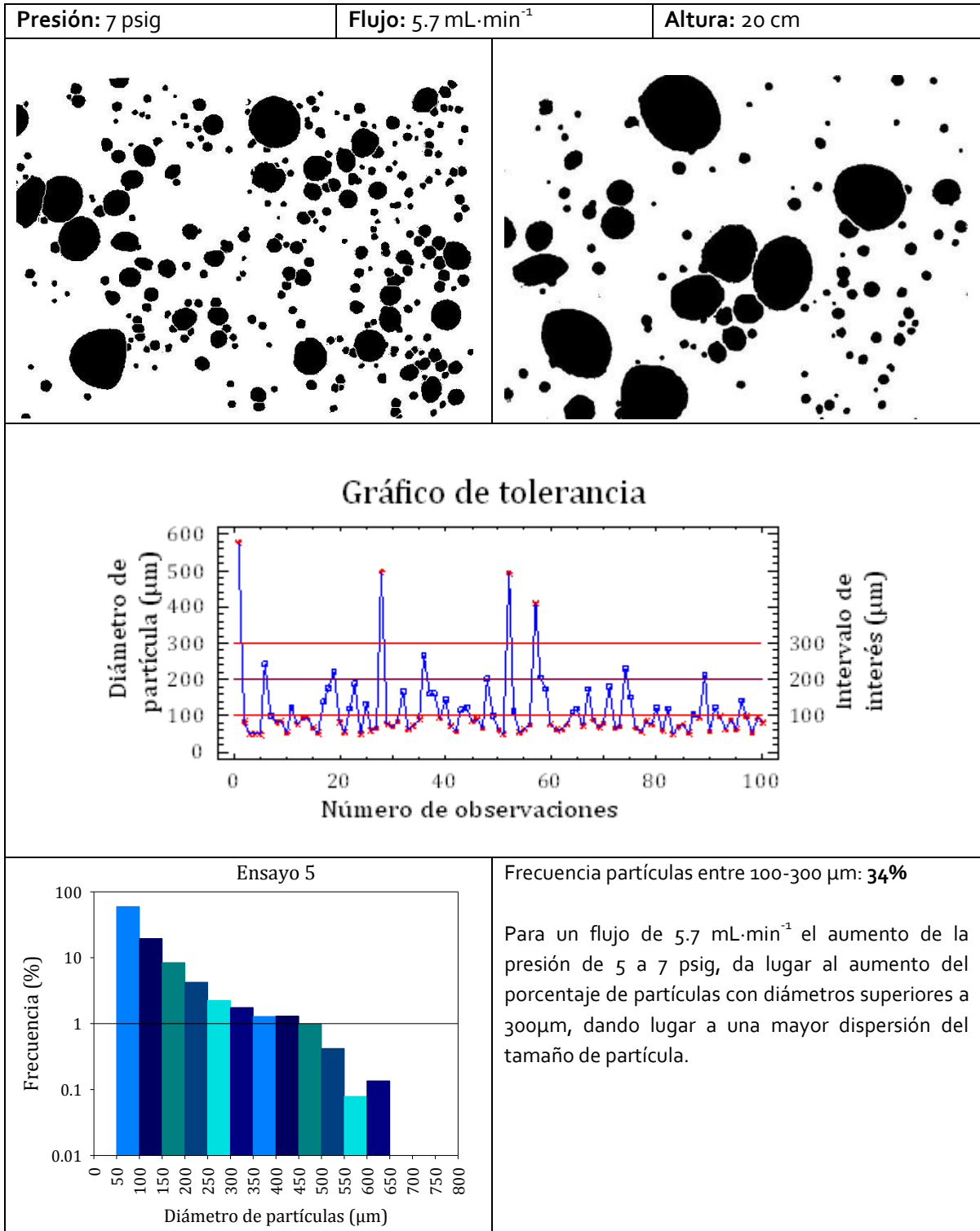


Tabla 3-16: Ensayo 6

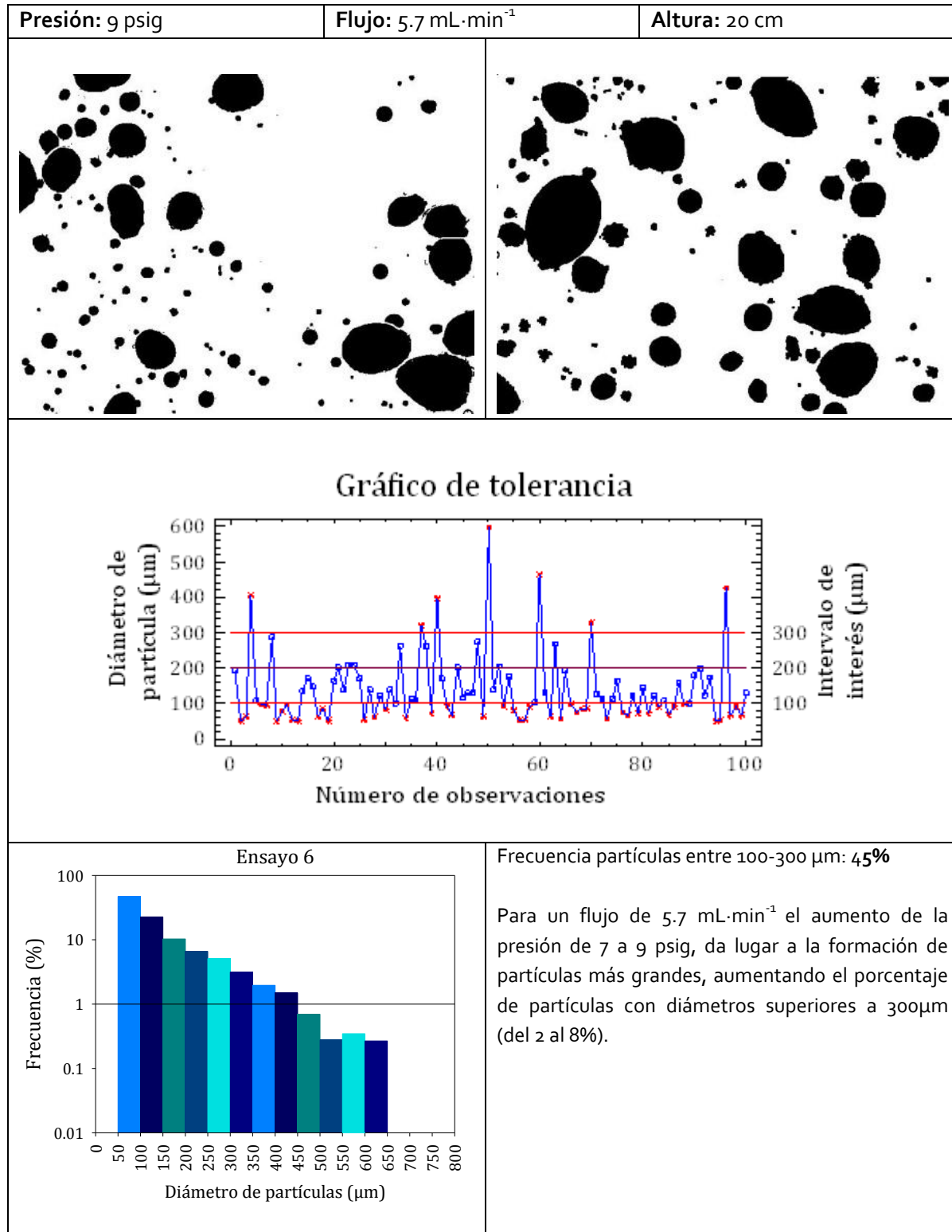


Tabla 3-17: Ensayo 7

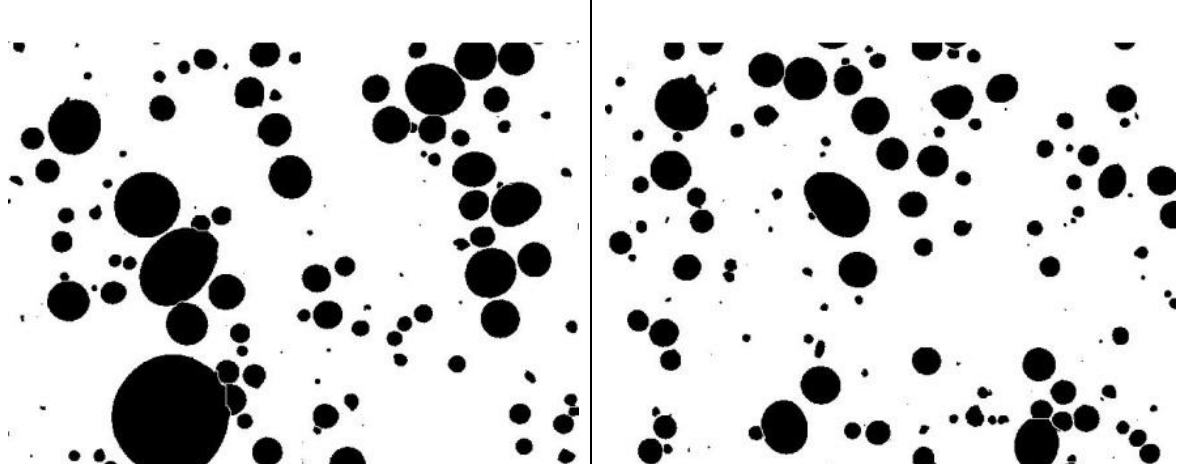
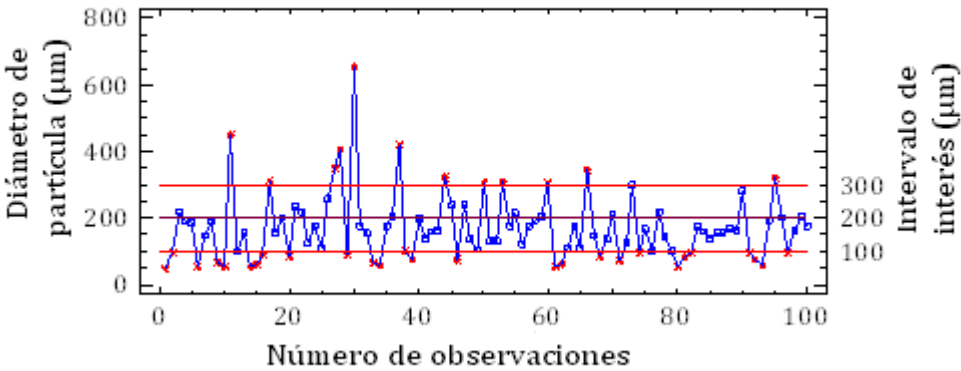
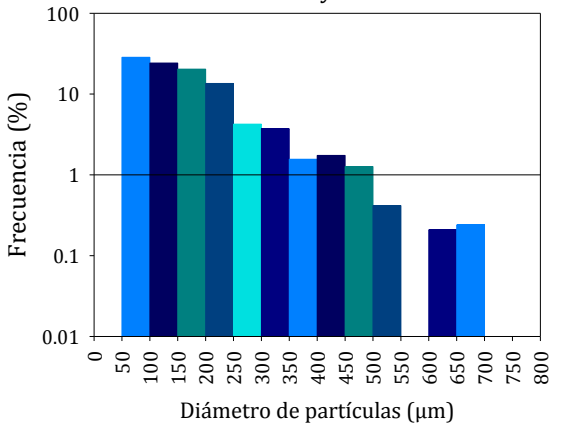
Presión: 5psig	Flujo: 2.1 mL·min ⁻¹	Altura: 30 cm
		
<p style="text-align: center;">Gráfico de tolerancia</p> 		
<p style="text-align: center;">Ensayo 7</p> 	<p>Frecuencia partículas entre 100-300 µm: 62%</p> <p>Se obtienen partículas de forma esférica bien definida. De todas las configuraciones evaluadas, ésta es la que arroja el mayor número de partículas dentro del intervalo de interés (100-300µm).</p> <p>Se observa que para los valores más bajos de presión (5psig) y flujo (2.1 mL·min⁻¹) evaluados, el incremento de la altura de la boquilla (de 20 a 30 cm) incide positivamente en la distribución del tamaño de partícula, obteniéndose mayor número de partículas en el intervalo deseado.</p>	

