



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE SUSTITUTOS ARTIFICIALES
DE TEJIDO CONECTIVO DESARROLLADOS CON SOPORTES
MULTIDIRECCIONALES Y UNIDIRECCIONALES, EN UN MODELO
ANIMAL DE HERIDAS DE PIEL DE ESPESOR TOTAL**

Sergio Alexander Casadiegos Rincón

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017**

**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE SUSTITUTOS ARTIFICIALES DE TEJIDO
CONECTIVO DESARROLLADOS CON SOPORTES MULTIDIRECCIONALES Y
UNIDIRECCIONALES, EN UN MODELO ANIMAL DE HERIDAS DE PIEL DE ESPESOR
TOTAL**

**Tesis presentada como requisito parcial para recibir el título de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas**

Sergio Alexander Casadiegos Rincón

**Marta Raquel fontanilla Duque Q.F., Ph. D.
Directora**

**Rosa Helena Bustos Cruz Q.F. Dr. Rer. Nat.
Codirectora**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017**

Tabla de contenido

RESUMEN	120
1 INTRODUCCIÓN	12
2 MARCO TEÓRICO	14
2.1 La Piel	14
2.1.1 Lesiones de la piel	15
2.1.2 Cierre de Heridas de la Piel	16
2.2 Tratamiento de las Lesiones de Piel	21
2.3 Productos de Ingeniería de Tejidos que Sustituyen Piel	23
2.4 Cuantificación de Muestras Biológicas Usando Biosensores	28
2.5 Modelos Animales Empleados en la Evaluación del Cierre de Heridas de Piel	33
3 JUSTIFICACIÓN	36
4 HIPÓTESIS	37
5 OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo General	38
5.2 Objetivos Específicos	38
6 METODOLOGÍA	39
6.1 Purificación de Colágeno Tipo I	39
6.2 Elaboración de Soportes Multidireccionales y Unidireccionales	39
6.3 Experimento Animal	40
6.3.1 Recepción de los animales de experimentación	40
6.3.2 Aislamiento de fibroblastos autólogos de piel.....	40
6.3.3 Elaboración del tejido conectivo artificial (TCAA)	41
6.3.4 Experimentación quirúrgica	42
6.4 Cuantificación de factores en los exudados de las heridas	44
7 Resultados	48
7.1 Elaboración de Tejido Conectivo Artificial a Partir de Fibroblastos de Dermis y Soportes Multidireccionales y Unidireccionales de Colágeno Tipo I	48
7.2 Evaluación Preclínica del Tejido Artificial	50
7.3 Evaluación Histológica e Histomorfométrica	54
7.3.1 Descripción histológica.....	54
7.3.2 Evaluación histomorfométrica	57
7.4 Establecimiento de la Metodología Para la Cuantificación de Factores Solubles Presentes en Heridas Cutáneas de Espesor Total Durante su Cicatrización	63

7.4.1	Modificación de la superficie de los chips de oro con monocapas autoensambladas (SAM) de MHC-MUA.	63
7.4.2	Inmovilización de los anticuerpos	64
7.4.3	Cuantificación de factores de crecimiento y citoquinas en los exudados tomados de las heridas tratadas con MTCA o UTCA y sus controles en chips con monocapas elaboradas con MHC y MUA.	67
7.4.4	Cuantificación factores de crecimiento y citoquinas en los medios de cultivo de los tejidos artificiales y en las muestras de exudados de las heridas injertadas con estos tejidos.	69
8	Discusión	82
9	Conclusiones	91
10	Recomendaciones.	92
11	Bibliografía	93
12	Anexos	103
1A	103

Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema de la reacción de la inmovilización de los anticuerpos vía amino coupling. a, activación de los grupos carboxilos de las moléculas de MUA en las monocapas. b, inmovilización a través de ataque nucleofílico y formación de enlace amídico. c. Bloqueo de los grupos activos remanentes con etanolamina. Tomada y modificada de.⁹⁶ 33
- Figura 2. Procedimiento Quirúrgico. (A) Espalda rasurada comarcada con el fin de delimitar el lugar de la herida; (B) Escisión quirúrgica; (C) Aplicación del tratamiento; (D) Herida injertada y rodeada con splint. 43
- Figura 3. Toma de los exudados presentes en las heridas. 43
- Figura 4. Fotografías de los soportes multidireccionales y unidireccionales. Se muestran imágenes representativas de la apariencia longitudinal y transversal de los soportes multi- y unidireccionales elaborados. 48
- Figura 5. Micrografías de cultivos primarios de fibroblastos de piel de conejo. (A) Células que han migrado de un explante. (B) Células con morfología fusiforme. Escala de 500µm. 49
- Figura 6. Ensayo con MTT para verificar viabilidad de los tejidos. (A y B) Micrografías tomadas en el microscopio de luz invertido (menor y mayor magnificación, respectivamente), del tejido elaborado con soporte multidireccional. (B y C) Micrografías tomadas en el microscopio de luz invertida (menor y mayor magnificación, respectivamente), del tejido elaborado con soporte unidireccional..... 50
- Figura 7. Imágenes representativas de heridas injertadas. (A). Zona injertada con tejido multidireccional (MTCA); (B). Zona injertada con tejido unidireccional (UTCA). Se puede ver la diferencia en la integración de los tejidos artificiales a la cama y el borde de las heridas. 51
- Figura 8. Seguimiento clínico de heridas injertadas con UTCA o MTCA y sus respectivos controles (SI). Convenciones: Borde de la herida (B); sutura (S); tejido cicatrizal (C); pústula (P). 52
- Figura 9. Seguimiento clínico de heridas injertadas con MTCA o UTCA. Convenciones: Borde de la herida (WE); sutura (S); tejido cicatrizal (C). 53
- Figura 10. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos. (A) Imagen de corte proveniente de biopsia de herida injertada con MTCA; (B) Imagen de corte proveniente de la herida contralateral usada como control, (C) Imagen de corte proveniente de herida injertada

con UTCA, (D) Imagen de corte proveniente de herida usada como control. Convenciones: Vaso sanguíneo (BV); folículo piloso (HF); fibroblasto (F); fibra de colágeno (CF).....	55
Figura 11. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos. (A) Tejido proveniente de herida injertada con UTCA, (B) Tejido proveniente de herida injertada con MTCA. Vaso sanguíneo (BV); folículo piloso (HF); fibroblasto (F); fibra de colágeno (CF).....	56
Figura 12. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos comparadas con la piel sana. A: Piel sana B: MTCA, C: UTCA. Convenciones: Fibroblasto (F); Fibra de colágeno (CF); Epitelio (E).	57
Figura 13. Relación entre el espesor del tejido conectivo de las heridas injertadas (MTCA, UTCA) y control, con el espesor de la dermis sana circundante.	58
Figura 14. Relación entre el grosor del epitelio de las heridas injertadas (MTCA, UTCA) y control, con el grosor de la piel sana circundante.	59
Figura 15. Relación entre el número de vasos sanguíneos en la dermis de las heridas tratadas (MTCA, UTCA), heridas control y número de vasos de la piel sana circundante.	60
Figura 16. Disposición de las fibras de colágeno en el tejido obtenido. (A) Fibras densas en haces orientados aleatoriamente. (B) Fibras laxas en haces orientados aleatoriamente. (C) Fibras densas paralelas al epitelio. (D) Fibras laxas paralelas al epitelio	61
Figura 17. Porcentaje de la disposición de las fibras de colágeno en el tejido formado para cada tratamiento MTCA, UTCA y los controles.....	62
Figura 18. Sensorgrama representativo de la estandarización de monocapas autoensambladas (SAM) de MHC y MUA. Se evaluaron dos estrategias con diferentes tiempos de reacción del oro de la superficie del chip con los compuestos orgánicos. Estrategia 1: 8 horas de reacción; Estrategia 2: 24 horas de reacción.....	64
Figura 19. Sensorgramas de la inmovilización directa e indirecta de anti-Ang-2. (A) Inmovilización directa anti-Ang-2 en la superficie del chip de oro. (B) Inmovilización indirecta de anti-Ang-2 en el chip con proteína G pre-inmovilizada.....	65
Figura 20. Curvas de calibración obtenidas con monocapas autoensambladas de MUA y MHC. Se muestra el aumento en la señal UR a medida que aumenta la concentración de las proteínas patrón.	66
Figura 21. Sensorgrama de curvas de asociación y disociación. Cuantificación de Ang-2 en los exudados obtenidos de las heridas injertadas con tejido autólogo artificial.....	68