Tabla 3-18: Ensayo 8

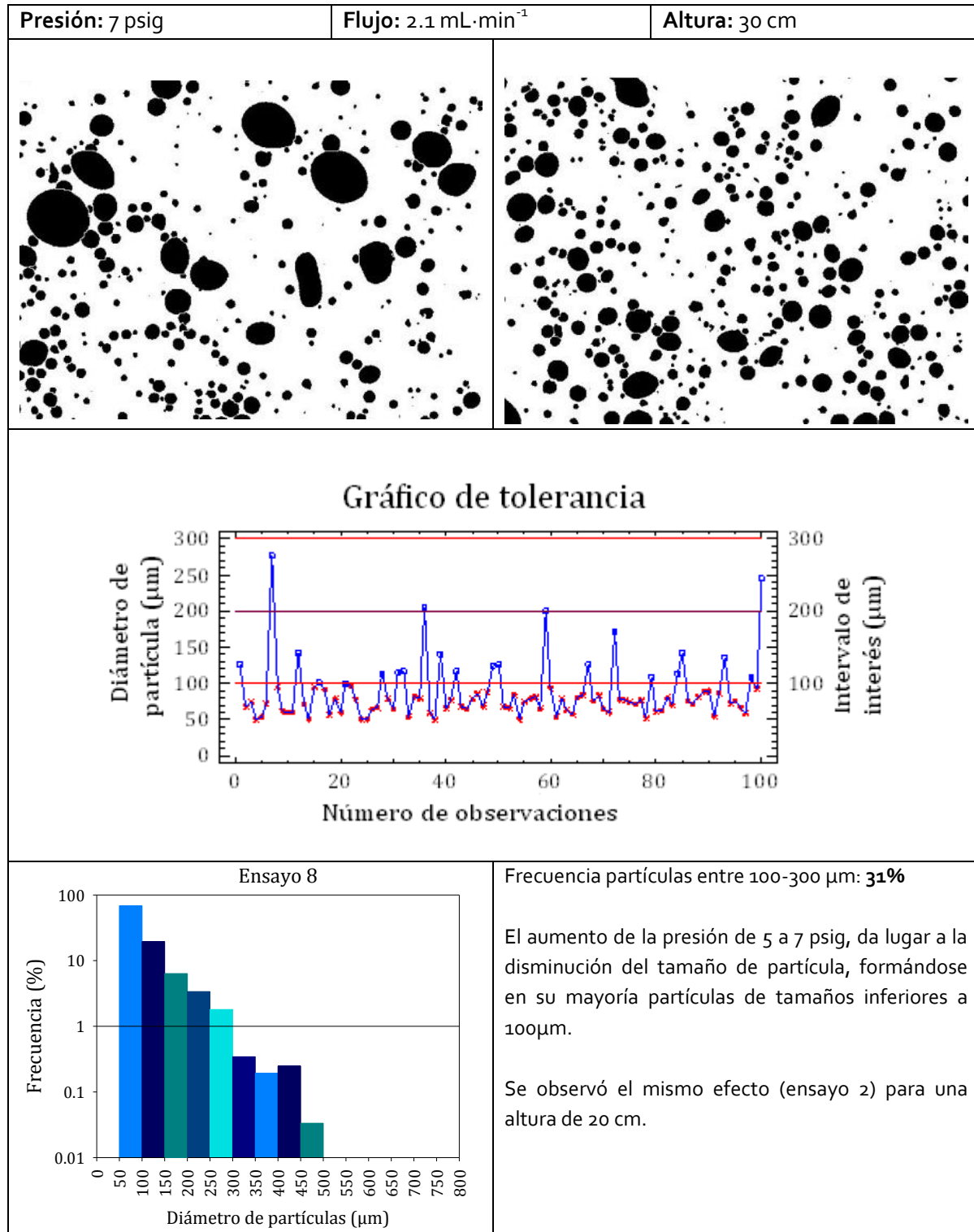


Tabla 3-19: Ensayo 9

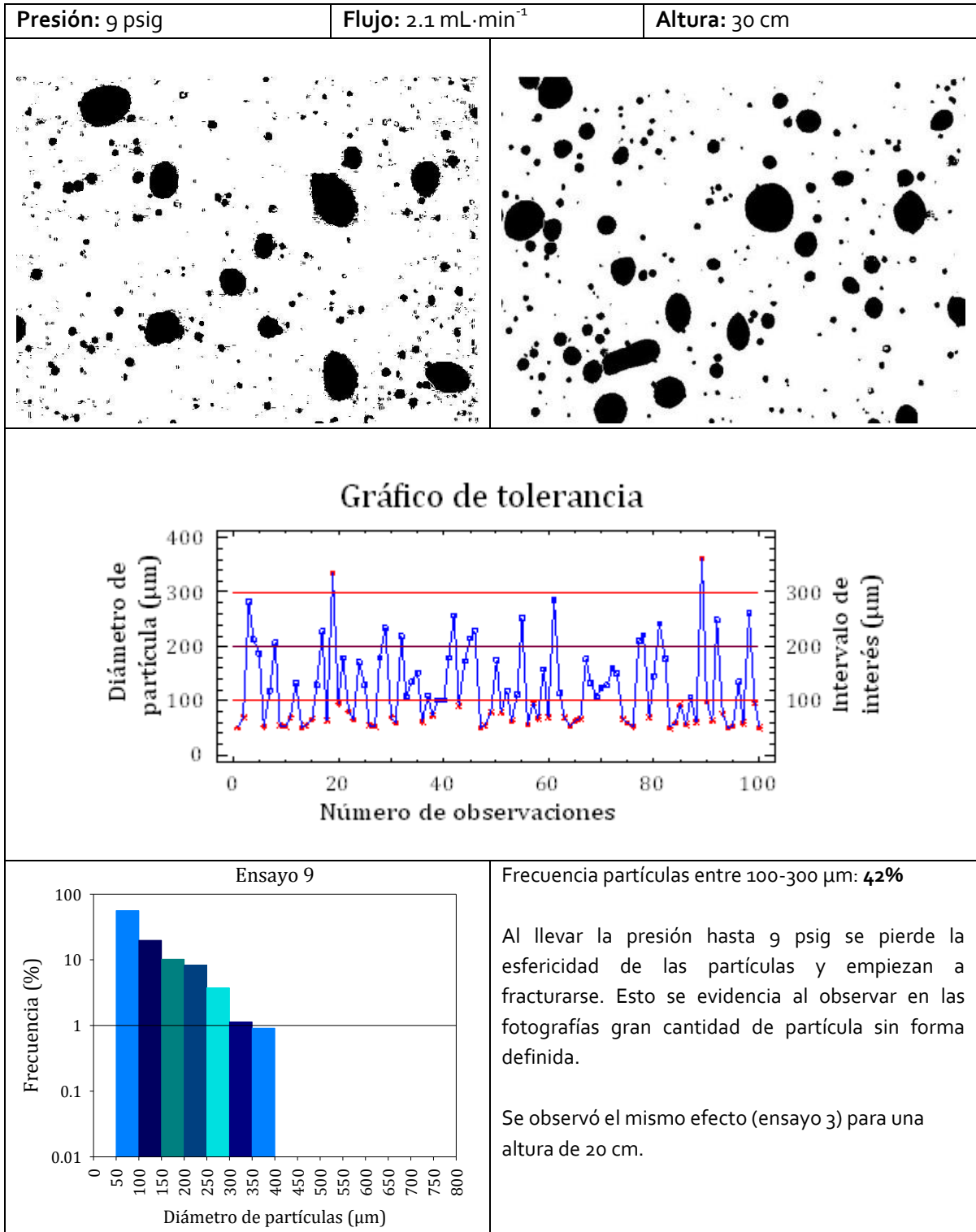


Tabla 3-20: Ensayo 10

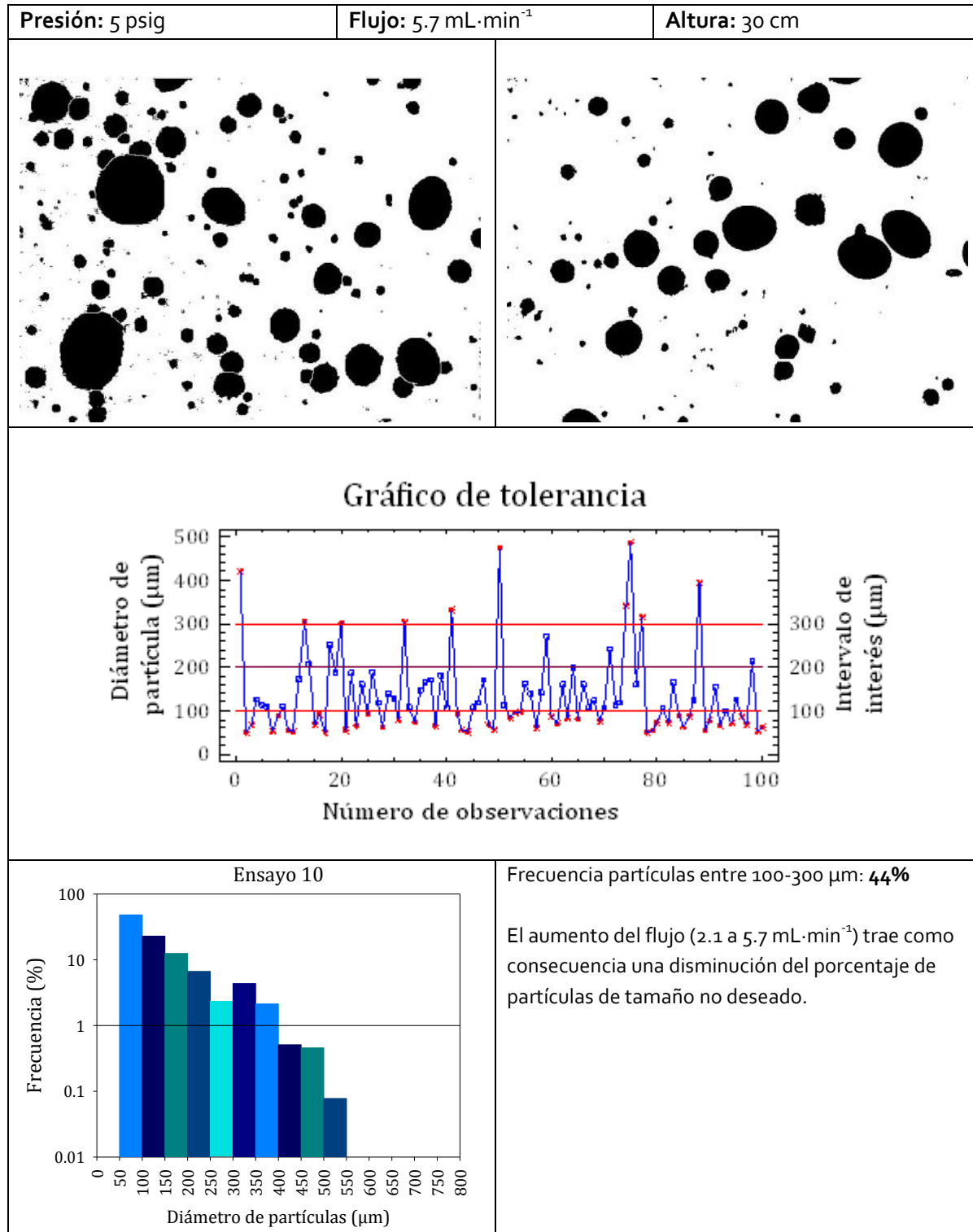


Tabla 3-21: Ensayo 11

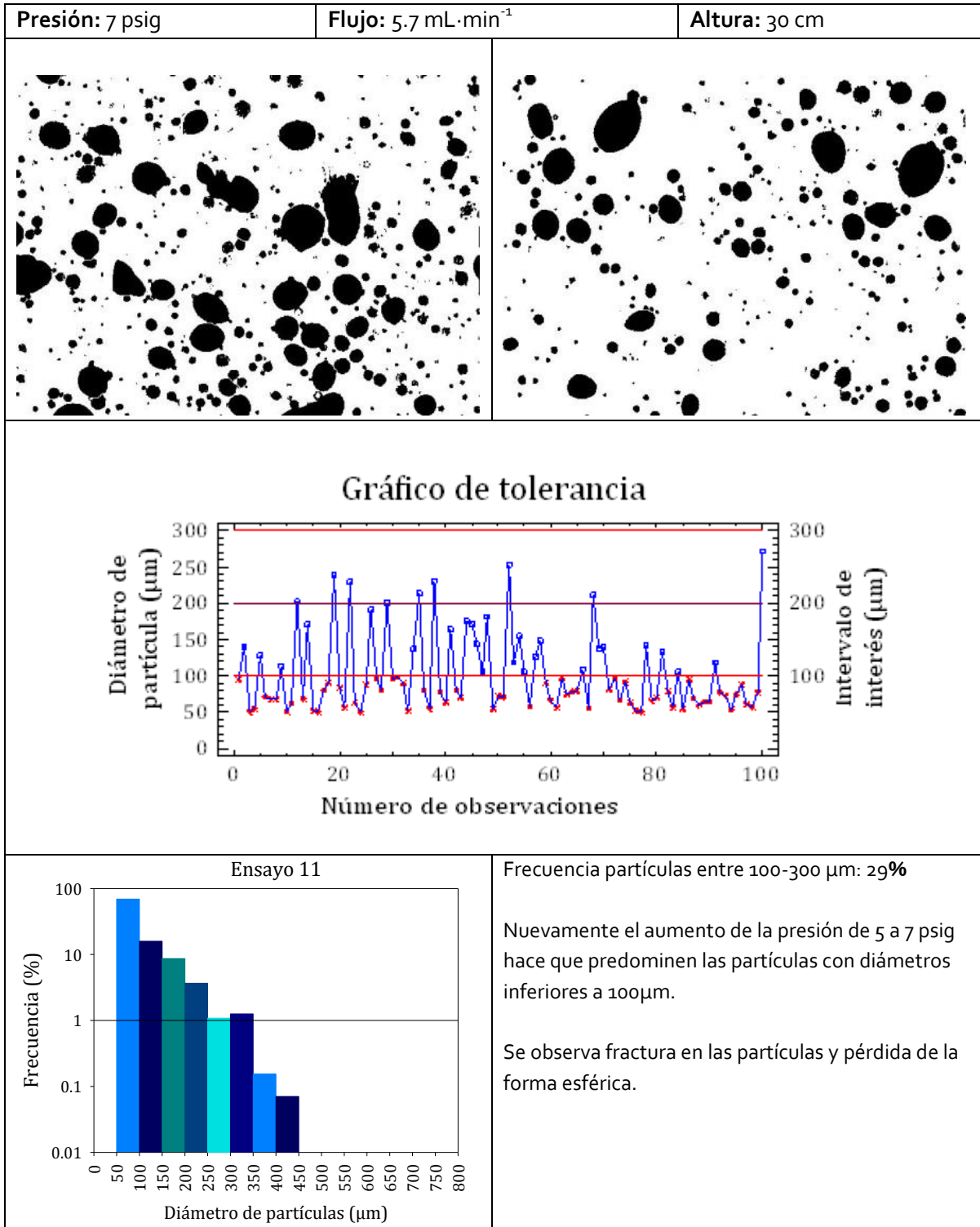
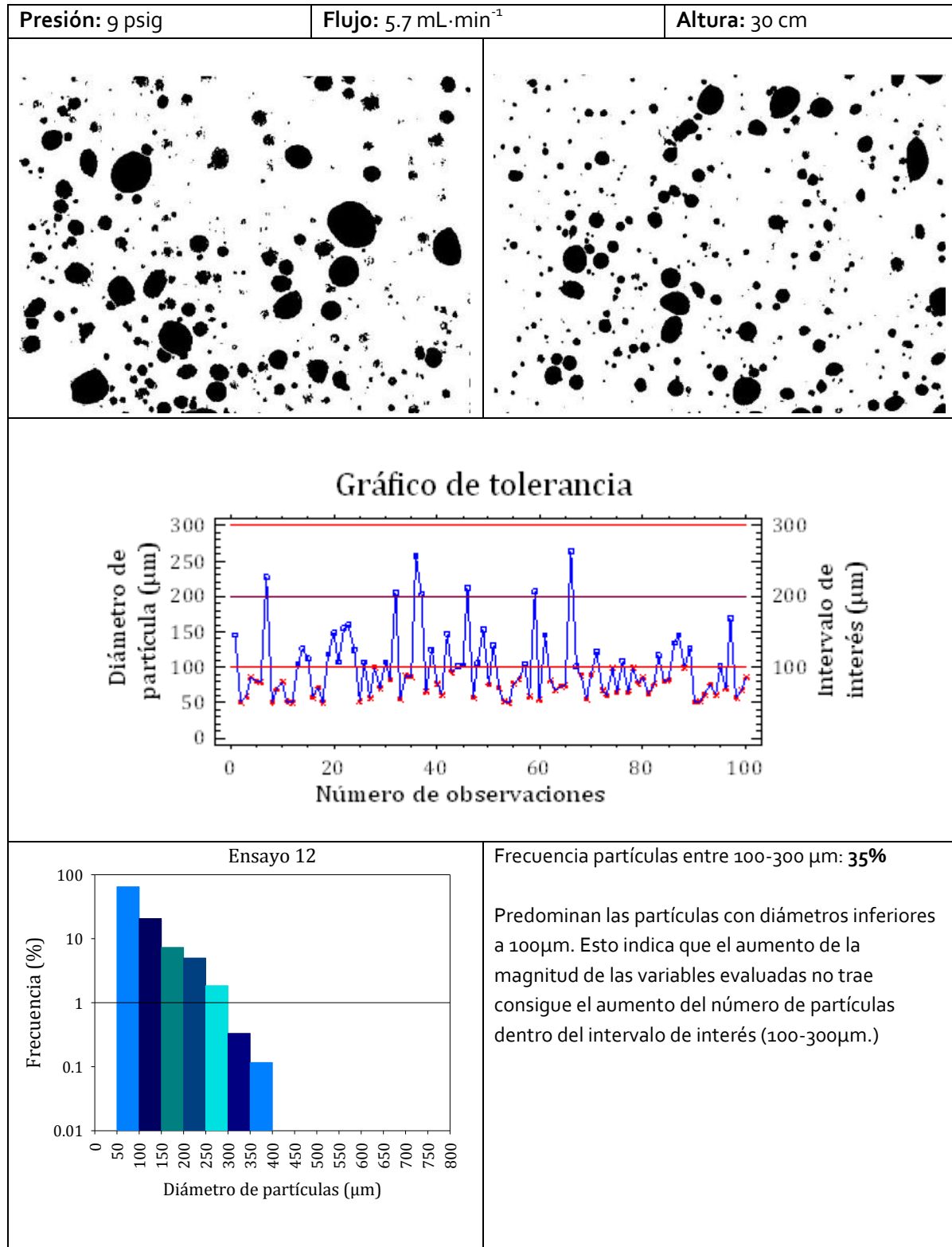


Tabla 3-22: Ensayo 12

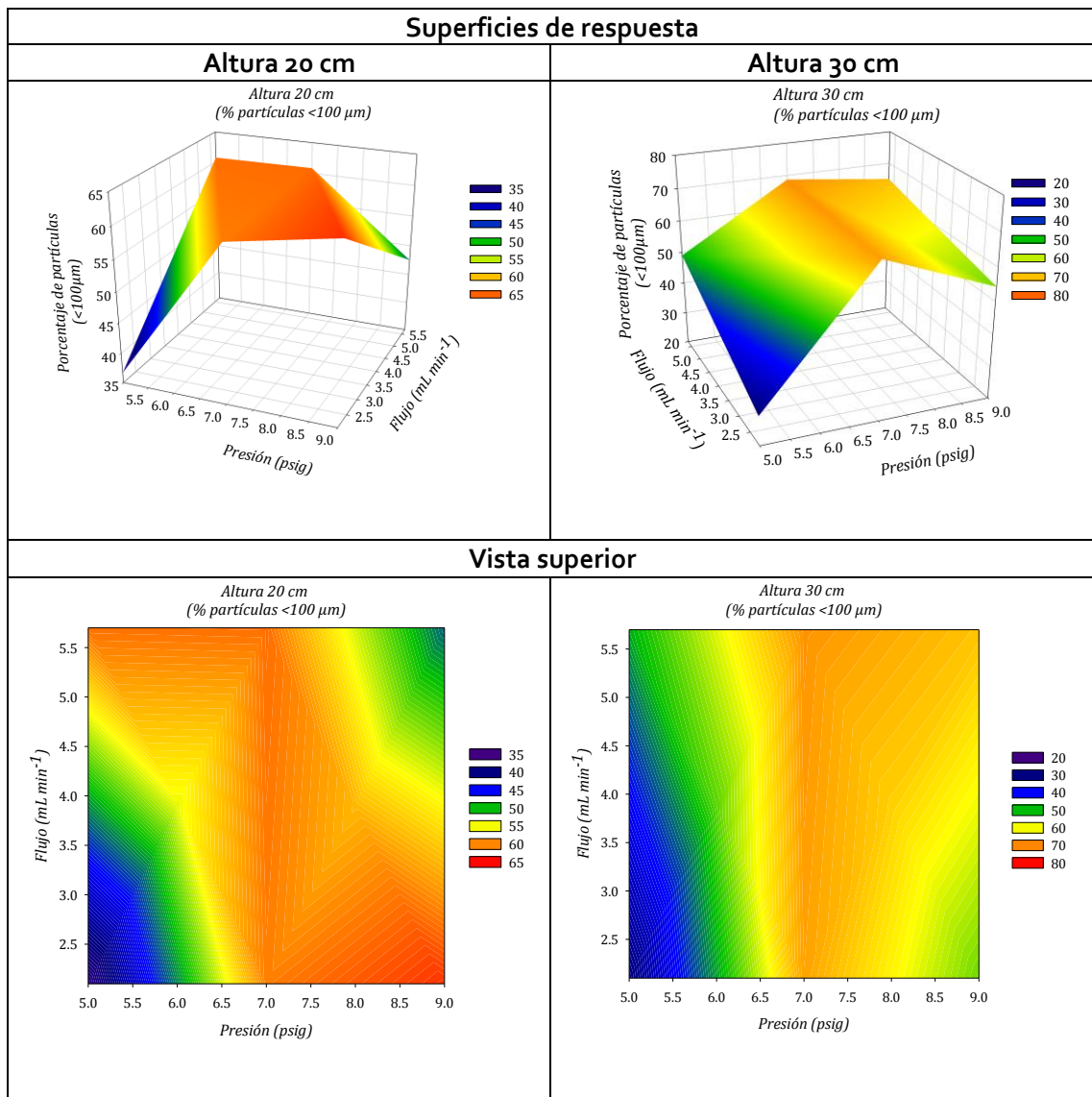


3.4.5 Distribución del tamaño de partícula

Se analizó la influencia de la presión de aire, el flujo de alginato y la altura de la boquilla en el tamaño de partícula, por segmentos de tamaño de partícula así:

- Porcentaje de partículas con diámetros inferiores a 100 μm .
- Porcentaje de partículas con diámetros entre 100 y 300 μm .
- Porcentaje de partículas con diámetros superiores a 300 μm .

Tabla 3-23: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros inferiores a 100 μm .



En la **Tabla 3-23** se presenta la superficie de respuesta obtenida al variar la presión de aire y el flujo de alginato, manteniendo la altura constante y se desea analizar el efecto de la presión, el

flujo y la altura sobre la frecuencia (%) de partículas con diámetros inferiores a 100 μm , para las dos alturas evaluadas (20 y 30 cm), con el objetivo de seleccionar aquellas condiciones que no favorezcan la formación de partículas de este tamaño, ya que se encuentran por fuera del intervalo de interés.

Se observa para ambas alturas que hay una región (naranja - rojo) común, a la presión de 7 psig para los tres flujos evaluados, en la que se favorece la formación de partículas con diámetros inferiores a 100 μm . Se debe evitar por tanto esta región, para lo cual se debería aumentar o disminuir la presión de salida de aire, que está directamente relacionada con la velocidad de flujo del mismo.

Si se aumenta la presión, se observa para ambas alturas, que el porcentaje de partículas con diámetros inferiores a 100 μm empieza a disminuir, pero no lo hace significativamente. Además, desde el punto de vista operativo, cuando se aumenta la presión de salida del aire, la solución de alginato golpea muy fuerte la solución de calcio y empiezan a generarse salpicaduras, lo cual no es aconsejable si lo que se requiere es replicar este procedimiento en condiciones estériles.

Del análisis de las figuras condensadas en la **Tabla 3-23** se concluye que es aconsejable emplear presiones de salida del aire inferiores a 7 psig. Así mismo, al comparar las vistas superiores de la superficie de respuesta de las dos alturas, se observa que para las condiciones más bajas de presión y flujo de salida de alginato, la condición de altura más apropiada es la de 30 cm, porque para estas condiciones **no se favorece** la formación de partículas con diámetros inferiores a 100 μm .

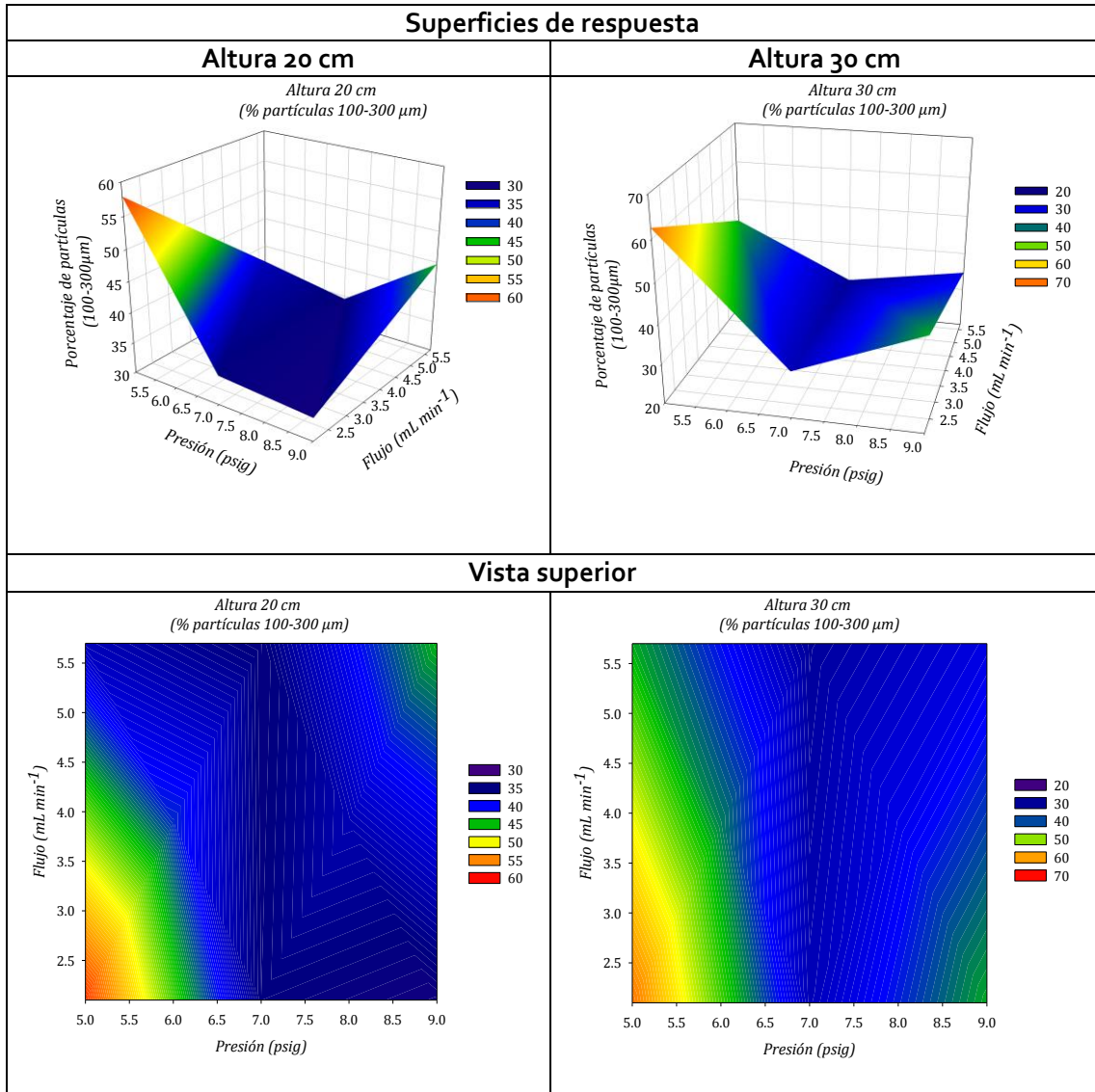
En la **Tabla 3-24** se presenta la superficie de respuesta para el **intervalo de interés (100 – 300 μm)**. El objetivo es seleccionar las condiciones de operación (**Tabla 3-7**) que permitan formar la mayor cantidad de partículas en el intervalo de interés y que a su vez sean extrapolables a condiciones estériles.

Al analizar las superficies de respuesta para las dos alturas se encuentra que las condiciones más favorables son la presión más baja evaluada (5 psig) y el flujo de alginato más bajo (2.1 mL min⁻¹) y para una altura de 30 cm se obtiene el mayor número de partículas en el intervalo deseado (65%). Así mismo, se observa que el aumento de la presión tiene un mayor efecto sobre el tamaño de partícula que el flujo de alginato.

En la **Tabla 3-25** se evalúan las condiciones de presión de aire, flujo de alginato y la altura de la boquilla que favorecen la obtención de partículas con diámetros mayores a 300 μm y que deben ser evitadas por encontrarse este tamaño por fuera del intervalo de interés. Se observa que el porcentaje de partículas en este intervalo es relativamente bajo y que su comportamiento no es consistente para las dos alturas evaluadas. Por una parte se observa que para la altura de 20 cm las condiciones menos favorables son el flujo más alto (2.1 mL min⁻¹) a la presión más baja (5 psig) y el flujo más bajo (5.7 mL min⁻¹) a la presión más alta (9 psig), mientras que para la altura de 30 cm, el porcentaje de formación de partículas con diámetros mayores a 300 μm se reduce

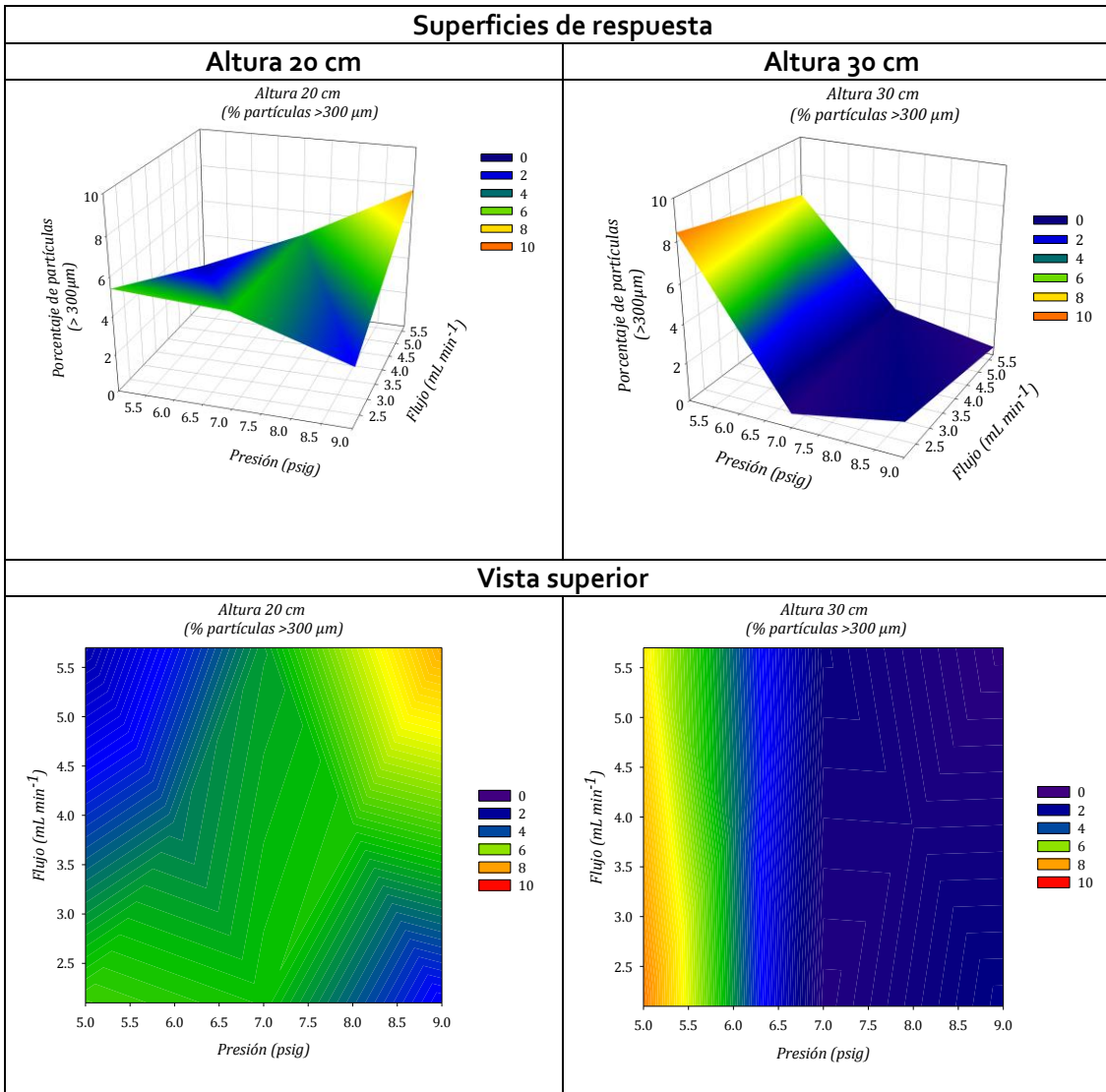
significativamente con el aumento de la presión independiente del flujo de alginato para las condiciones evaluadas.

Tabla 3-24: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros entre 100 y 300 μm .



Desde el punto de vista operativo, la formación de partículas con diámetros superiores a 300 μm ocurre porque al final de la prueba, con el objetivo de usar todo el alginato preparado, se permitía que la manguera que transportaba el alginato tomara aire y éste modificaba el patrón de flujo a la salida de la boquilla. Este efecto, sin embargo puede eliminarse o llegar a ser despreciable usando un lote de alimentación de líquido más grande

Tabla 3-25: Efecto de la presión, el flujo y la altura en la obtención de partículas con diámetros mayores a 300 μm .



3.4.6 Análisis económico del montaje empleado

En la **Tabla 3-26** se presentan los costos del montaje empleado para la elaboración de los microportadores. Al comparar estos costos con los Encapsulador B395 50/60 de BUCHI presentados en la **Tabla 3-27** se encuentra que los costos del sistema planteado corresponden a un 4% de los costos de un equipo comercial con la misma funcionalidad. Si bien el sistema planteado, es más complejo en cuanto a la operación, sus costos son considerablemente inferiores y esto justificaría su uso a nivel no sólo de investigación sino clínico.

Tabla 3-26: Costos del montaje empleado en la formación de los microportadores

Descripción	Referencia	Marca	Valor
Cuerpo de la boquilla	1/4J -SS	Spraying - Systems Co	248.820
Cabezal de salida de aire	PF40100-SS	Spraying - Systems Co	190,008
Cabezal de salida de líquido	PA140-1110	Spraying - Systems Co	223.486
Bomba peristáltica (0,75-65 mL min ⁻¹)	SN-77912-10	Cole Parmer	5.000,000
Manómetro (0 - 60 psig)	SN-07380-75	Cole Parmer	234.000
Compresor de aire	SN-07121-00	Cole Parmer	742.000
Manguera de silicona	Dow Corning - Silastic®	Dow Corning	30,000
Material de vidrio	Caja Petri Ø= 9 cm	Brand	50,000
Soporte universal y pinzas	N/A	N/A	60,000
		TOTAL (Incluido IVA)	6.778.314

Tabla 3-27: Costos Encapsulador B395 50/60 de BUCHI

Descripción	Referencia	Marca	Valor
Encapsulador en condiciones estériles	B395 50/60 Hz 100/240 V	BUCHI	149.132.500
Set de boquillas concéntricas	Boquillas externas con aberturas de alta precisión n de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5,0,6, 0,7, y 0,9 mm fabricadas en acero inoxidable	BUCHI	22.850,000
		TOTAL(Incluido IVA)	171.982.500

3.5 Conclusiones

Del análisis de la distribución de tamaño de partícula para las diferentes condiciones de presión de salida de aire, flujo de alimentación de alginato y altura de la boquilla evaluadas, se concluye que las condiciones que favorecen la formación de partículas con diámetros dentro del intervalo de interés (100 – 300 µm) son:

Presión de salida del aire: 5 psig

Flujo de alginato: 2.1 mL min⁻¹

Altura de la boquilla: 30 cm

Desde el punto de vista operativo, las condiciones seleccionadas son extrapolables a condiciones estériles para la elaboración de microportadores con mezclas de alginato de sodio con plasma humano crio concentrado (PHCC), ya que no se generan salpicaduras y el espacio y las condiciones son fácilmente alcanzables en un ambiente estéril. La metodología desarrollada presenta ventajas respecto a otros sistemas comerciales disponibles, como el Encapsulador B395 50/60 de BUCHI, debido a su bajo costo, lo que lo hace accesible y atractivo para el sistema de salud.

3.6 Referencias

- Alfred, R.; Taiani, J.T.; Krawetz, R.J.; Yamashita, A.; Rancourt, D.E. and Kallos, M.S. (2011). Large-scale production of murine embryonic stem cell-derived osteoblasts and chondrocytes on microcarriers in serum-free media. *Biomaterials*. **32**: 6006-6010.
- Andreas, K.; Zehbe, R.; Kazubek, M.; Grzeschik, K.; Sternberg, N.; Bäuml, H.; Schubert, H.; Sittlinger, M. and Ringe, J. (2011). Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. **7**: 1485-1495.
- Chen, A.K.-L.; Chen, X.; Choo, A.B.H.; Reuveny, S. and Oh, S.K.W. (2011). Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. **7**(2): 97-111.
- Chen, X.-G.; Liu, C.-S.; Liu, C.-G.; Meng, X.-H.; Lee, C.M. and Park, H.-J. (2006). Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. **27**: 269-274.
- Eibes, G.; dos Santos, F.; Andrade, P.Z.; Boura, J.S.; Abecasis, M.M.A.; da Silva, C.L. and Cabral, J.M.S. (2010). Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*. **146**(4): 194-197.
- Gustafson, C.-J.; Birgisson, A.; Junker, J.; Huss, F.; Salemark, L.; Johnson, H. and Kratz, G. (2007). Employing human keratinocytes cultured on macroporous gelatin spheres to treat full thickness-wounds: An in vivo study on athymic rats. *Burns*. **33**(6): 726-735.
- Hu, A.Y.-C.; Weng, T.-C.; Tseng, Y.-F.; Chen, Y.-S.; Wu, C.-H.; Hsiao, S.; Chou, A.-H.; Chao, H.-J.; Gu, A.; Wu, S.-C.; Chong, P. and Lee, M.-S. (2008). Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine*. **26**(45): 5736-5740.
- Huang, S.; Deng, T.; Wang, Y.; Deng, Z.; He, L.; Liu, S.; Yang, J. and Jin, Y. (2008). Multifunctional implantable particles for skin tissue regeneration: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*. **4**(4): 1057-1066.
- Hundt, B.; Best, C.; Schlawin, N.; Kaßner, H.; Genzel, Y. and Reichl, U. (2007). Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave® Bioreactor microcarrier culture in 1-10L scale. *Vaccine*. **25**(20): 3987-3995.
- Lau, T.T.; Wang, C. and Wang, D.-A. (2010). Cell delivery with genipin crosslinked gelatin microspheres in hydrogel/microcarrier composite. *Composites Science and Technology*. **70**(13): 1909-1914.
- Malda, J. and Frondoza, C.G. (2006). Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. *Trends in Biotechnology*. **24**(7): 299-304.
- Mazzitelli, S.; Luca, G.; Mancuso, F.; Calvitti, M.; Calafiore, R.; Nastruzzi, C.; Johnson, S. and Badylak, S.F. (2011). Production and characterization of engineered alginate-based microparticles

containing ECM powder for cell/tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. **7**(3): 1050-1062.

Park, Y.; Subramanian, K.; Verfaillie, C.M. and Hu, W.S. (2010). Expansion and hepatic differentiation of rat multipotent adult progenitor cells in microcarrier suspension culture. *Journal of Biotechnology*. **150**(1): 131-139.

Petiot, E.; Bernard-Moulin, P.; Magadoux, T.; Gény, C.; Pinton, H. and Marc, A. (2010). In situ quantification of microcarrier animal cell cultures using near-infrared spectroscopy. *Process Biochemistry*. **45**(8): 1427-1431.

Santiago, P.A.; Giordano, R.d.C. and Torres Suazo, C.A. (2011). Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers. *Process Biochemistry*. **46**: 35-45.

Seland, H.; Gustafson, C.-J.; Johnson, H.; Junker, J.P.E. and Kratz, G. (2011). Transplantation of acellular dermis and keratinocytes cultured on porous biodegradable microcarriers into full-thickness skin injuries on athymic rats. *Burns*. **37**(1): 99-108.

Sinha, V.R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K. and Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. **274**(1-2): 1-33.

Sommar, P.; Pettersson, S.; Ness, C.; Johnson, H.; Kratz, G. and Junker, J.P.E. (2010). Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatine microcarriers. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. **63**(6): 1036-1046.

Souza, M.C.O.; Freire, M.S.; Schulze, E.A.; Gaspar, L.P. and Castilho, L.R. (2009). Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. *Vaccine*. **27**(46): 6420-6423.

Spraying-Systems-Co. (2012). "Catálogo de productos." Consultado el 5 de abril del 2011, de la página web http://es.spray.com/Descargas/Cat%C3%A1logo_70_.aspx.

Tashiro, S.; Tsumoto, K. and Sano, E. (2012). Establishment of a microcarrier culture system with serial sub-cultivation for functionally active human endothelial cells. *Journal of Biotechnology*. **160**(3-4): 202-213.

Wang, C.; Gong, Y.; Lin, Y.; Shen, J. and Wang, D.-A. (2008). A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery. *Acta Biomaterialia*. **4**(5): 1226-1234.

Wen, Y.; Ramos Gallego, M.; Feldskow Nielsen, L.; Jorgensen, L.; Everland, H.; Moller, E.H. and Nielsen, H.M. (2011). Biodegradable nanocomposite microparticles as drug delivering injectable cell scaffolds. *Journal of Controlled Release*. **156**: 11-20.

Yang, Y.; Rossi, F.M.V. and Putnins, E.E. (2007). Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*. **28**(20): 3110-3120.

Yang, Y.; Rossi, F.M.V. and Putnins, E.E. (2010). Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. **31**(33): 8574-8582.

4. Cultivo celular sobre el material de soporte

4.1 Resumen

En el presente capítulo se describe la metodología empleada para la evaluación de la adhesión celular y la citotoxicidad tanto en geles planos hechos de PHCC y sus respectivas mezclas con alginato de sodio (al 0,5% y 1,0 % p/v), como en microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v. La citotoxicidad de los materiales se determinó empleando el procedimiento descrito en la norma ISO 10993-5 para dispositivos médicos que involucra la elución de extractos del material y su aplicación en un cultivo celular seguida por conteo por MTT. Los resultados indican que ninguno de los materiales evaluados resultó citotóxico. Igualmente se presenta la evaluación de la adhesión celular empleando técnicas de microscopía confocal y fluorescencia, usando Hoechst® para la tinción de los núcleos y CFSE® para la tinción del citoplasma de fibroblastos murinos de la línea celular L929; se encontró que las células se adhirieron en todos los soportes seleccionados, incluyendo los microportadores.

4.2 Introducción

4.2.1 Adhesión celular

La adhesión celular, ya sea a otra célula o a alguna superficie (matriz), es un proceso que contribuye a diversas funciones vitales para los seres vivos: permite la inmovilización de organismos en superficies para efectos de protección y alimentación; también permite la formación de conglomerados de células especializadas que resulta en diferentes tejidos, órganos y estructuras de soporte. Por lo tanto, la adhesión celular permite la existencia de seres multicelulares.

In vivo, existe una amplia variedad de moléculas involucradas en los procesos de adhesión; estas moléculas son principalmente de tipo proteico. La adhesión celular sucede cuando las proteínas localizadas en la membrana celular (receptores de adhesión) se anclan a macromoléculas de la matriz extracelular (GE-Healthcare, 2005).

Existen cuatro familias de receptores de adhesión celular :

- **Integrinas:** permiten la adhesión entre la célula y la matriz extracelular. Son dependientes de Ca^{+2} .
- **Cadherinas:** permiten la adhesión entre una célula y otra. Son dependientes de Ca^{+2} .
- **Moléculas de adhesión celular de la superfamilia de Inmunoglobulinas:** moléculas de adhesión celular (como la N-CAM) involucradas en interacciones homofílicas y son independientes de Ca^{+2} .
- **Selectinas:** esta familia de proteínas enlazan oligosacáridos específicos de la superficie de otras células y juegan un papel importante en la adhesión heterofílica célula-célula. Son dependientes de Ca^{+2} .

Existen dos clases principales de macromoléculas que conforman la matriz extracelular en vertebrados (GE-Healthcare, 2005):

- **Glicosaminoglicanos (GAG),** que son cadenas de polisacáridos lineales cargadas negativamente y compuestos de unidades repetidas de disacáridos (ácido urónico + aminoazúcar sulfatado). Los GAG usualmente están ligados covalentemente a proteínas, en cuyo caso se denominan **proteoglicanos**.
- **Proteínas fibrosas de dos tipos funcionales:** estructural (como el colágeno y la elastina) y adhesivo (como la laminina y la fibronectina). El colágeno es el mayor componente de la matriz extracelular *in vivo*, por lo que las células se unen fuertemente a esta proteína; esta unión sin embargo, está mediada por proteínas adhesivas, como la fibronectina, la cual se enlaza fuertemente al colágeno, y son los receptores celulares, las integrinas, los que reconocen y enlazan la fibronectina. Esta última, está conformada por dos subunidades, cada una de las cuales tiene una serie de dominios con una configuración cilíndrica; estos dominios consisten de módulos más pequeños con una secuencia de aminoácidos que se repite; la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp o RGD) es la secuencia responsable de la interacción de la fibronectina con las integrinas (Mulder, 2002). Otras variaciones del sitio de reconocimiento de la fibronectina (RGDS, RGDV, RGDT entre otras) también son reconocidas y contribuyen a la adhesión celular (Hirano *et al.*, 1993).

In vitro, la adhesión de las células a la superficie de cultivo es de vital importancia; dado que la proliferación de las células que requieren anclaje solo ocurre después de que hay adhesión (Grinnell & Hays, 1978) es imperativo usar superficies de cultivo que promuevan todos los pasos involucrados en la adhesión.

La adhesión celular usualmente sigue cuatro etapas (GE-Healthcare, 2005):

- 1- En la primera etapa hay una unión física inespecífica a la superficie; esta adsorción está basada en términos de carga eléctrica e hidrofiliidad. Aunque las células tienen una carga superficial negativa (debido a los grupos fosfato de los fosfolípidos que conforman

la membrana), ésta está distribuida heterogéneamente pues es afectada por la presencia de moléculas tipo receptores proteínicos; por ello, aunque se crea que la superficie de unión debe tener carga positiva, diversos autores han demostrado que las células pueden crecer en superficies cargadas positivamente (por ejemplo, superficies cubiertas con poli-lisina) o negativamente (por ejemplo vidrio o materiales plásticos como el poliestireno, policarbonato, pvc o teflón) (Horng, 1975; Maroudas, 1975; van Wezel, 1976; Grinnell & Hays, 1978). En cuanto al carácter hidrófilico, los materiales plásticos deben ser sometidos a tratamientos químicos (oxidación o reacción con ácidos orgánicos fuertes) o físicos (alto voltaje, UV, bombardeo de electrónico) para lograr que sean humectables pues de otra manera las células no se adhieren. Finalmente, en esta etapa también se adsorben sobre la superficie proteínas presentes en el medio, como la fibronectina o vitronectina, las cuales juegan un papel crucial en etapas posteriores.

- 2- En la segunda etapa, las células aparecen aplanadas pero aún conserva su forma esférica. La adherencia es mayor debido a la mayor área de contacto físico entre la célula y la superficie y al establecimiento de enlaces entre los receptores celulares y las proteínas adsorbidas en la superficie ((Horng, 1975; Maroudas, 1975; van Wezel, 1976; Grinnell & Hays, 1978)
- 3- En la tercera etapa la célula continúa aplanándose y sintetiza Glucosaminoglucanos (por ejemplo, heparán sulfato multivalente) que sirven para establecer enlaces más específicos; los enlaces previamente formados entre los receptores y las proteínas adsorbidas en superficie (como la fibronectina) causan un cambio en el dominio citoplasmático del receptor, induciendo agregación de receptores y mayor formación de enlaces.
- 4- En la cuarta etapa la célula está extremadamente plana y completamente unida a la superficie.

Como se esbozó en la etapa 1, la adhesión no solo está determinada por las características de la superficie sino también por las características del medio de cultivo; entre éstas sobresale la presencia de proteínas y de cationes divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2}). Aunque algunas líneas celulares (por ejemplo fibroblastos diploides) secretan cantidades significativas de fibronectina (Grinnell & Feld, 1980) otras líneas celulares secretan cantidades muy pequeñas de dicha proteína (PM = 220000), por lo que se requiere su suplementación en el medio ya sea en forma purificada (de 1 – 50 μg fibronectina/mL) o por adición de 10% de suero fetal bovino (2 – 3 μg fibronectina/mL) para que ocurra la adhesión (Hughes *et al.*, 1979); en estos casos, antes de adicionar las células, es práctica común poner en contacto la superficie del plato de cultivo con el medio que contiene la fibronectina, mucha de la cual se adsorbe en pocos minutos (Grinnell *et al.*, 1977).

De otro lado, la vitronectina (PM = 65000) parece ser más potente y actuar a menores concentraciones que la fibronectina para favorecer la adhesión, también se encuentra presente en el suero o es producida por un número de líneas celulares. Otras proteínas que no se encuentran presentes en el suero incluyen el colágeno (tipos I y IV), la laminina y la trombospondina, las cuales a veces se agregan separadamente para cubrir la superficie de cultivo ya que interactúan con ciertos receptores tipo integrinas presentes en la superficie celular. La necesidad de los cationes divalentes radica en su utilidad como cofactores para la unión integrina-fibronectina o integrina-vitronectina (GE-Healthcare, 2005).

4.2.2 Cultivo de células animales en microportadores

Los microportadores son diminutas esferas (usualmente con diámetros en el intervalo de 90 a 300 μm), cuya superficie debe promover adhesión para facilitar el crecimiento de células que requieren de anclaje. El principal beneficio del uso de microportadores es la gran relación de superficie/volumen comparado con sistemas tradicionales de cultivo como frascos T, lo que permite el cultivo de grandes cantidades de células con una densidad elevada en sistemas de compactos, reduciendo significativamente la contaminación por manipulación y las necesidades de medio y aumentando la productividad debido al mejor control de las condiciones de cultivo.

Existen diferentes tipos de microportadores ofrecidos por un número de compañías comerciales. *General Electric Health Care* ofrece Citodex 1 (basado en una matriz de dextrano substituido con DEAE), Citodex 3 (basado en una matriz de dextrano recubierta con colágeno denaturado), Cytopore (microportador de alta porosidad basado en celulosa entrecruzada) y Cytoline (microportador macroporoso basado polietileno de alta densidad y sílica) (GE-Healthcare, 2005). *SoloHill Engineering Inc.* también ofrece una amplia variedad de microportadores basados en poliestireno cubierto de una serie de moléculas incluyendo sílica, diversos cationes, proteínas recombinantes con motivos RGD y colágeno porcino tipo 1. Debido a que cada tipo celular tiene requerimientos específicos para adhesión y crecimiento, el tipo de microportador debe ser seleccionado experimentalmente; esto es especialmente cierto si se utiliza un ambiente con altos esfuerzos cortantes, como los existentes en cultivos en suspensión o en un biorreactor (SoloHill-Eng-Inc., 2013).

Desde su concepción por van Wezel (1968), los microportadores han sido ampliamente usados para el cultivo y amplificación de diferentes tipos de células adherentes. Ejemplos incluyen la expansión de células para la producción a gran escala de factores de crecimiento, vacunas (Meignier *et al.*, 1980; Aunins *et al.*, 1997), anticuerpos (Shirokaze *et al.*, 1997), células madre (Phillips *et al.*, 2008a), virus (Genzel *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Hundt *et al.*, 2007).

El uso de microportadores en biorreactores bien agitados para mejorar significativamente la expansión es ampliamente utilizado para la poliferación de distintos tipos celulares, entre los que se destacan: hueso (Park *et al.*, 2013), hígado (Palakkan *et al.*, 2013), células madre (Zhou *et al.*, 2013), cartílago (Mercier *et al.*, 2005) y tejido cardíaco (Reichardt *et al.*, 2013), entre otros. En

todos los casos, tanto la densidad celular de siembra como la distribución de células en el soporte son esenciales, puesto que una distribución heterogénea de células en el soporte puede afectar las propiedades del tejido (Pörtner *et al.*, 2005).

A pesar de su probada eficacia en términos del crecimiento celular, la presencia de poliestireno, polietileno, celulosa o dextrano en los microportadores disponibles comercialmente se considera inconveniente para efectos de un equivalente dérmico puesto que estos elementos quedarían insertos en dicho equivalente. Aunque es posible cosechar las células y retirar el microportador utilizando tripsina u otro tipo de proteasa equivalente, es importante considerar que la adición de estas sustancias impone un estrés adicional a las células y alarga el tiempo de obtención del equivalente. Es por esta razón que el presente proyecto considera la fabricación de microportadores de fibrina, en los cuales realizar el crecimiento celular en condiciones óptimamente controladas y a mayor velocidad; y una vez expandidas las células, los microportadores quedarían embebidos en una capa del equivalente dérmico basado en el mismo material. El éxito de esta aproximación se basa en dos premisas:

- 1- Las células efectivamente se adhieren y se multiplican homogéneamente en la superficie del microportador.
- 2- El material con el cual está hecho el microportador estimula el crecimiento celular.

En el presente capítulo se evalúa cada una de estas dos premisas, como requisito para la continuación del desarrollo de un equivalente dérmico.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Plasma sanguíneo humano crioconcentrado (PHCC)

Se emplearon 50 unidades de PHCC (c/u de 17-20 mL aprox.), las cuales fueron suministradas por el Hemocentro Distrital de Bogotá (Colombia). Las unidades de PHCC fueron transferidas desde el Hemocentro (en donde se mantienen almacenadas a -70°C) hasta el laboratorio en una nevera que se mantuvo a -20°C ; al llegar al laboratorio, las unidades fueron descongeladas sumergiendo las bolsas en un baño termostático a 37°C . Una vez alcanzada dicha temperatura, se revisó cada unidad y se descartaron aquellas que presentasen cualquier signo de material precipitado. El contenido de todas las unidades restantes se mezcló en condiciones estériles para formar un lote homogéneo de manera que cualquier variación de los resultados por efecto de diferencias en las características del PHCC pudiese ser descartada. Este lote fue dividido en alícuotas de 25 mL, las cuales fueron almacenadas en tubos Falcon transparentes de 50 mL y congeladas a -20°C hasta el momento de su uso. Los tubos fueron cubiertos exteriormente con Parafilm® M (Structure Probe, Inc., West Chester, USA) para reducir los riesgos de contaminación.

4.3.2 Alginato de sodio 3% p/v.

Se disolvieron 31,02 gramos de alginato de sodio (Sigma-Aldrich A2033, Saint Louis MO, USA) en 700 mL de agua destilada. Se sometió a agitación magnética y a calentamiento (50°C) durante 12 horas, para favorecer la disolución del alginato de sodio. Transcurrido este tiempo se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas para permitir el ascenso de burbujas de aire atrapadas y luego se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada en un matraz aforado para obtener una solución de alginato de sodio 3% p/v. Dicha solución fue sometida a un proceso de esterilización por calor empleando un autoclave a 15 psig (25,8 psia) durante 30 minutos. La solución de alginato se mantuvo refrigerada a 4 °C y se descartó luego de un mes de preparada.

4.3.3 Solución de CaCl₂ al 3% p/v

Se preparó una solución de CaCl₂ (3% p/v) mediante dilución de 39,74 g de CaCl₂·2H₂O (Carlo Erba Reagents Ref: 433381,, Rodano, France) en 700 mL agua destilada, agitando con una varilla de vidrio hasta completa disolución; una vez disuelto el CaCl₂·2H₂O, la solución se llevó a un matraz aforado de 1000 mL y se completó a volumen con agua destilada, para dar lugar a una solución de Ca⁺² de 270 mM.

4.3.4 Obtención de la mezcla PHCC – Alginato de sodio al 0,5% p/v

Se combinaron 5 mL de alginato de sodio al 3% p/v con 25 mL de PHCC en un tubo Falcon de 50 mL y se mezclaron empleando un agitador vórtex. Este procedimiento se realizó al interior de una cabina de flujo laminar y todos los materiales empleados fueron esterilizados previamente con vapor de agua saturado en un autoclave durante 20 minutos a una presión de 15 psig (25,8 psia).

4.3.5 Obtención de la mezcla PHCC – Alginato de sodio al 1% p/v

Se combinaron 10 mL de alginato de sodio al 3% p/v con 20 mL de PHCC en un tubo Falcon de 50 mL y se mezclaron empleando un agitador vórtex. Este procedimiento se realizó al interior de una cabina de flujo laminar y todos los materiales empleados fueron esterilizados previamente con vapor de agua saturado en un autoclave durante 20 minutos a una presión de 15 psig (25,8 psia).

4.3.6 Elaboración de geles de PHCC y alginato de sodio (0,5%p/v y 1,0%p/v)

Para la elaboración de los geles se empleó una caja de cultivo de poliestireno de 6 pozos de fondo plano (Falcon® 353046, BD Biosciences, San José, CA, USA). Se elaboraron tres geles de la mezcla PHCC-Alginato de sodio al 0,5% p/v y tres de la mezcla PHCC-Alginato de sodio al 1,0% p/v. En cada pozo se adicionaron 3 mL de la respectiva mezcla y se realizó aspersion con CaCl_2 al 3% p/v usando una frasco plástico con boquilla aspersora comercial hasta permitir la formación del gel. Adicionalmente, se adicionaron 5 mL de solución de CaCl_2 al 3% a cada pozo con el gel ya formado para asegurar exceso del ión y se llevó la caja de cultivo tapada a la incubadora a 37 °C durante 18 horas.