Figura 22. Determinación de las concentraciones de factores proteicos en exudados de heridas injertadas con AADm y AADu y sus respectivos controles (SI).....	69
Figura 23. Identificación de la concentración de saturación del anticuerpo anti- Ang-1. Relación de la concentración la proteína patrón y la respuesta en UR e identificación de puntos de saturación (círculo rojo).	72
Figura 24. Curva de calibración con monocapas autoensambladas con MUA. para 15 factores de crecimiento y citoquinas.	75
Figura 25. Curvas de asociación y disociación los factores y las citoquinas cuantificadas en las muestras de exudados	78
Figura 26. Concentraciones de los factores de crecimiento y citoquinas presentes en los medios de cultivo de MTCA y UTCA.	79
Figura 27. Concentraciones de factores y citoquinas en los exudados tomados de las heridas injertadas con MTCA y UTCA.	80
Figura 28. Cuantificación de las concentraciones de factores y citoquinas en los exudados tomados de las heridas injertadas con MTCA o UTCA, en el día sexto.	81

Lista de Tablas

Tabla 1. Productos de Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares Empleados en el Tratamiento de Lesiones de Piel.....	27
Tabla 2. Clasificación de los Biosensores de Acuerdo con el Fenómeno que Detectan ⁸⁶	29
Tabla 3. Comparación de Técnicas de Cuantificación Convencionales y Basadas en Biosensores. ⁸⁶	30
Tabla 1 Soluciones de Regeneración	67
Tabla 5. Comparación de la Respuesta Observada con SAM de MUA-MHC y SAM de MUA	70
Tabla 6. Límite de Detección.....	71

Lista de Anexos

Anexo 1 . Cuantificación de Factores de Crecimiento y Citoquinas.	103
--	-----

Resumen

La reparación de heridas cutáneas está mediada por factores de crecimiento y citoquinas que señalizan las células de la herida y del tejido sano circundante en cada una de las fases del proceso (inflamación, proliferación y remodelación). Estudios previos han mostrado que los sustitutos artificiales de tejido que contienen células, funcionan como sistemas de liberación de factores y citoquinas que intervienen en las primeras etapas del cierre de las heridas estimulando la formación de nuevo tejido y favoreciendo la regeneración sobre la reparación. Igualmente, que tejido conectivo artificial elaborado sembrando fibroblastos aislados de mucosa oral de conejo en soportes multidireccionales y unidireccionales de colágeno I, secretan en el medio de cultivo concentraciones diferentes de factores solubles importantes en el proceso de reparación de heridas. En este trabajo se comparó el desempeño de tejido conectivo autólogo artificial obtenido sembrando fibroblastos de piel en soportes con fibras y poros orientados multidireccionalmente (MTCA) y unidireccionalmente (UTCA) en un modelo lagomorfo de herida de espesor total de 4 cm². Igualmente, se estandarizó una metodología de cuantificación de factores de crecimiento y citoquinas en el medio de cultivo de los tejidos artificiales mencionados y en los exudados de las heridas injertadas con ellos, basada en un biosensor óptico de plasmones de resonancia (SPR) y monocapas autoensambladas (SAM) de alcanotioles. Se cuantificaron 15 factores y citoquinas en los medios de cultivo y en los exudados tomados al tercer y sexto día post-cirugía, de las heridas injertadas y de las dejadas cerrar por segunda intención (control). A pesar de la cicatrización fibrosa de las heridas de piel característica del modelo lagomorfo, fue posible evaluar el desempeño como injerto de dermis autóloga artificial multi y unidireccional en heridas de espesor total. El conjunto de resultados obtenidos soporta la hipótesis de que el tejido conectivo autólogo actúa como un sistema de entrega de señales bioactivas cuyo perfil de concentraciones cambia cuando las células se cultivan en soportes con diferente orientación de fibras y poros. Las observaciones clínicas, histológicas, histomorfométricas y las

cuantificaciones de factores que modulan la cicatrización indican que los injertos elaborados con soportes multidireccionales mejoran el cierre de heridas de piel de espesor total en comparación al cierre de heridas injertadas con tejidos unidireccionales o dejadas cerrar por segunda intención.

1 INTRODUCCIÓN

En el país la cultura de donación de órganos y tejidos es escasa; debido a esto, la disponibilidad de tejidos homólogos disponibles para injerto es limitada. Una fuente alternativa de material para injerto son los sustitutos artificiales de tejidos, constituidos por soportes tridimensionales solos o sembrados con células homólogas o autólogas. El primer producto de esta naturaleza fue diseñado para sustituir a la piel en el tratamiento de pacientes quemados. Hoy en día, existen sustitutos que reemplazan a la dermis y sustitutos completos que reemplazan dermis y epidermis, aprobados por agencias regulatorias como “Food and Drug Administration” (FDA) y “European Medicines Agency” (EMA). Estos además de usarse en pacientes quemados, se utilizan en el tratamiento de úlceras de diferente etiología y otras lesiones de la piel. En Colombia se consiguen matrices o soportes acelulares producidos por compañías multinacionales o nacionales, que sustituyen la dermis. Desafortunadamente, no hay acceso a los sustitutos de piel que contienen células; los cuales pueden ser el mejor reemplazo del autoinjerto, en lesiones extensas. Por eso, es importante desarrollar en el país la tecnología necesaria para producirlos a partir de células de los mismos pacientes y soportes de biomateriales, como el colágeno I. La manufactura local de estos productos debe hacerse de acuerdo con la normatividad vigente en el país y en el mundo, que demanda la completa caracterización de sus propiedades biológicas, fisicoquímicas y estructurales.

El Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos (GTIT) ha desarrollado sustitutos de tejido conectivo de mucosa oral y ha evaluado su desempeño como injerto en un modelo lagomorfo de herida mucosa de espesor parcial ^{1,2}. Los resultados sugieren que los factores secretados por el tejido artificial en el momento en que se implanta, son cruciales en la modulación de eventos asociados con la cicatrización. También, ha elaborado tejido conectivo con soportes laminares con fibras orientadas multi- y unidireccionalmente sembrando fibroblastos de mucosa oral. La cuantificación de

factores solubles secretados por los tejidos multi y unidireccionales en el momento en que se injertan, indica que hay diferencias significativas en las concentraciones de los factores proteicos que cada uno secreta ³. Al injertar tejidos multi- y unidireccionales en heridas de espesor parcial de mucosa oral causadas en los conejos fuente de las células, la cicatrización de los animales tratados con los tejidos multidireccionales fue mejor que la observada en los tratados con tejido unidireccional ⁴. A pesar de que el cierre de heridas de mucosa oral y piel exhibe etapas similares, éstas últimas cicatrizan con mayor contractura. Por eso, el modelo de herida de piel puede ser de mayor utilidad en el estudio del efecto en la cicatrización de la orientación de las fibras de los soportes con que se elabora el tejido artificial autólogo.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado modelos animales de heridas de piel de espesor total para estudiar el desempeño de soportes de colágeno tipo I que contienen micropartículas de colágeno I y gelatina (SCGC), asociados o no con extractos vegetales de *Calendula officinalis* y *Aloe vera*. En un modelo lagomorfo, se observó mejor cicatrización en los animales injertados con soportes sin extracto de *C. officinalis* que en los animales que recibieron los soportes con extracto ⁵. El mismo fenómeno fue visto en *Cavia porcellus*, al comparar la cicatrización de heridas injertadas con soportes con y sin extracto de *Aloe vera* ⁶. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios preclínicos para evaluar la eficacia y seguridad de soportes de colágeno I con fibras multi- y unidireccionales, sembrados con fibroblastos autólogos aislados de piel del mismo animal.