4.3.7 Elaboración de geles de PHCC

Los geles de PHCC sin alginato se prepararon mezclando en un vórtex 9 mL de PHCC con 900 μL de solución de CaCl_2 al 3% p/v. Se tomaron alícuotas de 3 mL y se adicionaron en 3 pozos de una caja de 6 pozos. Se llevó a la incubadora a 37°C durante 10 minutos para que se llevara a cabo la formación del gel. Posteriormente se adicionaron 5 mL de solución de CaCl_2 al 3% a cada pozo con el gel ya formado para asegurar exceso del ión y se llevó la caja de cultivo tapada a la incubadora a 37 °C durante 18 horas.

4.3.8 Elaboración de microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v.

En la **Figura 4-1** se presenta el esquema del montaje empleado para la elaboración de las microesferas, similar al usado por Mazzitelli *et.al.* (2011), el cual fue ubicado al interior de una cabina de flujo laminar vertical.

El sistema consta de una boquilla de aspersion de mezcla interna en acero inoxidable 316, que fue provista por la compañía *Spraying Systems Co*®, la cual está constituida por un cabezal de aire (ref. 1401110), un cabezal de fluido (ref. 40100), y un cuerpo (ref. 1/4J-SS) que consta de 6 aberturas que regulan el flujo de aire y dos entradas coaxiales, perpendiculares a la dirección del flujo, que permiten el ingreso del líquido y el aire (**Figura 4-2**). La boquilla se ubicó a una altura de 30 cm de la base y se soportó mediante unas pinzas empleando un soporte universal. Se alimentaron 20 mL de una mezcla de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v, empleando una bomba peristáltica. El aire de ingreso al sistema de aspersion se filtró empleando una membrana de tamaño de poro 0,45 μm y la presión se mantuvo en 5 psig.

La mezcla se asperjó sobre 100 mL de solución de CaCl_2 (3% p/v) contenidos en una caja de Petri de 10 cm de diámetro. La solución de CaCl_2 (3% p/v) junto con las microesferas se transfirieron de la caja de Petri a un frasco Schott de 500 mL con la ayuda de un embudo. Seguido de esto, las esferas se dividieron por tamaños utilizando una serie de 3 tamices ASTM en acero inoxidable

estériles de tal forma que las partículas quedarán separadas en cuatro fracciones diferentes (Tabla 4-1); las partículas se hicieron pasar por los tamices mediante la adición de solución de CaCl_2 (3% p/v) en el tamiz superior.

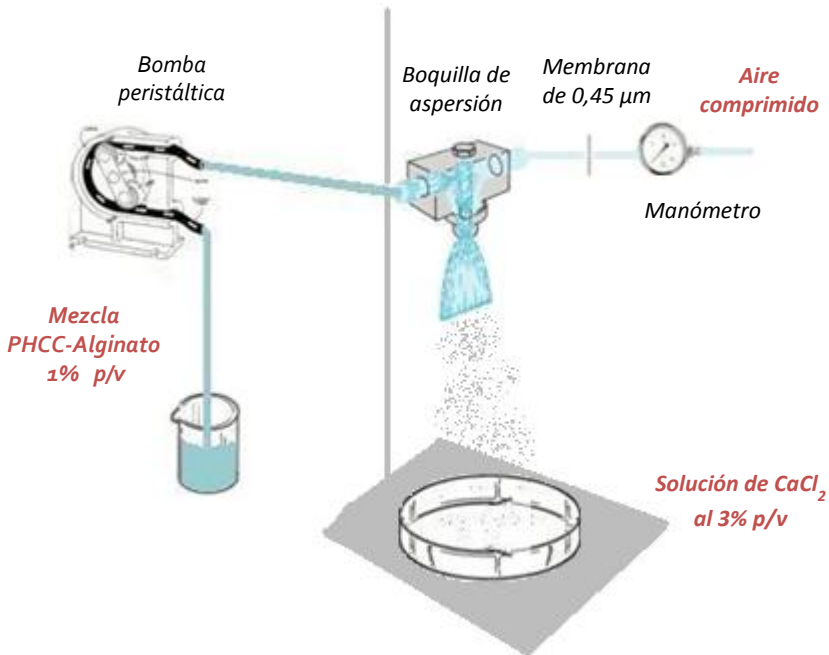


Figura 4-1: Montaje para la elaboración de microportadores




		
<p>Cabezal de salida del aire Ref. PA1401110-SS</p>	<p>Cabezal de salida del líquido Ref. PF40100-SS</p>	<p>Cuerpo en acero inoxidable para conexión de aire y líquido Ref. 1/4J-SS</p>

Figura 4-2: Sistema empleado en la aspersión. Tomado de (*Spraying-Systems-Co.*, 2012)

Para el cultivo de fibroblastos se seleccionaron las partículas retenidas en el tamiz malla 100, es decir, partículas con diámetros entre 150 y 500 μm , similar al tamaño de los microportadores comerciales descritos en el capítulo 3.

Tabla 4-1: Tamices ASTM serie fina usados para clasificar los microportadores (ASTM, 2011)

<i>Tamiz N°</i>	<i>Apertura en μm</i>	<i>Intervalo de tamaño</i>
18	1000	Diámetro > 1000 μm
35	500	1000 μm > Diámetro > 500 μm
100	150	500 μm > Diámetro > 150 μm
Base	0	Diámetro < 150 μm

4.3.9 Cultivo celular en monocapa

Se empleó la línea celular L929 de tejido conectivo subcutáneo de ratón (*Mus musculus*), donada por la Dra. Martha Raquel Fontanilla del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia. Los cultivos en monocapa se realizaron en el Laboratorio de Farmacogenética del Cáncer del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia a cargo del Dr. Fabio Aristizábal Gutiérrez en colaboración con la Bacterióloga Margie Ibata. En el **Anexo A** se presenta el protocolo empleado para cultivo en cajas de pozos y frascos T.

4.3.10 Evaluación de la adhesión celular en láminas

Una vez formados los geles en las placas de 6 pozos y luego de pasadas las 18 h de incubación, se aspiró con una micropipeta el exceso de CaCl_2 y se realizaron dos lavados sucesivos con una solución *buffer* de fosfatos (PBS), agregando suficiente cantidad para cubrir los geles, agitando la placa y luego descartando el líquido. Se adicionaron 100 μL de medio mínimo esencial (MEM) con una concentración celular aproximada de 1×10^7 células/mL sobre la superficie del gel. Se permitió la adhesión celular dejando el recipiente en reposo durante 1 hora y luego se adicionaron 1900 μL de medio de cultivo MEM suplementado con SFB al 5% v/v para completar el volumen correspondiente (ver **Tabla A-1**).

Al cuarto día (96 h) se retiró el medio de cultivo y se lavaron los geles con PBS. Posteriormente se realizó tinción con el colorante de fluorescencia Hoechst 33342 (Thermo Scientific, USA), adicionando 1 mL de medio de cultivo con una concentración de colorante de 1 $\mu\text{g/mL}$, a cada uno de los geles con células y se dejaron a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo con colorante y se lavaron los geles de forma sucesiva en tres ocasiones con PBS, como se describió previamente. Los geles con las células teñidas con Hoechst 33342 se visualizaron en un microscopio confocal *Nikon C1 Plus Eclipse Ti* (Nikon Instruments Inc., USA). La longitud de onda de excitación para el Hoechst 33342 es de 361 nm y la de emisión es de 486 nm.

Uno de los geles formados con PHCC y alginato de sodio al 1% p/v fue teñido con el colorante vital CellTrace™ CFSE - CarboxyFluorescein diacetate, Succinimidyl Ester (Invitrogen, USA), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B. Las células teñidas con CellTrace™ CFSE tienen picos aproximados de emisión y excitación, después de la hidrólisis, de 492nm y 517 nm respectivamente. Las células marcadas se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia usando un filtro estándar de fluorescencia.

4.3.11 Evaluación cualitativa de la adhesión celular en microportadores

El cultivo celular sobre los microportadores se llevó a cabo en una placa de cultivo de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Falcon® 353936, BD Biosciences, San José, CA, USA). Se adicionaron aproximadamente 500 µL de una suspensión de microesferas estériles de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v en una solución de CaCl₂ al 3% p/v, de tal manera que se aseguró que la base de la caja quedara completamente cubierta por microesferas. Se retiró el exceso de la solución de calcio y se hicieron tres lavados sucesivos con 500 µL de PBS. Se adicionaron 20 µL de medio mínimo esencial (MEM) con una concentración celular aproximada de 1×10^6 células por mL. Se permitió la adhesión celular durante 1 hora y luego se adicionaron 50 µL adicionales de medio de cultivo MEM suplementado con SFB al 5% v/v. Al día cuatro (96 h) se retiró el medio de cultivo y se lavaron las microesferas con PBS. Posteriormente se realizó tinción con el colorante de fluorescencia CFSE, siguiendo el protocolo descrito en el anexo B. La adhesión celular se visualizó de forma cualitativa empleando un microscopio confocal Nikon C1 Plus Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc., USA).

4.3.12 Evaluación de la citotoxicidad del material

Se empleó la técnica de elución de extractos descrita en el numeral 5 de la segunda edición de la norma ISO 10993-5, que corresponde a los ensayos *in vitro* de citotoxicidad para la evaluación biológica de dispositivos médicos. Se adicionaron 2 mL de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con SFB al 5% v/v a cada uno de los geles ubicados en una caja de 6 pozos y se dejaron embebidos en el medio durante 24 horas a 37°C, tiempo después del cual se retiró el extracto. El extracto original se definió como 100%. Como blanco se usó MEM fresco suplementado con SFB al 5% v/v; como control se usó Taxol. Se inocularon células L929 en pozos de una placa de 96 pozos con una densidad de 10.000 cel/cm². Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta confluencia; entonces se reemplazó el medio de cultivo en los pozos por una serie de tres diluciones (100% v/v, 10% v/v y 1% v/v) de cada extracto con medio MEM suplementado con SFB al 5% v/v. Las células se incubaron nuevamente a 37°C y 5% CO₂ por 48 h y entonces se midió la concentración celular viable usando MTT como describen Chen *et.al.* (2006) y Huang *et.al.* (2008).

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Geles de PHCC y sus mezclas con alginato de sodio al 0,5 y al 1,0% p/v.

En la **Figura 4-3** se presenta una fotografía de los geles elaborados para la evaluación de la citotoxicidad y la adhesión celular. Se observa que los geles de PHCC y alginato de sodio, tanto al 0,5% p/v como al 1% p/v se encuentran desprendidos del borde de la caja de 6 pozos, mientras que los del PHCC se encuentran adheridos a la superficie de la placa; la razón del desprendimiento en el caso de los geles con contenido de alginato puede deberse a la formación instantánea del gel usando este material, lo que implica el entrecruzamiento de las cadenas del polisacárido a una velocidad tal que supera cualquier adhesión a las paredes, lo cual no sucede con los geles de PHCC cuyo entrecruzamiento molecular por efecto del calcio es mucho más lento (tarda alrededor de 15 minutos).

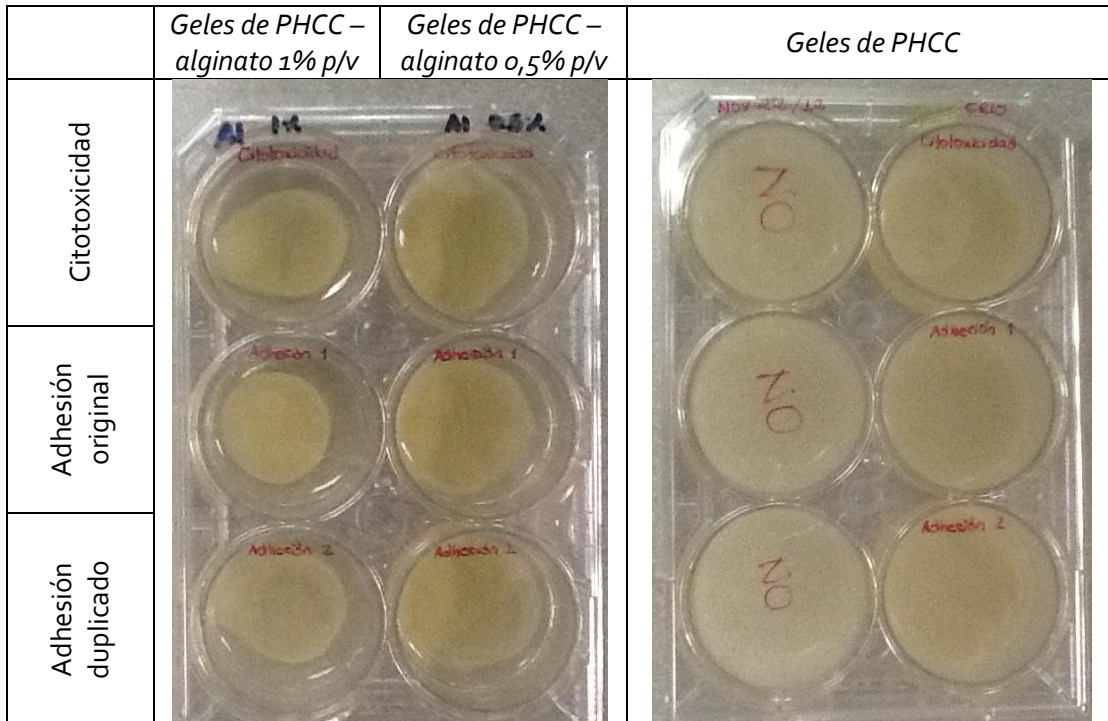


Figura 4-3: Geles de PHCC y sus mezclas con alginato de sodio al 0,5 y 1,0 % p/v. *NO: material sin células (control)

Para dar inicio a los ensayos se hizo necesario desprender los geles de PHCC y se hizo evidente la pérdida de líquido por parte de los mismos. Este sobrenadante se retiró antes de dar inicio a los ensayos y se realizaron tres lavados sucesivos con PBS para remover el exceso de cloruro de calcio de los geles.

4.4.2 Adhesión celular

En la **Figura 4-4** se presentan los resultados de adhesión de células L929 sobre los tres geles evaluados, empleando Hoechst como colorante de fluorescencia. Las imágenes corresponden a una reconstrucción tridimensional de una porción del gel. El eje z corresponde al espesor de cada lámina con células, con $z=0$ ubicado en la superficie superior del gel. Es importante recordar que el Hoechst tiñe únicamente los núcleos celulares, por lo cual no se puede apreciar la morfología del citoplasma.

En la fila **A** de la **Figura 4-4** se presenta un esquema tridimensional de la porción de gel evaluada en el microscopio confocal. La fila **B** corresponde a la vista superior del esquema tridimensional presentado en la fila A.

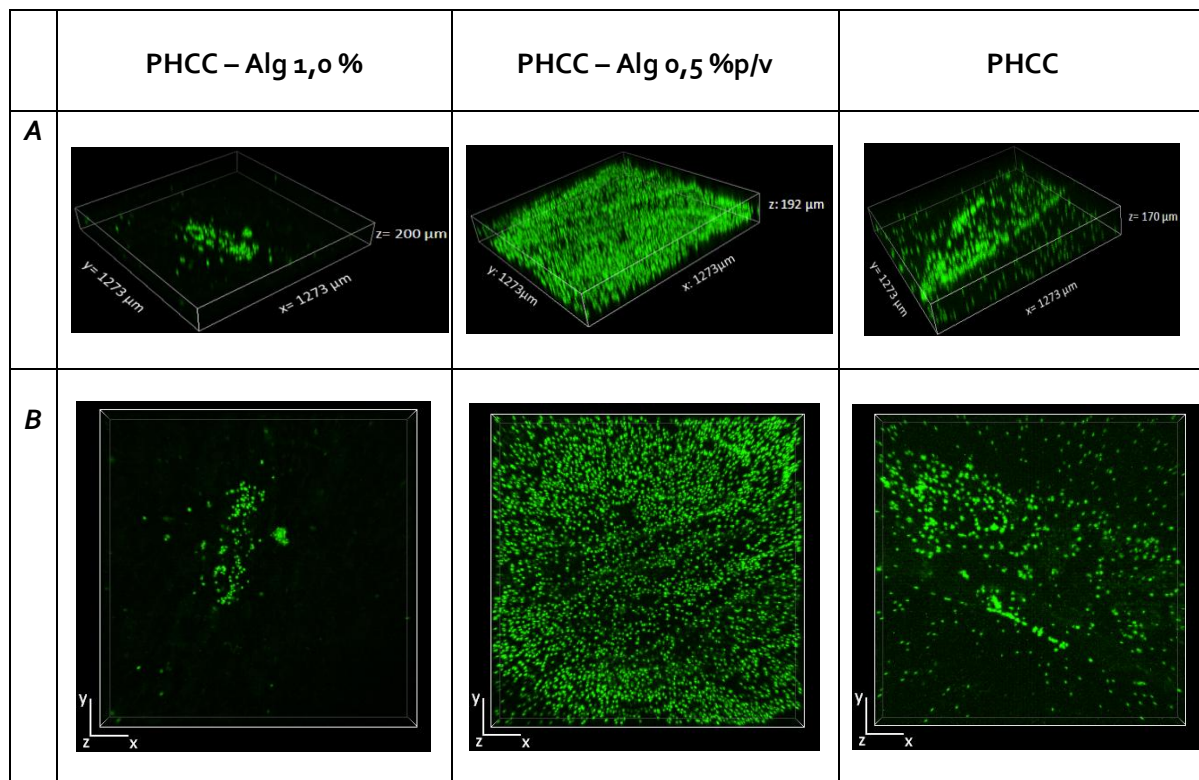


Figura 4-4: Geles de PHCC a diferentes concentraciones de alginato de sodio mostrando células L929 teñidas con Hoechst, luego de 4 días de cultivo.

Las filas **A-D** de la **Figura 4-5** presentan imágenes correspondientes a diferentes planos del eje z para las mismas imágenes de todos los geles presentadas en la **Figura 4-4**. Cabe aclarar que aunque el diámetro de los geles formados en las placas de 6 pozos fue aproximadamente de 3 cm, cuando se observó a través del microscopio se encontró que las células no estaban distribuidas en todo el material sino concentradas en pequeñas porciones del gel, generalmente en los bordes o sobre la superficie de aquellos lugares con leves hendiduras o depresiones; dado

que en el momento de la siembra la concentración celular era homogénea, no es claro por qué las células se alojaron en zonas tan reducidas: es posible que la concentración de las células en dichos lugares se deba a un deslizamiento de las mismas sobre la superficie en el momento de sembrarlas, lo que sugiere que el tiempo de adhesión (1 hora) es demasiado corto o que no hay suficientes sitios moleculares de adhesión; en dicho caso, agitar la caja probablemente no hubiese tenido un efecto significativo en mejorar la distribución celular. Si bien el alginato se compone de monómeros inertes (M y G) que inherentemente carecen de los ligandos bioactivos necesarios para el anclaje celular (Sun & Tan, 2013), la fibrina tiene dos pares de sitios RGD y un par de sitios AGDV que pueden servir de sitios de adhesión por su interacción con integrinas y cadherinas celulares expresadas en células endoteliales o en plaquetas (Cheresh *et al.*, 1989; Altieri *et al.*, 1990; Bach *et al.*, 1998; Lishko *et al.*, 2002; Chernousov & Carey, 2003; Llames *et al.*, 2006). Al iniciar el trabajo se partió de la hipótesis que la concentración de alginato necesaria para la conformación de los geles sería demasiado pequeña como para causar problemas de adhesión.

Meana *et al.* (1998), Llames *et al.* (2006) y Martín *et al.* (2013) reportan un excelente crecimiento de fibroblastos y keratinocitos en geles de fibrina preparados siguiendo un procedimiento similar al usado en la presente investigación, lo cual no fue el caso en los geles hechos únicamente con PHCC, aunque la diferencia puede deberse a que en los trabajos mencionados los fibroblastos fueron introducidos directamente al interior del gel de fibrina y no depositados en su superficie. De otro lado, Martín *et al.* (2013) también reportan un efecto similar de reducción de crecimiento celular y de síntesis de proteína en geles de fibrina cuando se agrega un polisacárido derivado de algas (agarosa) aún a concentraciones más bajas que las empleadas en el presente trabajo. Aunque en el presente trabajo se encontró adherencia apropiada a los geles que contienen alginato, aún permanece la duda sobre porqué el crecimiento se limita a ciertas zonas.

Un análisis de las figuras 4-4 y 4-5 permiten apreciar algunos hechos interesantes. En primer lugar, dado que el diámetro de las células L929 en suspensión es de alrededor de 15 μm , al observar planos con una separación de 30 μm daría la impresión que los núcleos celulares existentes allí deberían corresponder a células diferentes, lo cual significaría que dichos núcleos están unos encima de otros.

Existen tres posibles explicaciones a este fenómeno: la primera, que es la más probable, es que la resolución del microscopio no es suficientemente precisa, por lo que la luz proveniente de la fluorescencia de un plano se alcanza a ver en otro plano cuando se observa desde la parte superior del gel; si esto es así, la imagen central de la fila A de la **Figura 4-5** podría interpretarse como la observación de un prado cubierto de pasto, en el cual hay pequeños montículos y depresiones del terreno que son perfilados de forma fiel pero difusa por la cobertura vegetal; en esta analogía, cada una de las hojas de pasto correspondería a una célula en la superficie del gel.

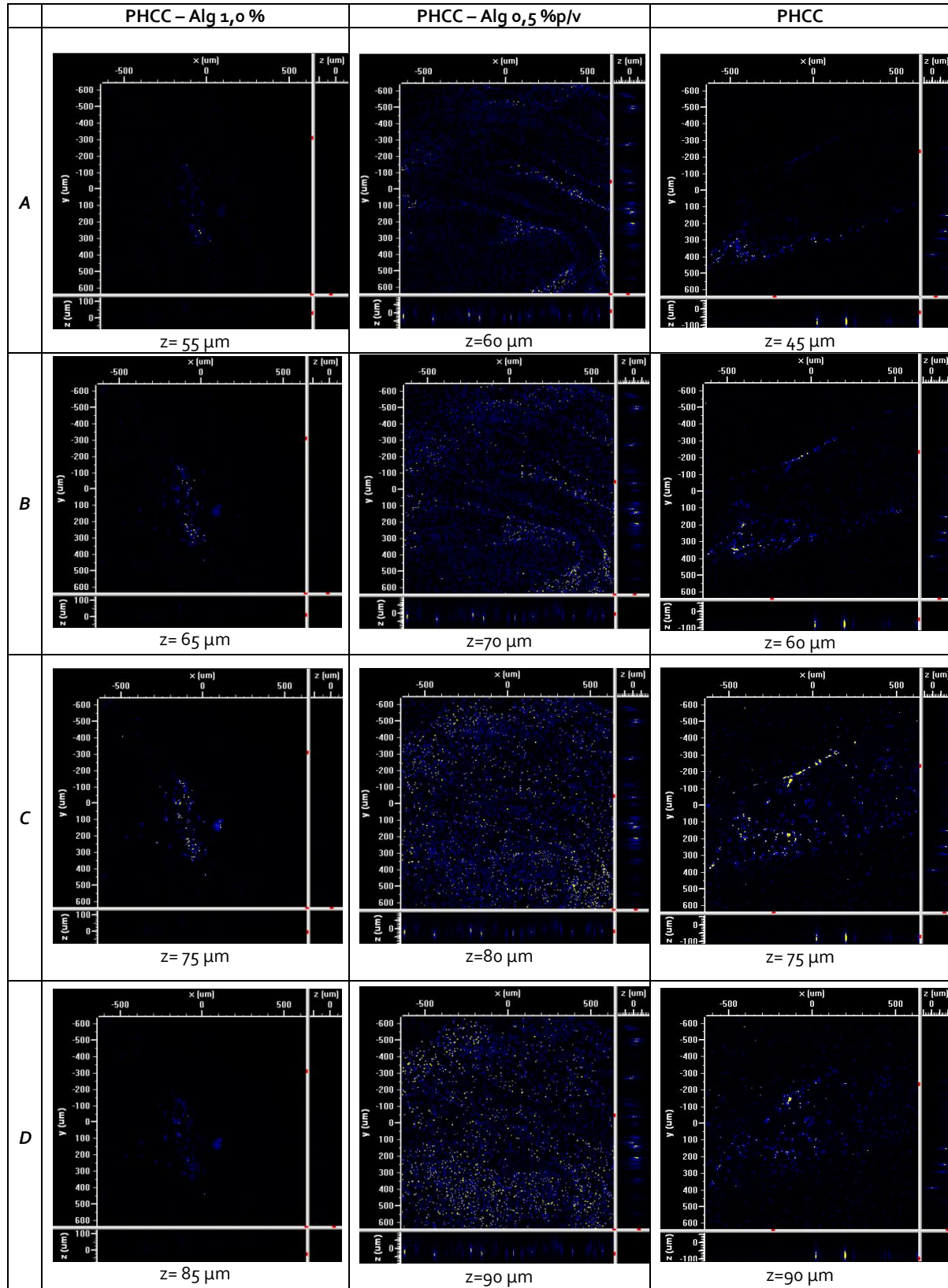


Figura 4-5: Geles de PHCC y a diferentes concentraciones de alginato de sodio con células L929 teñidas con Hoechst con cortes en diferentes longitudes del eje z.

Obsérvese que los diferentes accidentes de la superficie del gel se aprecian de manera similar a líneas de contorno en un mapa en las Filas A y B correspondientes a los geles hechos de PHCC y Alginato al 0,5% p/v en la **Figura 4-5**. Las otras explicaciones posibles corresponden o a una penetración celular al interior del gel, lo cual sería un resultado muy esperanzador para efectos del desarrollo de un equivalente celular, o a un simple apilamiento gravitacional de células en una depresión de la superficie del gel, unas sobre otras o en diferentes cavidades existentes al interior del soporte; aunque esta última explicación podría ser perfectamente válida en la medida que la medición se realizó en el gel luego de lavados con PBS y remoción del líquido que probablemente dejaron oquedades en el gel, la supervivencia de estas células por 4 días sin adherencia es poco probable.

Otro aspecto destacable de las Figuras 4-4 y 4-5 es que pareciera que la adherencia y el crecimiento son mucho más homogéneos en el gel de PHCC con 0,5% p/v de alginato. No existe una explicación clara para este fenómeno; bien podría tratarse de un simple efecto visual al seleccionar por azar una zona de dicho gel con mayor crecimiento para tomar la fotografía. Este aspecto deberá también ser evaluado en futuros estudios. De otro lado, cabe recordar que los geles elaborados con PHCC y alginato de sodio al 1% p/v se formaban de forma instantánea y se obtenía una superficie homogénea. Un fenómeno similar se observó en el caso del PHCC, en donde aunque la formación del gel no ocurre en forma instantánea sino que se forma tras 10 minutos en la incubadora a 37°C, al cabo de dicho período se obtiene un gel compacto y homogéneo con una superficie uniforme. En ambos casos, la menor proporción de células puede deberse al deslizamiento de las células aún no adheridas hacia el fondo de la caja o hacia otras zonas del gel. En contraste, el material con más irregularidades en la superficie (determinadas visualmente) fue el formado por PHCC – alginato de sodio al 0,5% p/v, lo cual correlaciona bien con la mayor cantidad de células y la distribución más uniforme de las mismas.

A pesar de que la mejor distribución y adhesión celular aparentes correspondieron a los geles de PHCC – alginato de sodio al 0,5% p/v, solo los geles hechos con PHCC y alginato de sodio al 1 %p/v permitieron la formación de microportadores utilizando la metodología de aspersión descrita en la sección 4.3.11 4.3.11; dado que uno de los objetivos principales de la presente investigación consistió en la evaluación del crecimiento celular sobre microportadores, se seleccionó el PHCC y alginato de sodio al 1% p/v como el material a utilizar para generar dichos microportadores y por ello los experimentos siguientes se concentraron en este material.

Con el fin de tratar de elucidar si la presencia de núcleos celulares en geles de PHCC y alginato de sodio al 1 %p/v podría deberse a crecimiento interno en el gel a diferentes profundidades o a simple superposición de células sin adherir unas sobre otras, se decidió realizar una tinción del citoplasma; la base científica de esta decisión es que células sin adherirse usualmente se presentan en forma redondeada, mientras que las células adheridas usualmente tienen una morfología expandida característica. Para la nueva tinción se usó CFSE, un colorante vital (es decir, que permite el cultivo continuado de las células después de la tinción, en contraste con el

Hoechst, que mata la célula durante la tinción) que se aloja en el citoplasma celular y cuya intensidad de fluorescencia disminuye en la medida que las células se van replicando.

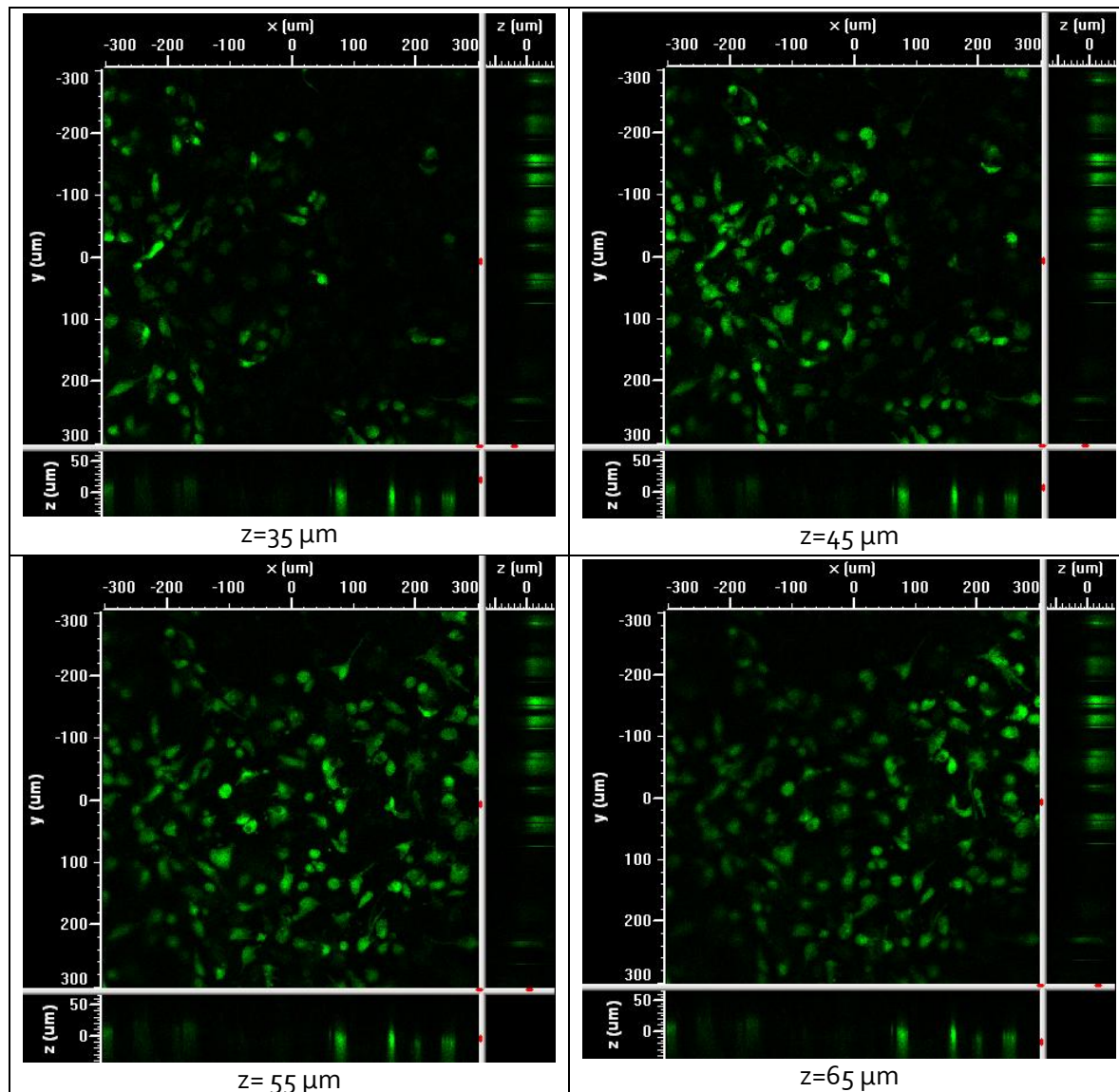


Figura 4-6: Geles de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v con células L929 teñidas con CFSE.

Los resultados obtenidos para la tinción con CFSE se presentan en la **Figura 4-6** y en la **Figura 4-7**, siendo éstas imágenes una reconstrucción tridimensional de dos porciones de una lámina de gel fabricado con PHCC y alginato de sodio al 1%p/v y sembrado con células L929, en planos de diferente profundidad que van desde un valor de $z = 35 \mu\text{m}$ hasta $z = 65 \mu\text{m}$ en un caso y desde $z = 10 \mu\text{m}$ hasta $z = 70 \mu\text{m}$ en el otro; en dichas figuras es posible observar que aunque algunas de las células tienen morfología esférica, muchas de ellas están alargadas y presentan varias proyecciones de su citoplasma en forma radial, lo cual es característico de células adheridas al soporte.

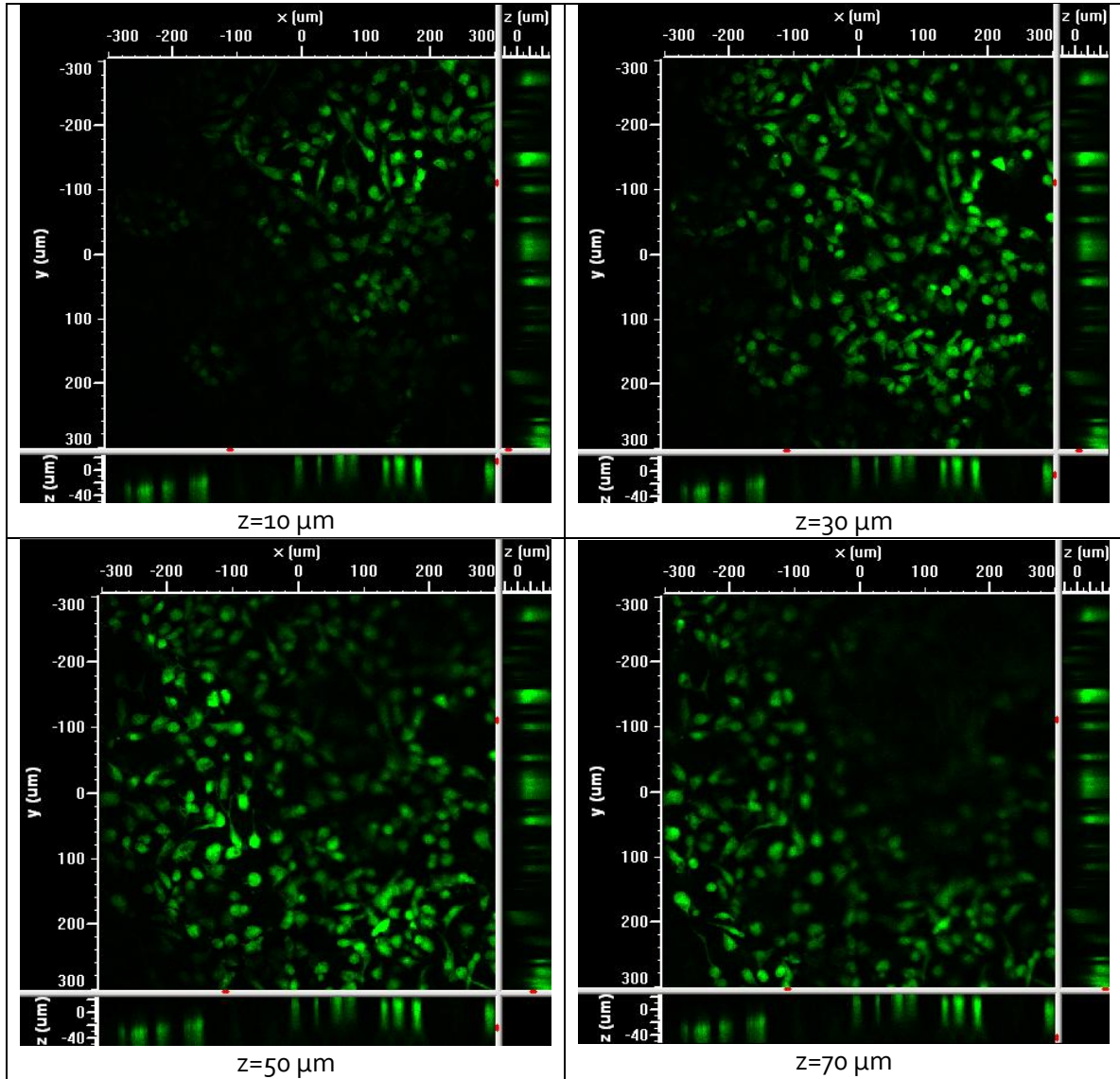


Figura 4-7: Geles de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v con células L929 teñidas con CFSE.

Al analizar las imágenes presentadas en la **Figura 4-6** en orden ascendente de z , se puede observar que las células con mayor brillo se concentran en zonas diferentes en cada imagen y que las mismas células se pueden ver en prácticamente los cuatro planos: en $z=35 \mu\text{m}$, las pocas células brillantes están al borde izquierdo; en $z=45 \mu\text{m}$ se ven muchas más células brillantes en la mitad izquierda de la imagen. En $z=55 \mu\text{m}$ se aprecian células brillantes en la mitad derecha de la imagen y las células que eran más brillantes en $z=35 \mu\text{m}$ ya empiezan a perderse; finalmente en $z=65 \mu\text{m}$ la mitad izquierda de la imagen tiene una intensidad mucho menor.. Lo que esto quiere decir es que las células parecen estar creciendo a diferentes alturas pero no se ven células diferentes creciendo en la misma área en diferentes planos, lo cual solo es compatible con un crecimiento en superficie (bi-dimensional): si hubiese un crecimiento al interior del gel (tridimensional), uno esperaría que las células hubiesen migrado al interior y por ello, en diferentes planos deberían aparecer células con una distribución irregular. Por el contrario, lo

que se observa es que el crecimiento celular tiene un perfil con una inclinación que aumenta de izquierda a derecha; un fenómeno similar se puede apreciar en la **Figura 4-7**, aunque en tal caso la inclinación es diagonal aumentando desde la parte superior derecha a la inferior izquierda de las imágenes en la figura. Asumiendo que el anterior argumento es válido, puede pensarse que el crecimiento en el microportador es en superficie y, por ello, es posible comparar la morfología celular con el de otros trabajos en el que las células también crecen en superficie.

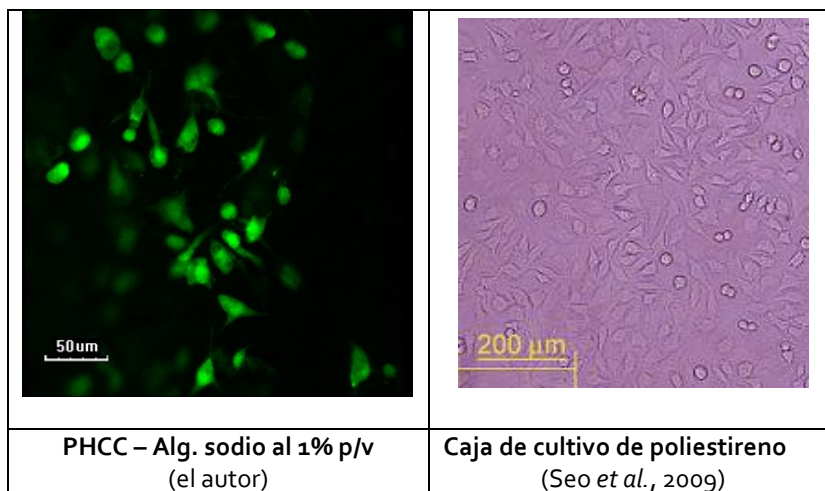


Figura 4-8: Comparación de la adhesión celular de L929 sobre PHCC-Alg. 1%p/v y una caja de cultivo tradicional (poliestireno)

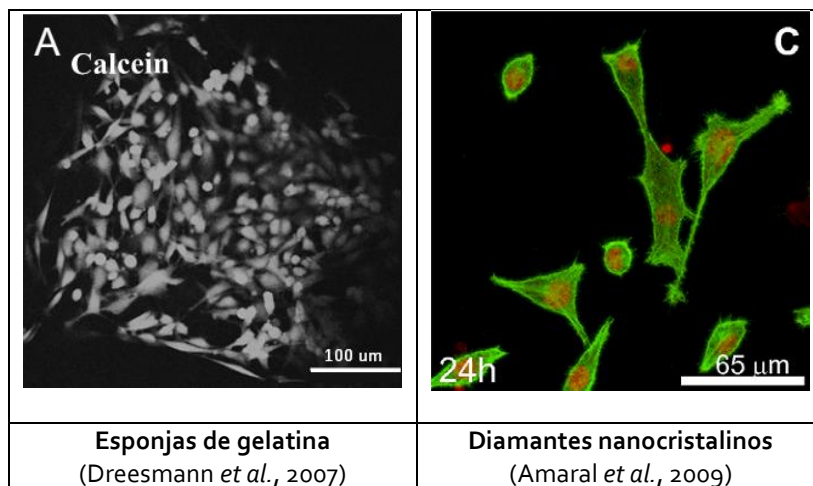


Figura 4-9: Adhesión celular de L929 sobre esponjas de gelatina y diamantes nanocristalinos

En la **Figura 4-8** se compara una ampliación de una de las imágenes de la **Figura 4-7** correspondiente a células L929 adheridas al gel formado con PHCC y alginato de sodio al 1% p/v luego de 4 días de sembradas, con una fotografía presentada por Seo *et al.* (2009) para el mismo tipo de células cultivadas en cajas de poliestireno luego de dos días de sembradas; en ambos casos se observa que las células tienen forma elongada, lo que indica cambios morfológicos que corresponden a la reorganización del citoesqueleto, producto de la adhesión celular en el material (Amaral *et al.*, 2009). Estos resultados son similares a los obtenidos por Dreesmann *et al.*

(2007) quienes evaluaron la adhesión de este mismo tipo de células en esponjas de gelatina y a los obtenidos por Amaral *et.al.* (2009) para revestimientos con diamantes nanocristalinos (Figura 4-9).

4.4.3 Adhesión celular en microportadores

En la Figura 4-10 se presentan las imágenes de los microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1% p/v teñidos con CFSE; es posible observar la presencia de fibroblastos L929 sobre la superficie de los microportadores. El aumento de la imagen permite confirmar la adhesión celular sobre los microportadores, después de 4 días de cultivo, de forma similar a los resultados encontrados para el cultivo sobre la lámina plana.

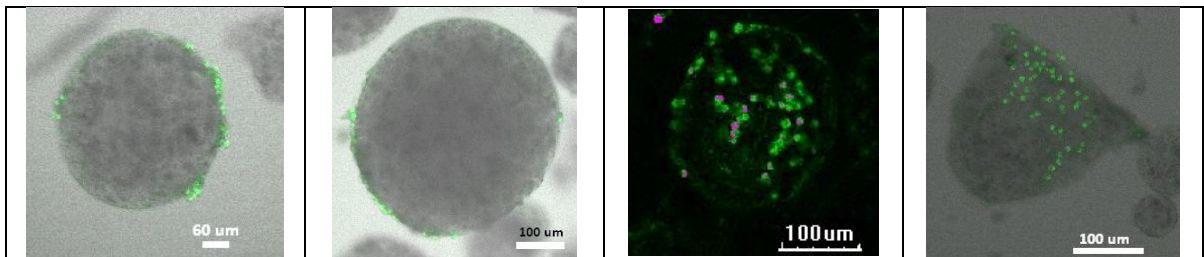


Figura 4-10: Adhesión celular de fibroblastos L929 sobre diferentes microportadores de PHCC y alginato de sodio al 1%p/v.

4.4.4 Citotoxicidad del material

La Tabla 4-2 presenta los resultados de citotoxicidad de los extractos de los geles de PHCC elaborados con diferentes concentraciones de alginato de sodio, a concentraciones de cloruro de calcio de 3% p/v. Con una confianza del 95%, no hay diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de supervivencia de las células del control y de los diferentes extractos a ninguna de las concentraciones ensayadas, aunque para el caso de PHCC con alginato al 1% p/v pareciera existir una ligera inhibición de la supervivencia. Igualmente, para el caso de PHCC puro, pareciera existir una ligera estimulación del crecimiento a diluciones del 10% y 1% probablemente ocasionada por liberación de factores de crecimiento existentes en el PHCC; sin embargo, como se mencionó, estas observaciones no son estadísticamente importantes.

Es importante destacar que los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con una línea celular inmortalizada, la cual de por sí es cancerosa. Podría argüirse que la baja citotoxicidad del material podría ser el resultado de que las células empleadas son extremadamente resistentes comparadas con células derivadas de un cultivo primario; no se realizó el cultivo primario debido a dificultades de contaminación, por lo cual es recomendable realizar este ensayo en trabajos posteriores.

Tabla 4-2: Resultados de citotoxicidad de los geles de PHCC con diferentes concentraciones de alginato (n=3) en células L929.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración del extracto</i>	<i>% de supervivencia (promedio ± desv. Estándar)</i>
PHCC + Alginato 1% p/v	1	101 ± 9 %
	10	98 ± 6 %
	100	93 ± 2 %
PHCC + Alginato 0,5% p/v	1	89 ± 8 %
	10	102 ± 6 %
	100	93 ± 8 %
PHCC	1	105 ± 7 %
	10	112 ± 5 %
	100	99 ± 1 %

4.5 Conclusiones

Se encontró que las células L929 se adhieren en los intersticios y bordes de los tres materiales evaluados: PHCC y PHCC con alginato de sodio al 0,5 y al 1% p/v, lo cual se atribuye a un deslizamiento de las células sobre la superficie de los materiales. El PHCC con alginato de sodio al 0,5 % p/v parece tener una mejor distribución y adherencia celular, pero esta es una hipótesis que debe ser confirmada o refutada en investigaciones posteriores.

Si bien en los tres materiales hay adhesión celular, sólo la mezcla formada por PHCC y alginato de sodio al 1% p/v permite la formación de microportadores mediante aspersión de la mezcla sobre una solución de cloruro de calcio. Los resultados de la adhesión celular sobre láminas formadas con esta mezcla y los microportadores difieren en la morfología celular, encontrándose que sobre las láminas, las células presentan formas elongadas, mientras que en los microportadores las células presentan formas globulares.

Con una confianza del 95%, no hay diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de supervivencia de células L929 cultivadas con diferentes concentraciones de extractos de los geles de PHCC a ninguna de las concentraciones de alginato utilizadas (0, 0,5 y 1% p/v) en comparación con un cultivo control, lo cual indica que ninguno de los materiales evaluados presenta citotoxicidad y puede, por tanto, continuarse su uso en investigaciones para el desarrollo de equivalentes cutáneos.

4.6 Referencias

Altieri, D.C.; Agbanyo, F.R.; Plescia, J.; Ginsberg, M.H.; Edgington, T.S. and Plow, E.F. (1990). A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Biological Chemistry*. **265**: 12119-12122.

Amaral, M.; Gomes, P.S.; Lopes, M.A.; Santos, J.D.; Silva, R.F. and Fernandes, M.H. (2009). Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia*. **5**(2): 755-763.

ASTM (2011). ASTM E323-11 Standard Specification for perforated-plate sieves for testing purposes.

Aunins, J.G.; Bibila, T.A.; Gatchalian, S.; Hunt, G.R.; Junker, B.H.; Lewis, J.A.; Licari, P.; Ramasubramanyan, K.; Ranucci, C.S.; Seamans, T.C.; Seifert, D.B.; Zhou, W.; Waterbury, J. and Buckland, B.C. (1997). Reactor Development for the Hepatitis A Vaccine VAQTA™. *Animal Cell Technology*. M. T. Carrondo; B. Griffiths and J. P. Moreira, Springer Netherlands: 175-183.

Bach, T.L.; Barsigian, C.; Yaen, C.H. and Martinez, J. (1998). Endothelial cell VE-Cadherin functions as a receptor for the β 15-42 sequence of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**(46): 30719-30728.

Chen, X.-G.; Liu, C.-S.; Liu, C.-G.; Meng, X.-H.; Lee, C.M. and Park, H.-J. (2006). Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. **27**: 269-274.

Cheresh, D.A.; Berliner, S.A.; Vicente, V. and Ruggeri, Z.M. (1989). Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell*. **58**: 945-953.

Chernousov, M.A. and Carey, D.J. (2003). α V β 8 integrin is a Schwann cell receptor for fibrin. *Experimental Cell Research*. **291**: 514-524.

Dreesmann, L.; Ahlers, M. and Schlosshauer, B. (2007). The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials*. **28**(36): 5536-5543.

GE-Healthcare (2005). Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods. Handbooks from GE Healthcare: 18-1140-1162.

Genzel, Y.; Fischer, M. and Reichl, U. (2006). Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine*. **24**(16): 3261-3272.

Grinnell, F. and Feld, M. (1980). Spreading of human fibroblasts in serum free medium: Inhibition by dithiothreitol and the effect of cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *Journal of Cellular Physiology*. **104**(321-334).

Grinnell, F. and Hays, D.G. (1978). Cell adhesion and spreading factor: Similarity to cold insoluble globulin in human serum. *Experimental Cell Research*. **115**: 221-229.

Grinnell, F.; Hays, D.G. and Minter, D. (1977). Cell adhesion and spreading factor: Partial purification and properties. *Experimental Cell Research*. **110**: 175-190.

Hirano, Y.; Okuno, M.; Hayashi, T.; Goto, K. and Nakajima, A. (1993). Cell attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **4**: 235-243.

Hornig, C.B.C. (1975). Primary culture of mammalian cells on microcarrier surface. Buffalo, NY, State University of New York. **Ph. D. Thesis**

Huang, S.; Deng, T.; Wang, Y.; Deng, Z.; He, L.; Liu, S.; Yang, J. and Jin, Y. (2008). Multifunctional implantable particles for skin tissue regeneration: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*. **4**(4): 1057-1066.

Hughes, R.C.; Pena, S.D.; Clark, J. and Dourmashkin, R.R. (1979). Molecular requirements for adhesion and spreading of hamster fibroblasts. *Experimental Cell Research*. **121**: 307-314

Hundt, B.; Best, C.; Schlawin, N.; Kaßner, H.; Genzel, Y. and Reichl, U. (2007). Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave® Bioreactor microcarrier culture in 1–10L scale. *Vaccine*. **25**(20): 3987-3995.

Lishko, V.K.; Kudryk, B.; Yakubenko, V.P.; Yee, V.C. and Ugarova, T.P. (2002). Regulated unmasking of the cryptic binding site for integrin α M β 2 in the γ C-domain of fibrinogen. *Biochemistry*. **41**: 12942–12951.

Llames, S.; García, E.; García, V.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Jorcano, J.L.; López, E.; Holguín, P.; Miralles, F.; Otero, J. and Meana, A. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*. **7**: 47-53.

Maroudas, N.G. (1975). Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *The Journal of Theoretical Biology*. **49**: 417- 424.

Martin, S.S.; Alaminos, M.; Zorn, T.M.T.; Sánchez-Quevedo, M.C.; Garzón, I.; Rodriguez, I.A. and Campos, A. (2013). The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. **7**(10-19): 10.

Mazzitelli, S.; Luca, G.; Mancuso, F.; Calvitti, M.; Calafiore, R.; Nastruzzi, C.; Johnson, S. and Badylak, S.F. (2011). Production and characterization of engineered alginate-based microparticles containing ECM powder for cell/tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. **7**(3): 1050-1062.

Meana, A.; Iglesias, J.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Madrigal, B.; Fresno, M.F.; Martin, C.; San Roman, F. and Tevar, F. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. **24**(7): 621-630.

Meignier, B.; Mougeot, H. and Favre, H. (1980). Foot and mouth disease virus production on microcarrier-grown cells. *Developments in biological standardization*. **46**: 249-256.

Mercier, N.R.; Costantino, H.R.; Tracy, M.A. and Bonassar, L.J. (2005). Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. **26**(14): 1945-1952.

Mulder, L. (2002). Cell adhesion on alginate scaffolds for the Tissue Engineering of an aortic valve – A Review. Eindhoven University of Technology, Faculty of Biomedical Engineering. 1-45.

Palakkan, A.A.; Hay, D.C.; Anil Kumar, P.R.; Kumary, T.V. and Ross, J.A. (2013). Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver international*. **33**(5): 666-676.

Park, J.-H.; Pérez, R.A.; Jin, G.-Z.; Choi, S.-J.; Kim, H.-W. and Wall, I.B. (2013). Microcarriers Designed for Cell Culture and Tissue Engineering of Bone. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. **19**(2): 172-190.

Phillips, B.W.; Meng Lim, R.Y.; Teck, T.T.; Rust, W.L. and Crook, J.M. (2008a). Efficient expansion of clinical-grade human fibroblasts on microcarriers: Cells suitable for *ex vivo* expansion of clinical-grade hESCs. *Journal of Biotechnology*. **134**: 79-87.

Pörtner, R.; Nagel-Heyer, S.; Goepfert, C.; Adamietz, P. and Meenen, N.M. (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **100**(3): 235-245.

Reichardt, A.; Polchow, B.; Shakibaei, M.; Henrich, W.; Hetzer, R. and Lueders, C. (2013). Large Scale Expansion of Human Umbilical Cord Cells in a Rotating Bed System Bioreactor for Cardiovascular Tissue Engineering Applications. *The Open Biomedical Engineering Journal*. **7**: 50-61.

Seo, J.-H.; Matsuno, R.; Takai, M. and Ishihara, K. (2009). Cell adhesion on phase-separated surface of block copolymer composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and poly(dimethylsiloxane). *Biomaterials*. **30**(29): 5330-5340.

Shirokaze, J.; Yanagida, K. and Shudo, K. (1997). Monoclonal Antibody Production Using Macroporous Microcarrier. *Animal Cell Technology*. **8**: 273-280.

SoloHill-Eng-Inc. (2013). "World Leader in Microcarrier Technology." Consultado el 12 de octubre del 2013, de la página web <http://www.solohill.com/Solohill/Microcarrier/Products/>.

Spraying-Systems-Co. (2012). "Catálogo de productos." Consultado el 5 de abril del 2011, de la página web http://es.spray.com/Descargas/Cat%C3%A1logo_70_.aspx.

Sun, J. and Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Review. *Materials*. **6**: 1285-1309.

van Wezel, A.L. (1976). The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of

microcarriers. *Development of specifications for biotechnology pharmaceutical product*. **37**: 143-147.

Wu, S.-C.; Liu, J.-H. and Hong, W.W.L. (2006). Propagation kinetics of retrovirus transgene vector and replication-competent retrovirus in static and microcarrier cell culture systems using different medium exchange strategies. *Enzyme and Microbial Technology*. **38**(1-2): 229-236.

Zhou, L.; Kong, J.; Zhuang, Y.; Chu, J.; Zhang, S. and Guo, M. (2013). Ex vivo expansion of bone marrow mesenchymal stem cells using microcarrier beads in a stirred bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **18**(1): 173-184.

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Mediante ensayos de reología dinámica se encontró que las dos rutas planteadas para el mejoramiento de los geles obtenidos a partir de plasma humano (PH): mezcla con alginato de sodio y aumento de la concentración del fibrinógeno en el PH, empleando plasma humano crioconcentrado (PHCC), arrojan resultados favorables, siendo los geles formados solo con PHCC los que tienen un comportamiento más cercano al de un sólido elástico. Se encontró que el módulo elástico para los geles formados sólo con PHCC es del mismo orden de magnitud que el obtenido a partir de la mezcla de PH y alginato de sodio al 1%. Este resultado es muy importante dentro de la presente investigación porque abre nuevas puertas a la posibilidad de usar solo PHCC como soporte, ya sea para las células de la dermis, o para albergar microportadores de PHCC y alginato de sodio y luego emplearse como equivalente dérmico, reduciendo la cantidad de alginato presente en la matriz final.

Se encontró que las proteínas y demás componentes presentes tanto en el PH como en el PHCC interfieren en la formación de una estructura compacta de los geles obtenidos a partir de mezclas de PH y/o PHCC con alginato de sodio, lo cual se vio reflejado en una disminución de sus propiedades elásticas respecto a los geles obtenidos a las mismas concentraciones de alginato de sodio pero diluido solo en agua destilada. Este efecto, sin embargo, disminuye con el aumento de la concentración de alginato.

Se implementó un sistema de aspersión para la formación de microportadores, con equipos económicos y disponibles en el país. Este montaje puede ser usado al interior de una cabina de flujo laminar para elaborar micropartículas estériles. Se evaluaron tres factores que pueden influir en el tamaño de partícula de los portadores basados en alginato de sodio, estos son: presión de aire de entrada a la boquilla, flujo de líquido alimentado y altura que separa la boquilla de la solución de cloruro de calcio y se encontró que las condiciones que favorecen la formación de partículas con diámetros dentro del intervalo de interés (100 – 300 μm) son: Presión de salida del aire: 5 psig, flujo de alginato: 2.1 mL min⁻¹ altura de la boquilla: 30 cm.

Finalmente, y como resultado de la evaluación de la adhesión celular y de la citotoxicidad de los materiales empleando fibroblastos de ratón L929, se encontró que estos se adhieren en los intersticios y bordes de los tres materiales evaluados: PHCC y PHCC con alginato de sodio al 0,5 y al 1% p/v, que puede ser atribuido a un deslizamiento de las células sobre la superficie de los

materiales, sin embargo ésta es una hipótesis que debe ser confirmada o refutada en investigaciones posteriores.

Se encontraron diferencias entre los resultados de adhesión celular sobre láminas formadas con PHCC y alginato de sodio y los microportadores elaborados a partir de la misma mezcla, encontrándose que sobre las láminas, las células presentan formas elongadas, mientras que en los microportadores las células presentan formas globulares. Con el fin de elucidar las razones por las cuales la forma del material tiene un efecto sobre la adhesión celular de fibroblastos L929 se recomienda analizar mediante microscopía electrónica de barrido las variaciones de la superficie cuando se varía la forma del gel.

Recomendaciones

Considerando los inconvenientes y dificultades presentados durante el desarrollo de la presente investigación se realizan las siguientes recomendaciones y sugerencias para trabajos futuros:

Propiedades mecánicas

- Evaluar la degradación del gel de PHCC mediante reología dinámica. Hacer un stock de geles en cajas de 6 pozos, adicionar medio de cultivo y elaborar una curva que me relacione las propiedades mecánicas a lo largo del tiempo, por ejemplo 30 días. Repetir este ensayo empleando geles con células.
- Evaluar las propiedades mecánicas (tensión) de los geles obtenidos para las diferentes concentraciones de PHCC y alginato de sodio.
- Realizar ensayos de reología dinámica empleando la geometría dentada para reducir los errores asociados al deslizamiento del material sobre las geometrías planas.

Adhesión y proliferación celular

- Realizar una tinción vital de las células (p.e. con CFSE) y luego embeberlas en un gel solo de PHCC y evaluar la proliferación celular mediante fluorescencia.
- Emplear una tinción combinada que me permita diferenciar el citoplasma del núcleo. Esto puede ayudar a apreciar la morfología celular y sacar algunas conclusiones sobre el crecimiento.

Microportadores

- Desarrollar una técnica para elaborar microportadores solo de PHCC, por ejemplo mezclando PHCC con CaCl_2 al 3%p/v y adicionándole un solvente insoluble en agua para formar partículas de tamaño adecuado, manteniendo la temperatura en 37°C.

-
- Elaborar microesferas empleando otros agentes entrecruzantes, por ejemplo mezclar CaCO_3 con PHCC y realizar la aspersión sobre una solución ácida.
 - Elaborar un equivalente cutáneo cultivando las células en las microesferas y luego poniéndolas en una lámina de PHCC
 - Caracterizar los microportadores mediante microscopía electrónica de barrido.

Material

- Fabricar láminas de PHCC empleando otros agentes entrecruzantes, por ejemplo CaCO_3 . Reducir lentamente el pH, lo que daría lugar a la formación de un material poroso.
- Caracterizar mediante microscopía electrónica de barrido los geles obtenidos para las diferentes mezclas.
- Implementar la técnica para evaluar la concentración de fibrinógeno en el PHCC.
- Evaluar la microestructura del material de soporte tanto en forma plana como en forma de microportadores para evaluar si hay diferencias importantes en cuanto a tamaño de partícula promedio y a distribución del mismo.

Anexo A. Cultivo celular en monocapa

1. Se emplearon células confluentes de un frasco T75. Se les retiró el medio de cultivo. Se le adicionaron 10 mL de tripsina. Se llevaron a la incubadora a 37°C durante 5 minutos aproximadamente o hasta que se desprendieron la mayoría de las células de la base del frasco. Se adicionaron 10 mL de medio DMEM suplementado con SFB al 10% (v/v) para detener la acción de la trombina. Se agitó suavemente para evitar la formación de espuma.
2. Se retira el contenido del frasco T75 y se ubica en dos tubos Falcon, los cuales son cubiertos con Parafilm y centrifugados a 200 g durante 10 minutos. Se observó la formación de un *pellet* en el fondo de los tubos Falcon. Una vez verificada esta condición se retiró el sobrenadante. Se adicionó a cada uno de los frasco 1 mL de medio DMEM suplementado con SFB al 10% v/v) y se agitaron suavemente hasta solubilizar por completo el *pellet* con las células.
3. Se tomaron 100 µl de muestra (células + medio) y se mezclaron con 100 µl de azul Tripán. Se agitaron suavemente y se observó en el microscopio empleando una cámara de Neubauer. Para tal fin se ubicó una lámina cubreobjetos sobre la parte superior de la cámara de Neubauer y se adicionó la mezcla sobre los bordes de la lámina de forma tal que esta se desplazara por difusión y cubriera la superficie.
4. Se realizó el conteo de las células. El tipo celular observado tenía una morfología redondeada de color blanco brillante. En la figura A1 se presenta una representación esquemática de una cámara de Neubauer:

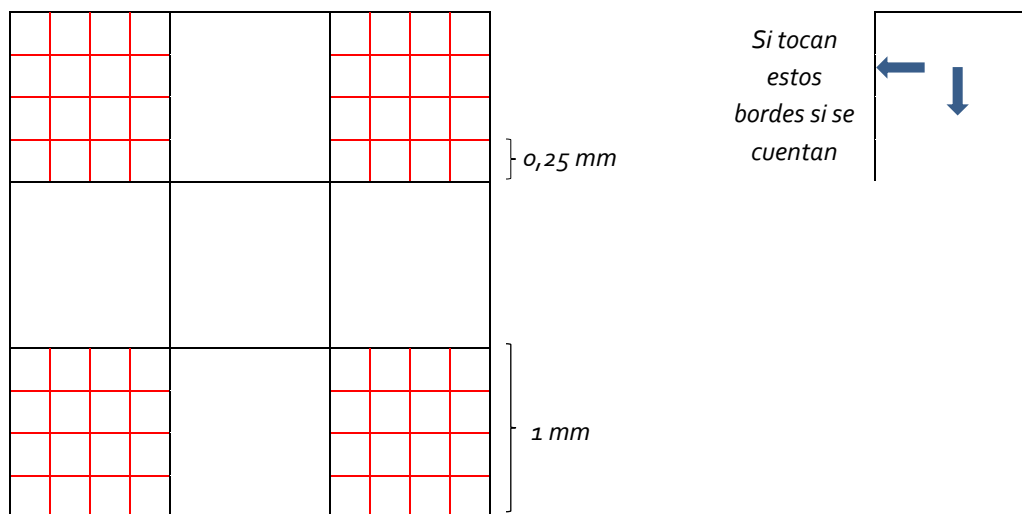


Figura A1. Cámara de Neubauer

La concentración celular (células/ mL) se calcula como la relación entre el número total de células y el volumen total (mL).

El área superficial de cada uno de los cuadros externos es:

$A_s = 0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$. Y dado que tiene una profundidad de $0,01 \text{ cm}$, el volumen se calcula como:

$$V = 0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 = 1 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

Por lo tanto la concentración celular en cada cuadrante en cada cuadrante es:

$$C = \text{Número células cuadrante} / \text{Volumen cuadrante}$$

Es decir

$$C = \text{Número de células cuadrante} / 1 \times 10^{-5} \text{ mL} = \text{Número de células cuadrante} \times 10^5 / \text{mL}$$

El número total de células lo obtengo como el promedio de los cuatro cuadrantes, así:

$$C_{\text{Tot}} = \text{Promedio de células cuadrantes} \times 10^5 / \text{mL}$$

Ahora, si se tomaron $100 \mu\text{l}$ de un volumen inicial de $1000 \mu\text{l}$, se calcula el factor de dilución que en este caso sería $0,1$ ($100 \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l}$) y la concentración total sería:

$$C_{\text{Tot}} = \text{Promedio de células cuadrantes} \times 10^5 / \text{mL} \times (1 / \text{Factor de dilución})$$

De esta forma se obtiene el número de células por mL.

Tabla A-1: Parámetros para el cultivo celular

Tipo de caja o frasco	Superficie / pozo	# células / pozo	Volumen de medio requerido
Caja de 96 pozos	$0,3 \text{ cm}^2$	5×10^3	$0,1 \text{ mL}$
Caja de 24 pozos	$1,5 \text{ cm}^2$	5×10^5	$0,5 \text{ mL}$
Caja de 6 pozos	$3,5 \text{ cm}^2$	8×10^5	2 mL
Caja de Petri $\varnothing=6 \text{ cm}$	21 cm^2	5×10^6	5 mL
Frasco T25	25 cm^2	5×10^6	5 mL
Caja de Petri $\varnothing=9,5 \text{ cm}$	55 cm^2	1×10^7	10 mL
Frasco T75	75 cm^2	2×10^7	20 mL

Anexo B. Protocolo de tinción celular con CellTrace™ CFSE Cell

MATERIALES

- CellTrace™ CFSE (Invitrogen, USA) (Componente A). Cada vial contiene 50 µg de polvo liofilizado.
- DMSO (Dimetil Sulfóxido) (Componente B). Cada vial contiene 0,5 ml de dimetilsulfóxido de alta calidad.

ALMACENAMIENTO Y MANEJO

- Los componentes deben ser almacenados y desecados a <-20°C antes de su uso
- Evite CONGELAR Y DESCONGELAR repetidamente
- Antes de abrir el vial, permita que este adquiera la temperatura ambiente
- Cuando son almacenados adecuadamente, tanto el DMSO como el CFSE son estables hasta por seis meses.
- Los reactivos en solución deber ser usados rápidamente.

CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES

Los picos aproximados de emisión y excitación de este producto después de la hidrólisis son 492nm y 517 nm respectivamente. Las células marcadas con CellTrace™ CFSE pueden ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia usando un filtro estándar de fluorescencia o pueden ser analizados mediante citometría de flujo en un instrumento equipado con una fuente de excitación a 488 nm.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ensayos cortos (viabilidad) requieren concentraciones bajas del marcador, entre 0,5-5 µM.

Nota: CellTrace™ CFSE reacciona con grupos amina y no debe ser usado con buffers que contengan aminas o soportes recubiertos con lisina.

1. Preparación de los reactivos

Prepare un solución stock 5mM de CFSE antes de usar, disolviendo el contenido de un vial (Componente A) en 18 μ L de DMSO (Componente B).

2. Marcaje de células en suspensión

- Centrifugue para obtener un pellet de células y retire el sobrenadante
- Diluya el stock CFSE 5mM en PBS o en otro *buffer* hasta alcanzar la concentración de trabajo deseada (0,5 – 5 mM)
- Resuspenda las células lentamente en PBS precalentado a 37°C (preparado en la etapa anterior)
- Incube las células durante 15 minutos a 37°C.
- Centrifugue de nuevo y resuspenda en medio fresco precalentado a 37°C.

Anexo C. Metodología para el procesamiento de las imágenes obtenidas

El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo empleando el *software* Image J®. Se inicia a partir de una fotografía de la muestra en formato .JPG (**Figura E- 1**)

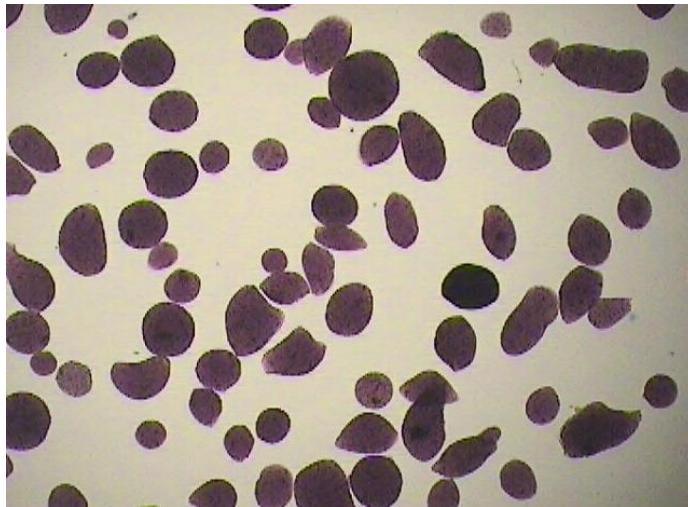


Figura E- 1. Fotografía de micropartículas a procesar

PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN

1. Abro el software *Image J*® y me debe aparecer la ventana presentada en la **Figura E- 2**.

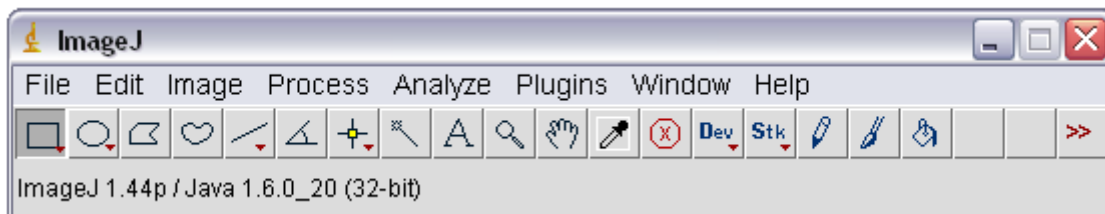


Figura E- 2. Ventana principal software *Image J*®

2. Me dirijo a **File** y selecciono la opción **Open** que me permite abrir el archivo que deseo procesar (Figura E- 3).

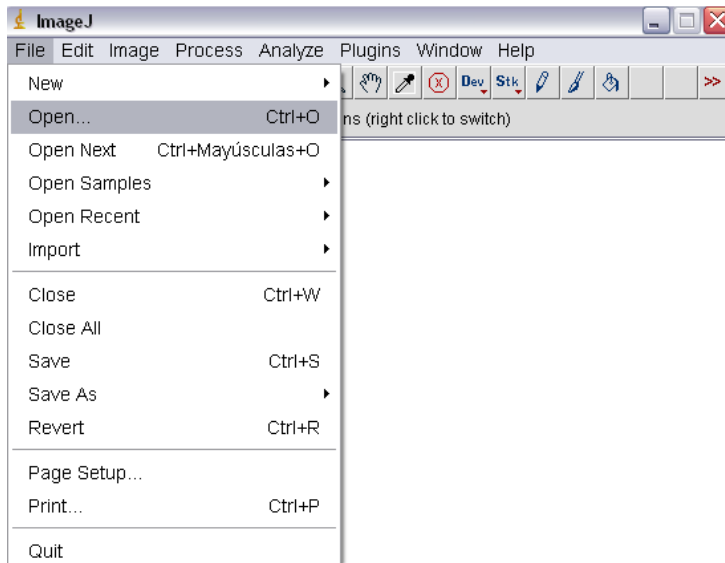


Figura E- 3. Procedimiento para abrir un archivo. Image J®/File/Open (Ctrl +O)

3. Sigo los pasos indicados en la Figura E- 4. para pasar la imagen a blanco y negro (selecciono la opción *Process/Binary/Make Binary*) y se obtiene la imagen presentada en la Figura E- 5.

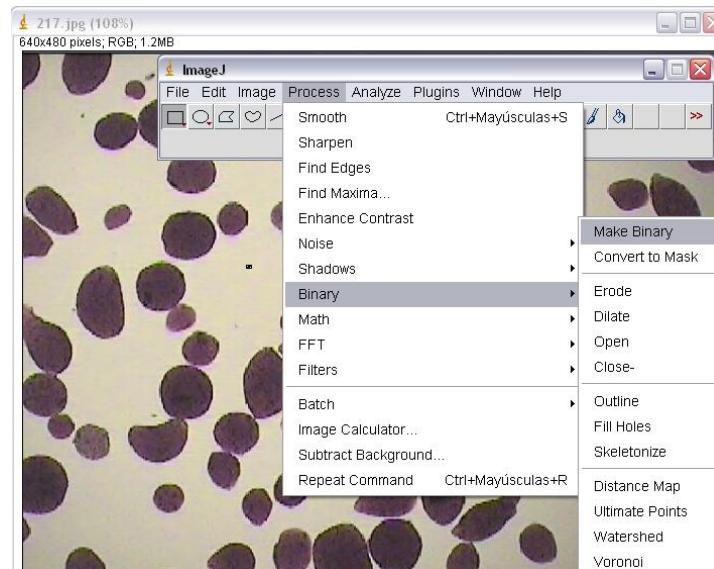


Figura E- 4. Procedimiento para pasar la imagen a formato binario (blanco y negro)

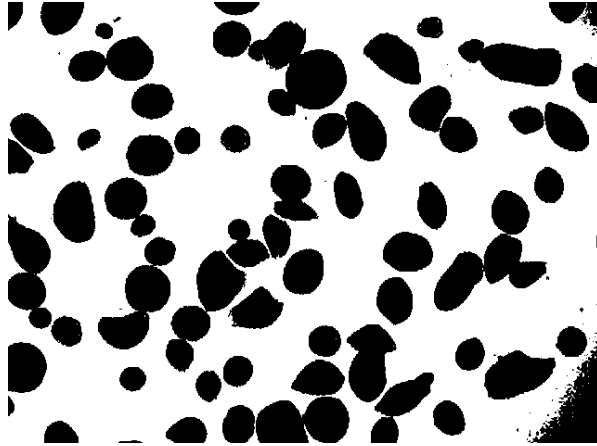



Figura E- 5. Imagen en blanco y negro

4. Como se puede apreciar en la **Figura E- 5**, quedan algunas sombras en la imagen como resultado de pasar la imagen de color a una escala de blanco y negro. Así mismo se observa que algunas partículas quedan unidas. Para solucionar estos inconvenientes, se despliega una barra

de herramientas haciendo clic en el icono , señalado en la **Figura E- 6** y se selecciona la opción *Drawing tools*, tal como se muestra en la **Figura E- 7**.

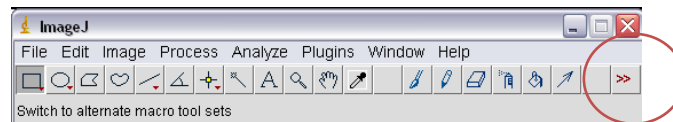


Figura E- 6. *Drawing tools*

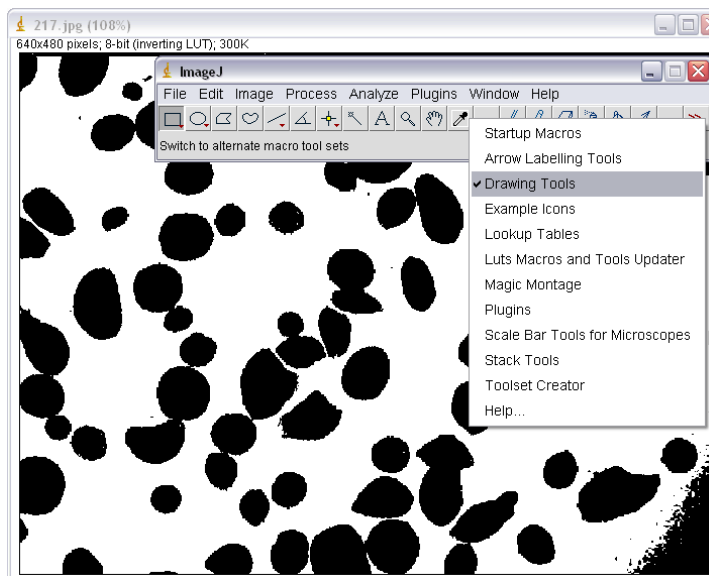






Figura E- 7. Activación de la herramienta de dibujo: *Drawing tools*

5. Haciendo uso de los siguientes comandos, adecuo la imagen para obtener finalmente la **Figura E- 8** que no tiene sombras y que presenta las partículas separadas.

 *Paintbrush Tool* (Sirve para hacer trazos libres)

 *Pencil Tool* (Sirve para hacer trazos libres)

 *Eraser Tool* (Sirve para borrar los trazos elaborados o parte del dibujo)

 *Flood Fill Tool* (Sirve para llenar una superficie cerrada)

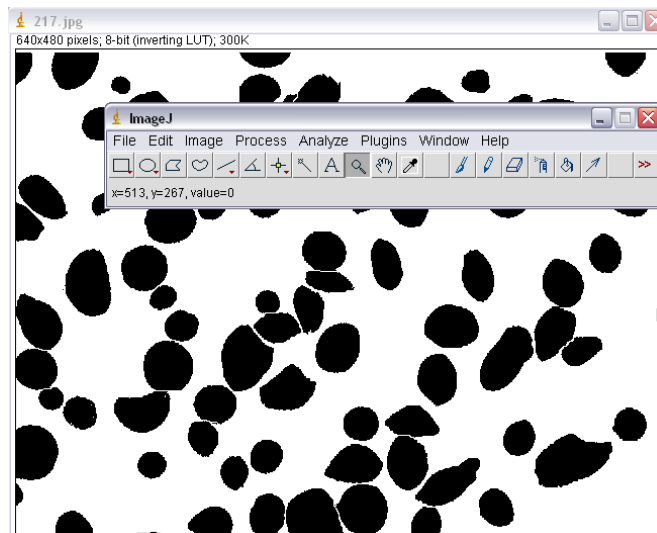


Figura E- 8. Adecuación de la imagen usando los comandos de *Drawing tools*

Esta imagen debe guardarse con otro nombre para conservar el archivo original. La medición del tamaño de partícula se realiza con el *software* del microscopio *Motic Images Plus 2.0*,

MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

1. Abro el *software* del microscopio *Motic Images Plus 2.0*, y se despliega un cuadro de diálogo como el que se presenta en la **Figura E- 9**. Selecciono el ícono *Abrir* y abro la imagen modificada con el *software* anterior.

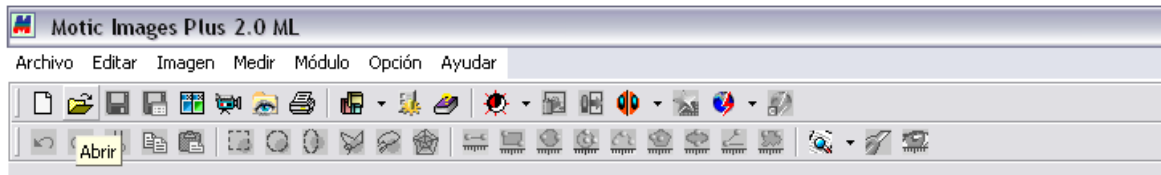


Figura E- 9. Cuadro de diálogo *software* del microscopio *Motic Images Plus 2.0*,

2. Una vez cargada la imagen, se selecciona la opción de *Auto-segmentar* (Figura E- 10) y el software reconoce las zonas oscuras, marcándolas de verde y las cuenta como partículas (Figura E- 11)



Figura E- 10. Opción auto-segmentar

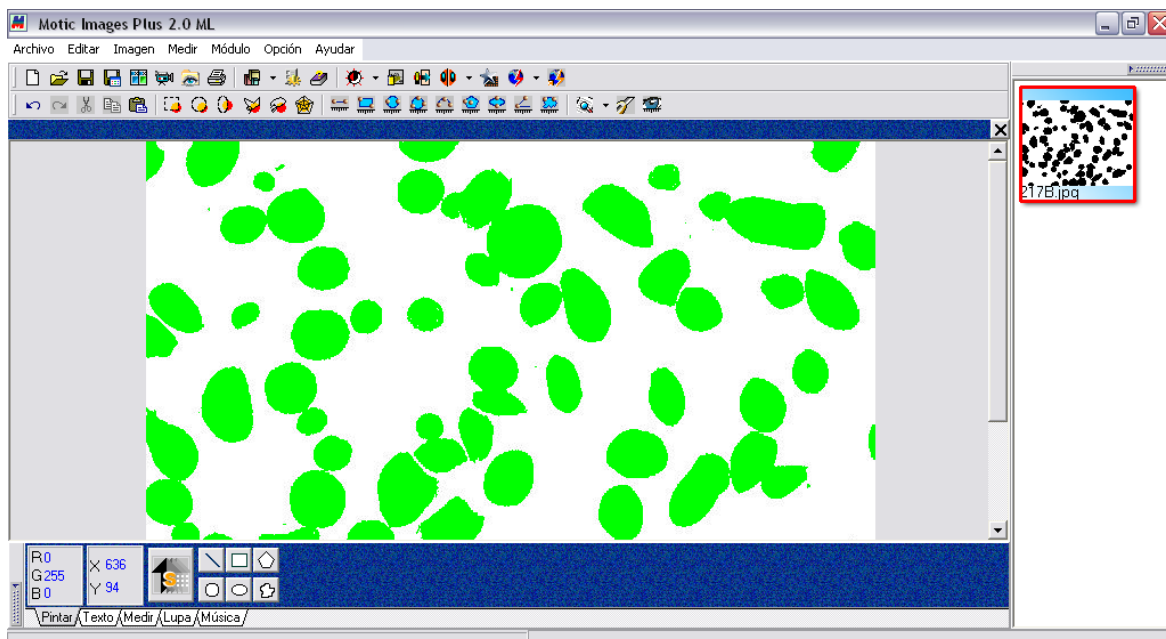


Figura E- 11. Imagen autosegmentada

3. En la parte inferior izquierda de la pantalla se selecciona la opción *Medir* (Figura E- 12) y se despliega un cuadro de diálogo que permite seleccionar el Lente objetivo empleado para la toma de la fotografía. En este caso el lente empleado fue el de 10X (Figura E- 13).



Figura E- 12. Selección de la opción **Medir**



Figura E- 13. Selección del **Lente objetivo**

4. Una vez seleccionado el lente objetivo, se selecciona la opción *Auto-calcular* (Figura E- 14).



Figura E- 14. Selección de la opción **Auto-calcular**

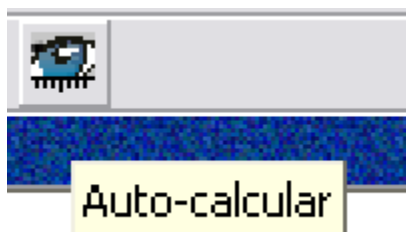


Figura E- 15. Opción **Auto-calcular**

5. La opción *Autocalcular* (Figura E- 15) despliega un cuadro de diálogo (Figura E- 16) con información acerca del número de partículas reconocidas, su área y su perímetro, tal como se muestra en la figura 8, estos datos pueden ser guardados como .txt o .xls, lo cual me permite manipularlos posteriormente para su análisis, mediante la opción exportar que se encuentra en el extremo inferior izquierdo.

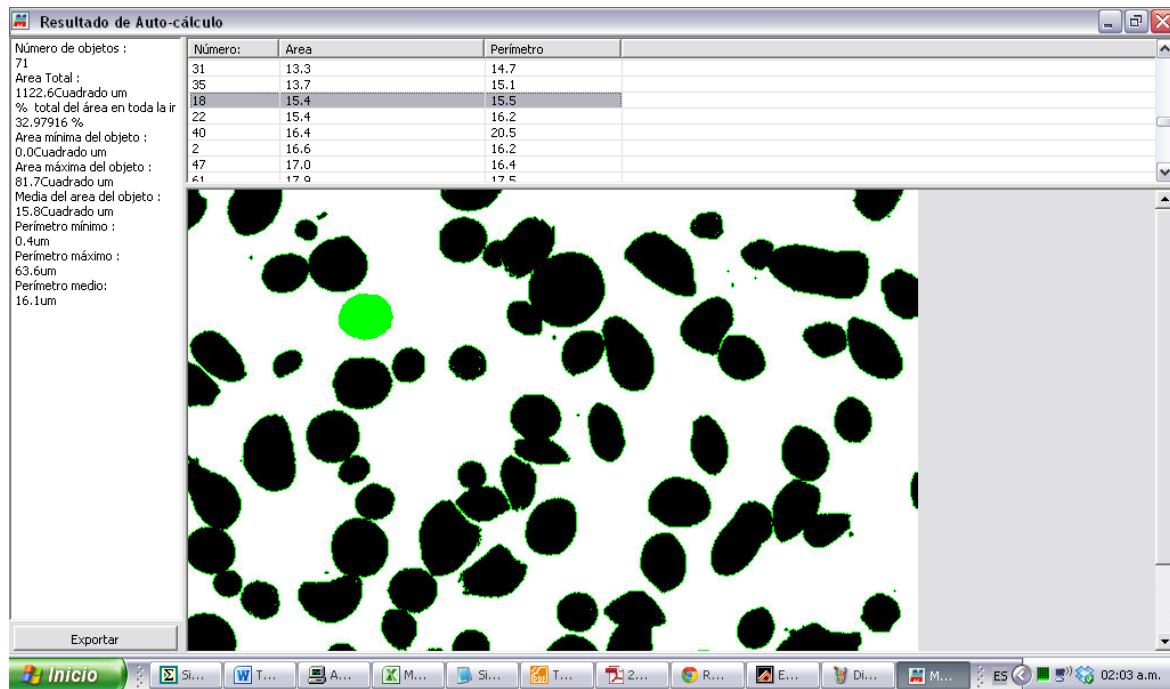


Figura E- 16. Resultado del auto-cálculo.

6. Con los valores del área o del perímetro, se calcula un diámetro de partícula equivalente, asumiendo que la partícula es totalmente esférica.

Sea

Área circunferencia: $\pi D^2/4$

Perímetro circunferencia: πD

Donde D : diámetro de la circunferencia.

Bibliografía

Advanced Biohealing, I. (2010). "Dermagraft Active Living Cells." Consultado el 29 de mayo del 2012, de la página web <http://www.dermagraft.com/about/overview/>.

Akpalo, E.; Bidault, L.; Boissière, M.; Vancaeyzeele, C.; Fichet, O. and Garde, V.L. (2011). Fibrin-polyethylene oxide interpenetrating polymer networks: New self-supported biomaterials combining the properties of both protein gel and synthetic polymer. *Acta Biomaterialia*. **7**(6): 2418-2427.

Alfred, R.; Taiani, J.T.; Krawetz, R.J.; Yamashita, A.; Rancourt, D.E. and Kallos, M.S. (2011). Large-scale production of murine embryonic stem cell-derived osteoblasts and chondrocytes on microcarriers in serum-free media. *Biomaterials*. **32**: 6006-6010.

Altieri, D.C.; Agbanyo, F.R.; Plescia, J.; Ginsberg, M.H.; Edgington, T.S. and Plow, E.F. (1990). A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Biological Chemistry*. **265**: 12119-12122.

AM-Scientifics-Ltd. (2008). EZ-Derm TM: Biosynthetic wound dressing.

Amaral, M.; Gomes, P.S.; Lopes, M.A.; Santos, J.D.; Silva, R.F. and Fernandes, M.H. (2009). Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia*. **5**(2): 755-763.

Amici, E.; Tetradis-Meris, G.; de Torres, C.P. and Jousse, F. (2008). Alginate gelation in microfluidic channels. *Food Hydrocolloids*. **22**(1): 97-104.

Andersen, T.; Strand, B.L.; Formo, K.; Alsberg, E. and Christensen, B. (2012). Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Carbohydrate Chemical*. **37**: 227-258.

Andreas, K.; Zehbe, R.; Kazubek, M.; Grzeschik, K.; Sternberg, N.; Bäuml, H.; Schubert, H.; Sittlinger, M. and Ringe, J. (2011). Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. **7**: 1485-1495.

Apligraf®. (2010). "Apligraf® - Get to know living technology." Consultado el 23 de septiembre del 2012, de la página web http://www.apligraf.com/professional/pdf/APG_Factsheet.pdf.

ASTM (2011). ASTM E323-11 Standard Specification for perforated-plate sieves for testing purposes.

Aunins, J.G.; Bibila, T.A.; Gatchalian, S.; Hunt, G.R.; Junker, B.H.; Lewis, J.A.; Licari, P.; Ramasubramanian, K.; Ranucci, C.S.; Seamans, T.C.; Seifert, D.B.; Zhou, W.; Waterbury, J. and Buckland, B.C. (1997). Reactor Development for the Hepatitis A Vaccine VAQTA™. *Animal Cell Technology*. M. T. Carrondo; B. Griffiths and J. P. Moreira, Springer Netherlands: 175-183.

Bach, T.L.; Barsigian, C.; Yaen, C.H. and Martinez, J. (1998). Endothelial cell VE-Cadherin functions as a receptor for the β 15-42 sequence of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**(46): 30719-30728.

Balasubramani, M.; Kumar, T.R. and Babu, M. (2001). Skin substitutes: a review. *Burns*. **27**(5): 534-544.

Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **28**(9): 409-412.

BioHorizons® (2008). AlloDerm® Regenerative Tissue Matrix. B. I. Systems.

Borzacchiello, A.; Ambrosio, L.; Netti, P. and Nicolais, L. (2003). Rheology of Biological Fluids and Their Substitutes. Tissue engineering and novel delivery systems. M. J. Yaszemski; D. J. Trantolo; K.-U. Lewandrowski *et al.* New York. USA: 330-350.

Boston Scientific Corporation, I. (2004). "Repliform® Tissue Regeneration Matrix." Consultado el 3 de octubre del 2012, de la página web http://www.bostonscientific-international.com/templatedata/imports/collateral/Gynecology/broc_Repliform_01_ug_us.pdf.

Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T. and Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*. **36**(4): 450-460.

Burnouf, T.; Lee, C.-Y.; Luo, C.-W.; Kuo, Y.-P.; Chou, M.-L.; Wu, Y.-W.; Tseng, Y.-H. and Su, C.-Y. (2012). Human blood-derived fibrin releasates: Composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals*. **40**(1): 21-30.

Celleno, L. and Tamburi, F. (2009). Chapter 1 - Structure and Function of the Skin. Nutritional Cosmetics. T. Aaron; M. D. Ceo and M. B. Robert. Boston, William Andrew Publishing: 3-45.

Cepeda, F. (1999). Estudio preliminar de la formación de epidermis *in vitro*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogota, Universidad Nacional de Colombia. **Pregrado**.

Clark, A.H. and Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Biopolymers. Advances in polymer science. A. H. Clark; K. Kamide; S. B. Ross-Murphy and M. Saito. New York, USA, Springer-Verlag. **83**: 57-192.

Clark, R.A.F. and Singer, A.J. (2000). Chapter 61 - Wound Repair: Basic Biology to Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering (Second Edition). P. L. Robert; L. Robert; R. L. Joseph Vacanti A2 - Robert P. Lanza and V. Joseph. San Diego, Academic Press: 857-878.

CookBiotech. (2013). "Oasis® wound matrix is a naturally derived structure that supports the Body's Healing Process." Consultado el 13 de agosto del 2012, de la página web <http://www.oasiswoundmatrix.com/aboutowm>.

- Cotsarelis, G. (2006). Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric view. *Journal of Investigative Dermatology*. **126**: 1459-1468.
- Covidien. (2012). "Permacol Surgical Implant." Consultado el 15 de julio del 2012, de la página web <http://www.autosuture.com/autosuture/pageBuilder.aspx?topicID=170603&breadcrumbs=0:63659,30707:0,170596:0>.
- Croisier, F. and Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. **49**(4): 780-792.
- Chen, A.K.-L.; Chen, X.; Choo, A.B.H.; Reuveny, S. and Oh, S.K.W. (2011). Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. **7**(2): 97-111.
- Chen, X.-G.; Liu, C.-S.; Liu, C.-G.; Meng, X.-H.; Lee, C.M. and Park, H.-J. (2006). Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. **27**: 269–274.
- Cheresh, D.A.; Berliner, S.A.; Vicente, V. and Ruggeri, Z.M. (1989). Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell*. **58**: 945-953.
- Chernousov, M.A. and Carey, D.J. (2003). $\alpha V\beta 8$ integrin is a Schwann cell receptor for fibrin. *Experimental Cell Research*. **291**: 514-524.
- Choudhary, S. and Bhatia, S.R. (2012). Rheology and nanostructure of hydrophobically modified alginate (HMA) gels and solutions. *Carbohydrate Polymers*. **87**(1): 524-530.
- De Beule, P.A.A.; Dunsby, C.; Galletly, N.P.; Stamp, G.W.; Chu, A.C.; Anand, U.; Anand, P.; Benham, C.D.; Naylor, A. and French, P.M.W. (2007). A hyperspectral fluorescence lifetime probe for skin cancer diagnosis. *Review of Scientific Instruments*. **78**(12).
- Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. **1**(98): 1949-1953.
- Dreesmann, L.; Ahlers, M. and Schlosshauer, B. (2007). The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials*. **28**(36): 5536-5543.
- Eibes, G.; dos Santos, F.; Andrade, P.Z.; Boura, J.S.; Abecasis, M.M.A.; da Silva, C.L. and Cabral, J.M.S. (2010). Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*. **146**(4): 194-197.
- Enoch, S. and Leaper, D.J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **23**(2): 37-42.
- Enoch, S. and Leaper, D.J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **26**(2): 31-37.
- Eurosurgical. (2013). "Pelnac - Artificial dermis." Consultado el 12 de marzo del 2013, de la página web <http://www.eurosurgical.co.uk/wound-care-burns/pelnac/>.

Eyrich, D.; Brandl, F.; Appel, B.; Wiese, H.; Maier, G.; Wenzel, M.; Staudenmaier, R.; Goepferich, A. and Blunk, T. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*. **28**(1): 55-65.

Falanga, V. and Faria, K. (2007). Chapter seventy-seven - Bioengineered skin constructs. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). L. Robert;L. Robert;R. L. Joseph VacantiA2 - Robert Lanza and V. Joseph. Burlington, Academic Press: 1167-1185.

Falvo, M.R.; Gorkun, O.V. and Lord, S.T. (2010). The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophysical Chemistry*. **152**(1-3): 15-20.

FDA. (2002). "INTEGRA® Dermal Regeneration Template." Consultado el 17 de septiembre del 2012, de la página web http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/P900033S008d.pdf.

Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J. and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. **24**(7): 1121-1131.

GE-Healthcare (2005). Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods. Handbooks from GE Healthcare: 18-1140-1162.

Genzel, Y.; Fischer, M. and Reichl, U. (2006). Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine*. **24**(16): 3261-3272.

Genzyme-Corportation®. (2013). "Epicel®:Important Safety Information." Consultado el Noviembre 16 del 2013, de la página.

Ghosh, K. and Clark, R.A.F. (2007). Chapter seventy-six - Wound repair. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). L. Robert;L. Robert and V. Joseph. Burlington, Academic Press: 1149-1166.

Goh, C.H.; Heng, P.W.S. and Chan, L.W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. **88**(1): 1-12.

Gomez, C.G.; Pérez Lambrecht, M.V.; Lozano, J.E.; Rinaudo, M. and Villar, M.A. (2009). Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*. **44**(4): 365-371.

Grinnell, F. and Feld, M. (1980). Spreading of human fibroblasts in serum free medium: Inhibition by dithiothreitol and the effect of cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *Journal of Cellular Physiology*. **104**(321-334).

Grinnell, F. and Hays, D.G. (1978). Cell adhesion and spreading factor: Similarity to cold insoluble globulin in human serum. *Experimental Cell Research*. **115**: 221-229.

Grinnell, F.; Hays, D.G. and Minter, D. (1977). Cell adhesion and spreading factor: Partial purification and properties. *Experimental Cell Research*. **110**: 175-190.

- Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S. and Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **63**(4-5): 352-366.
- Grosskinsky, U. (2006). Biomaterial regulations for tissue engineering. *Desalination*. **199**(1-3): 265-267.
- Gustafson, C.-J.; Birgisson, A.; Junker, J.; Huss, F.; Salemark, L.; Johnson, H. and Kratz, G. (2007). Employing human keratinocytes cultured on macroporous gelatin spheres to treat full thickness-wounds: An in vivo study on athymic rats. *Burns*. **33**(6): 726-735.
- Hansaplast®. (2012). "Curación de heridas y heridas." Consultado el 25 de septiembre del 2012, de la página web <http://www.hansaplast.es/technology/wound-healing-and-wounds>.
- Hansbiomedical. (2012). "SureDerm™." Consultado el 23 de septiembre del 2012, de la página web http://www.hansbiomed.com/english/2product/2.1/2.1.1_surederm.htm.
- Hao, X.; Jeffery, J.L.; Le, T.P.T.; McFarland, G.; Johnson, G.; Mulder, R.J.; Garrett, Q.; Manns, F.; Nankivil, D.; Arrieta, E.; Ho, A.; Parel, J.-M. and Hughes, T.C. (2012). High refractive index polysiloxane as injectable, in situ curable accommodating intraocular lens. *Biomaterials*. **33**(23): 5659-5671.
- Hardy, J.J.; Carrell, N.A. and McDonagh, J. (1983). Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. (408): 279-287.
- Healthcare-Ltd. (2011). "Biobrane." Consultado el 11 de noviembre del 2011, de la página web <http://www.woundcarehandbook.com/product/526/biobrane>.
- Hirano, Y.; Okuno, M.; Hayashi, T.; Goto, K. and Nakajima, A. (1993). Cell attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **4**: 235-243.
- Hornig, C.B.C. (1975). Primary culture of mammalian cells on microcarrier surface. Buffalo, NY, State University of New York. **Ph. D. Thesis**
- Hu, A.Y.-C.; Weng, T.-C.; Tseng, Y.-F.; Chen, Y.-S.; Wu, C.-H.; Hsiao, S.; Chou, A.-H.; Chao, H.-J.; Gu, A.; Wu, S.-C.; Chong, P. and Lee, M.-S. (2008). Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine*. **26**(45): 5736-5740.
- Huang, L.; Gao, W.; Zhou, J. and Wang, R. (2010). Systems biology applications to explore secondary metabolites in medicinal plants. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. **35**(1): 7-12.
- Huang, S.; Deng, T.; Wang, Y.; Deng, Z.; He, L.; Liu, S.; Yang, J. and Jin, Y. (2008). Multifunctional implantable particles for skin tissue regeneration: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*. **4**(4): 1057-1066.
- Hughes, R.C.; Pena, S.D.; Clark, J. and Dourmashkin, R.R. (1979). Molecular requirements for adhesion and spreading of hamster fibroblasts. *Experimental Cell Research*. **121**: 307-314

Hundt, B.; Best, C.; Schlawin, N.; Kaßner, H.; Genzel, Y. and Reichl, U. (2007). Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave® Bioreactor microcarrier culture in 1–10 L scale. *Vaccine*. **25**(20): 3987-3995.

Ikada, Y. (2006). Chapter 3 Basic Technologies Developed for Tissue Engineering. Interface Science and Technology. I. Yoshito, Elsevier. **Volume 8**: 235-421.

Integra®. (2012). "Integra® Product Description and Benefit." Consultado el 3 de marzo del 2011, de la página web http://www.ilstraining.com/idrt/idrt/brs_it_01.html.

Ionescu, A.-M.; Alaminos, M.; Cardona, J.d.I.C.; García-López Durán, J.d.D.; González-Andrades, M.; Ghinea, R.; Campos, A.; Hita, E. and Pérez, M.d.M. (2011). Investigating a novel nanostructured fibrin–agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**(8): 1963-1973.

Jacinto, A.; Martínez-Arias, A. and Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biology*. **3**: E117-E123.

Jean, J.; Garcia-Pérez, M.E. and Pouliot, R. (2011). Bioengineered Skin: The self-assembly approach. *Tissue Science & Engineering*. **S5:001**.

Jones, I.; Currie, L. and Martin, R. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*. **55**(3): 185-193.

Kim, B.-S.; Park, I.-K.; Hoshiba, T.; Jiang, H.-L.; Choi, Y.-J.; Akaike, T. and Cho, C.-S. (2011). Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. **36**(2): 238-268.

Kindred, C.; Oresajo, C.O. and Halder, R.M. (2009). Chapter 2 - Overview of the Structure and Function of Ethnic Skin. Nutritional Cosmetics. T. Aaron;Md;Ceo and M. B. Robert. Boston, William Andrew Publishing: 47-62.

Lai-Cheong, J.E. and McGrath, J.A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. **37**(5): 223-226.

Lau, T.T.; Wang, C. and Wang, D.-A. (2010). Cell delivery with genipin crosslinked gelatin microspheres in hydrogel/microcarrier composite. *Composites Science and Technology*. **70**(13): 1909-1914.

Lauricella, A.M. (2007). Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **41**(1): 7-19.

Lebitasy, M.P.; Latinne, D.; Maisin, D.; Vertommen, D. and Eeckhoudt, S. (2011). Clauss assay and fibrinogen protein estimated by capillary zone electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **49**(4): 689-693.

- Lee, B.-H.; Li, B. and Guelcher, S.A. (2012). Gel microstructure regulates proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells encapsulated in alginate beads. *Acta Biomaterialia*. **8**(5): 1693-1702.
- Leshner, A.P.; Curry, R.H.; Evans, J.; Smith, V.A.; Fitzgerald, M.T.; Cina, R.A.; Streck, C.J. and Hebra, A.V. (2011). Effectiveness of Biobrane for treatment of partial-thickness burns in children. *Journal of Pediatric Surgery*. **46**(9): 1759-1763.
- Liang, H.C.; Chang, Y.; Hsu, C.K.; Lee, M.H. and Sung, H.W. (2004). Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials*. **25**: 3541-3553.
- LifeCell®. (2012). "Strattice™ Reconstructive Tissue Matrix." Consultado el 2 de febrero del 2012, de la página web <http://www.lifecell.com/health-care-professionals/lifecell-products/stratticetm-reconstructive-tissue-matrix/>.
- Lindberg, K. and Badylak, S.F. (2001). Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. **27**(3): 254-266.
- Lishko, V.K.; Kudryk, B.; Yakubenko, V.P.; Yee, V.C. and Ugarova, T.P. (2002). Regulated unmasking of the cryptic binding site for integrin $\alpha_M \beta_2$ in the γ C-domain of fibrinogen. *Biochemistry*. **41**: 12942–12951.
- Liu, X.; Qian, L.; Shu, T. and Tong, Z. (2003). Rheology characterization of sol–gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*. **44**(2): 407-412.
- Llames, S.; García, E.; García, V.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Jorcano, J.L.; López, E.; Holguín, P.; Miralles, F.; Otero, J. and Meana, A. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*. **7**: 47-53.
- Ma, P.X. (2005). Alginate for Tissue Engineering. Scaffolding in Tissue Engineering. P. X. Ma and J. Elisseeff. **1**: 13-21.
- MacNeil, S. (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*. **11**(5): 26-35.
- Malda, J. and Frondoza, C.G. (2006). Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. *Trends in Biotechnology*. **24**(7): 299-304.
- Maroudas, N.G. (1975). Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *The Journal of Theoretical Biology*. **49**: 417- 424.
- Martin, S.S.; Alaminos, M.; Zorn, T.M.T.; Sánchez-Quevedo, M.C.; Garzón, I.; Rodríguez, I.A. and Campos, A. (2013). The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. **7**(10-19): 10.
- Mazzitelli, S.; Luca, G.; Mancuso, F.; Calvitti, M.; Calafiore, R.; Nastruzzi, C.; Johnson, S. and Badylak, S.F. (2011). Production and characterization of engineered alginate-based microparticles

containing ECM powder for cell/tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. **7**(3): 1050-1062.

Meana, A.; Iglesias, J.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Madrigal, B.; Fresno, M.F.; Martin, C.; San Roman, F. and Tevar, F. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. **24**(7): 621-630.

Meignier, B.; Mougeot, H. and Favre, H. (1980). Foot and mouth disease virus production on microcarrier-grown cells. *Developments in biological standardization*. **46**: 249-256.

Menon, G.K.; Cleary, G.W. and Lane, M.E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. **435**(1): 3-9.

Mercier, N.R.; Costantino, H.R.; Tracy, M.A. and Bonassar, L.J. (2005). Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. **26**(14): 1945-1952.

Moresi, M. and Bruno, M. (2007). Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. *Journal of Food Engineering*. **82**(3): 298-309.

Moresi, M.; Bruno, M. and Parente, E. (2004). Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Food Engineering*. **64**(2): 179-186.

Moresi, M.; Mancini, M.; Bruno, M. and Rancini, R. (2001). Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Texture Studies*. **32**: 375-396.

Mostow, E.N.; Haraway, G.D.; Dalsing, M.; Hodde, J.P. and King, D. (2005). Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: A randomized clinical trial. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery*. **41**(5): 837-843.

Mulder, L. (2002). Cell adhesion on alginate scaffolds for the Tissue Engineering of an aortic valve – A Review. Eindhoven University of Technology, Faculty of Biomedical Engineering. 1-45.

Navarro, A.S.; Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. (1997). Viscoelastic properties of frozen starch-triglycerides systems. *Journal of Food Engineering*. **34**(4): 411-427.

Nawaz, Z. and Bentley, G. (2011). Surgical incisions and principles of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **29**(2): 59-62.

Nunamaker, E.A.; Otto, K.J. and Kipke, D.R. (2011a). Investigation of the material properties of alginate for the development of hydrogel repair of dura mater. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**: 16-33.

Nunamaker, E.A.; Otto, K.J. and Kipke, D.R. (2011b). Investigation of the material properties of alginate for the development of hydrogel repair of dura mater. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **4**(1): 16-33.

Oblong, J.E. and Millikin, C. (2009). Chapter 2 - Skin Biology: Understanding Biological Targets for Improving Appearance. *Cosmetics Applications of Laser & Light-Based Systems*. S. A. Gurpreet. Boston, William Andrew Publishing: 37-48.

Olympus-Terumo-Biomaterials-Corp. (2012). "Terudermis." Consultado el 4 de noviembre del 2012, de la página web <http://www.biomaterial.co.jp/en/products/terudermis/product.html>.

Ortega-Zilic, N.; Hunziker, T.; Läuchli, S.; Mayer, D.O.; Huber, C.; Baumann Conzett, K.; Sippel, K.; Borradori, L.; French, L.E. and Hafner, J. (2010). EpiDex® Swiss Field Trial 2004–2008. *Dermatology*. **221**(4): 365-372.

Ostrovsky, G. (2006). "Orcel® Wound Sealant." Consultado el 14 de abril del 2011, de la página web <http://www.medgadget.com/2006/page/56>.

Palakkan, A.A.; Hay, D.C.; Anil Kumar, P.R.; Kumary, T.V. and Ross, J.A. (2013). Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver international*. **33**(5): 666-676.

Parenteau, N.L.; Hardin-Young, J. and Ross, R.N. (2000). Chapter 62 - Skin. *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*. P. L. Robert; L. Robert; R. L. Joseph VacantiA2 - Robert P. Lanza and V. Joseph. San Diego, Academic Press: 879-890.

Park, J.-H.; Pérez, R.A.; Jin, G.-Z.; Choi, S.-J.; Kim, H.-W. and Wall, I.B. (2013). Microcarriers Designed for Cell Culture and Tissue Engineering of Bone. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. **19**(2): 172-190.

Park, Y.; Subramanian, K.; Verfaillie, C.M. and Hu, W.S. (2010). Expansion and hepatic differentiation of rat multipotent adult progenitor cells in microcarrier suspension culture. *Journal of Biotechnology*. **150**(1): 131-139.

Pawar, S.N. and Edgar, K.J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*. **33**(11): 3279-3305.

Peter, S. (2001). Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*. **27**(5): 517-522.

Petiot, E.; Bernard-Moulin, P.; Magadoux, T.; Gény, C.; Pinton, H. and Marc, A. (2010). In situ quantification of microcarrier animal cell cultures using near-infrared spectroscopy. *Process Biochemistry*. **45**(8): 1427-1431.

Phillips, B.W.; Meng Lim, R.Y.; Teck, T.T.; Rust, W.L. and Crook, J.M. (2008a). Efficient expansion of clinical-grade human fibroblasts on microcarriers: Cells suitable for *ex vivo* expansion of clinical-grade hESCs. *Journal of Biotechnology*. **134**: 79-87.

Piechocka, I.; Bacabac, R.G.; Potters, M.; MacKintosh, F.C. and Koenderink, G. (2010). Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophysical Journal*. **98**: 2281-2289.

Pörtner, R.; Nagel-Heyer, S.; Goepfert, C.; Adamietz, P. and Meenen, N.M. (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **100**(3): 235-245.

Price, R.; Anthony, E.; Myers, S. and Navsaria, H. (2008). Chapter 17 - Tissue engineering for skin transplantation. *Tissue Engineering*. B. Clemens van;T. Peter;L. Anderset *al.* Burlington, Academic Press: 507-532.

Quinn, A.G. (2004). Biology of the skin and dermatological disease. *Medicine*. **32**(12): 1-3.

Rand, M.L. and Murray, R. (2000). Chapter 51. Hemostasis & Thrombosis. *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill. **26**.

Rand, M.L. and Murray, R.K. (2003). Hemostasis & Thrombosis. *Harper's Illustrated Biochemistry*. J. Foltin;J. Ransom and J. Matragrano. United States, McGraw-Hill Companies. **26**: 702.

Regenicin. (2011). "About Permaderm." Consultado el 5 de noviembre del 2011, de la página web <http://www.regenicin.com/about/about-permaderm.html>.

Reichardt, A.; Polchow, B.; Shakibaei, M.; Henrich, W.; Hetzer, R. and Lueders, C. (2013). Large Scale Expansion of Human Umbilical Cord Cells in a Rotating Bed System Bioreactor for Cardiovascular Tissue Engineering Applications. *The Open Biomedical Engineering Journal*. **7**: 50-61.

Santiago, P.A.; Giordano, R.d.C. and Torres Suazo, C.A. (2011). Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers. *Process Biochemistry*. **46**: 35-45.

Seal, B.L.; Otero, T.C. and Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. **34**(4-5): 147-230.

Seland, H.; Gustafson, C.-J.; Johnson, H.; Junker, J.P.E. and Kratz, G. (2011). Transplantation of acellular dermis and keratinocytes cultured on porous biodegradable microcarriers into full-thickness skin injuries on athymic rats. *Burns*. **37**(1): 99-108.

Seo, J.-H.; Matsuno, R.; Takai, M. and Ishihara, K. (2009). Cell adhesion on phase-separated surface of block copolymer composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and poly(dimethylsiloxane). *Biomaterials*. **30**(29): 5330-5340.

Shevchenko, R.V.; James, S.L. and James, E.S. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of The Royal Society Interface*. **7**: 229-258.

Shikanov, A.; Xu, M.; Woodruff, T.K. and Shea, L.D. (2009). Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials*. **30**(29): 5476-5485.

Shirokaze, J.; Yanagida, K. and Shudo, K. (1997). Monoclonal Antibody Production Using Macroporous Microcarrier. *Animal Cell Technology*. **8**: 273-280.

Shores, J.T.; Gabriel, A. and Gupta, S. (2007). Skin substitutes and alternatives: A review. *Advances in skin and wound care*. **20**: 493 - 508.

Silvera , L.A. and Barrios de Zurbarán, C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*. **16**: 9 -18.

Sinha, V.R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K. and Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. **274**(1–2): 1-33.

Smith, C.; Marks, A.D. and Lieberman, M. (2004). Chapter 45. Blood Plasma Proteins, Coagulation and Fibrinolysis. 'Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. L. W. Wilkins. **2**: 900.

SoloHill-Eng-Inc. (2013). "World Leader in Microcarrier Technology." Consultado el 12 de octubre del 2013, de la página web <http://www.solohill.com/Solohill/Microcarrier/Products/>.

Sommar, P.; Pettersson, S.; Ness, C.; Johnson, H.; Kratz, G. and Junker, J.P.E. (2010). Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatine microcarriers. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. **63**(6): 1036-1046.

Sosa Herrera, M.G.; Lozano Esquivel, I.E.; Ponce de León Ramírez, Y.R. and Martínez Padilla, L.P. (2012). Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. **29**(1): 175-184.

Souza, M.C.O.; Freire, M.S.; Schulze, E.A.; Gaspar, L.P. and Castilho, L.R. (2009). Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. *Vaccine*. **27**(46): 6420-6423.

Spicer, P.P. and Mikos, A.G. (2010). Fibrin glue as a drug delivery system. *Journal of Controlled Release*. **148**(1): 49-55.

Spraying-Systems-Co. (2012). "Catálogo de productos." Consultado el 5 de abril del 2011, de la página web http://es.spray.com/Descargas/Cat%C3%A1logo_70_.aspx.

Stokke, B.T.; Drager, K.I.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H. and Kajiwara, K. (1997). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. *Macromolecular Symposia*. **120**(1): 91-101.

Stokke, B.T.; Draget, K.I.; Smidsrød, O.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H. and Kajiwara, K. (2000). Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca–Alginate Gels. *Macromolecules*. **33**(5): 1853-1863.

Stratech-Corporation. (2010). "StrataGraft® skin tissue." Consultado el 5 de junio del 2012, de la página web <http://www.stratatechcorp.com/products/index.php>.

Sun, J.; Han, L. and Zhao, Z. (2008). Schizophrenia genes: Characteristics of function and protein interaction networks.

Sun, J. and Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Review. *Materials*. **6**: 1285-1309.

Szymonowicz, M.; Pielka, S.; aw; Owczarek, A.; Haznar, D. and Pluta, J. (2007). Study on Influence of Gelatin-Alginate Matrixes on the Coagulation System and Morphotic Blood Elements. *Macromolecular Symposia*. **253**(1): 71-76.

- Tashiro, S.; Tsumoto, K. and Sano, E. (2012). Establishment of a microcarrier culture system with serial sub-cultivation for functionally active human endothelial cells. *Journal of Biotechnology*. **160**(3–4): 202-213.
- Thomas, D.W.; O'Neill, I.D.; Harding, K.G. and Shepherd, J.P. (1995). Cutaneous Wound Healing: A Current Perspective. *Oral Maxillofacial Surgery*. **53**: 6.
- van der Veen, V.C.; van der Wal, M.B.A.; van Leeuwen, M.C.E.; Ulrich, M.M.W. and Middelkoop, E. (2010). Biological background of dermal substitutes. *Burns*. **36**(3): 305-321.
- van Wezel, A.L. (1976). The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarriers. *Development of specifications for biotechnology pharmaceutical product*. **37**: 143-147.
- Velnar, T.; Bailey, T. and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*. **37**(5): 1528-1542.
- Wang, C.; Gong, Y.; Lin, Y.; Shen, J. and Wang, D.-A. (2008). A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery. *Acta Biomaterialia*. **4**(5): 1226-1234.
- Weisel, J.W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*. **112**(2–3): 267-276.
- Wen, Y.; Ramos Gallego, M.; Feldskow Nielsen, L.; Jorgensen, L.; Everland, H.; Moller, E.H. and Nielsen, H.M. (2011). Biodegradable nanocomposite microparticles as drug delivering injectable cell scaffolds. *Journal of Controlled Release*. **156**: 11-20.
- Williamson, D. and Harding, K. (2004). Wound healing. *Medicine*. **32**(12): 4-7.
- Wisconsin-University. (2007). "StrataGraft Tissue Sample." Consultado el 3 de mayo del 2011, de la página web <http://photos.uc.wisc.edu/photos/7653/view>.
- Wu, S.-C.; Liu, J.-H. and Hong, W.W.L. (2006). Propagation kinetics of retrovirus transgene vector and replication-competent retrovirus in static and microcarrier cell culture systems using different medium exchange strategies. *Enzyme and Microbial Technology*. **38**(1–2): 229-236.
- Yang, Y.; Rossi, F.M.V. and Putnins, E.E. (2007). Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*. **28**(20): 3110-3120.
- Yang, Y.; Rossi, F.M.V. and Putnins, E.E. (2010). Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. **31**(33): 8574-8582.
- Yildirimer, L.; Thanh, N.T.K. and Seifalian, A.M. (2012). Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*. **30**(12): 638-648.

Young, A. and McNaught, C.-E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. **29**(10): 475-479.

Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K.; Draget, K.I. and Stokke, B.T. (2000). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 2. Time-resolved studies on ionotropic gels. *Journal of Molecular Structure*. **554**(1): 21-34.

Zhao, H.; Ma, L.; Zhou, J.; Mao, Z.; Gao, C. and Shen, J. (2008). Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomedical materials*. **3**: 1-9.

Zhou, L.; Kong, J.; Zhuang, Y.; Chu, J.; Zhang, S. and Guo, M. (2013). Ex vivo expansion of bone marrow mesenchymal stem cells using microcarrier beads in a stirred bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **18**(1): 173-184.