El objetivo de esta tesis doctoral fue comparar el cierre de heridas de espesor total en piel injertadas con tejido artificial autólogo elaborado con soportes de colágeno I con fibras multi- o unidireccionales. En la comparación se tuvieron en cuenta las evaluaciones clínicas, los análisis histológicos e histomorfométricos y la concentración de algunos factores mediadores de la cicatrización presentes en los exudados de las heridas injertadas con estos tejidos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 La Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y funciona como una barrera que separa el interior del organismo del ambiente, protegiéndolo de daños por acción mecánica, radiación ultravioleta, sustancias químicas y presencia de microorganismos. La piel también evita la pérdida de fluidos, ayuda a regular la temperatura, actúa como órgano sensor y es un componente importante de la respuesta inmune innata ⁷⁻⁹.

Histológicamente, en la piel de los mamíferos se pueden diferenciar dos capas; la epidermis y la dermis. La epidermis está constituida por un epitelio estratificado avascular compuesto principalmente por queratinocitos, producto de la división asimétrica de las células madre localizadas en el estrato basal del epitelio. Los queratinocitos resultantes de ésta división, se diferencian y migran hacia el exterior empujados por las nuevas poblaciones de queratinocitos que se forman permanentemente ¹⁰⁻¹². Además, en el estrato basal también se encuentran melanocitos y células de merkel. Los primeros contienen melanina, el pigmento responsable del color de la piel; los segundos, conectan el epitelio con las terminales nerviosas, posibilitando la actividad sensora de la piel ^{13,14}.

La dermis que subyace a la epidermis, es un tejido conectivo de origen mesodérmico compuesto principalmente fibroblastos y una matriz extracelular conformada por fibras de colágeno tipo I, glicosaminoglicanos y elastina. Actúa como soporte de la epidermis y le confiere a la piel su elasticidad y resistencia. Los fibroblastos se encargan de secretar los componentes de la matriz extracelular y a las enzimas encargadas de su recambio y remodelación ^{9,10}. En la dermis también se encuentran células endoteliales y del sistema inmune; las cuales, participan en

la vascularización durante la reparación del tejido y en la respuesta inmune primaria cuando se presentan lesiones ⁹

2.1.1 Lesiones de la piel

Como resultado de injurias mecánicas, térmicas, químicas y diversas patologías, se producen lesiones cutáneas que conducen a que la piel pierda su estructura, continuidad y capacidad funcional ^{15,16}. Las pérdidas de continuidad resultantes, se clasifican dependiendo de su profundidad en heridas de espesor parcial o de espesor total.

2.1.1.1 Heridas de espesor parcial

Pueden ser superficiales o profundas. El primer caso ocurre cuando la piel pierde solamente el epitelio sin que haya compromiso de la lámina basal y de las estructuras especializadas, como folículos y glándulas sebáceas, que contiene. Estas heridas cierran por reepitelización mediante la migración de células desde la lámina basal y los bordes; alcanzándose la restauración anatómica, fisiológica y funcional completa de la piel en el sitio comprometido ^{7,15}. El reemplazo del tejido perdido por uno con las mismas características morfológicas y funcionales, se denomina regeneración ^{17,18}. Las heridas profundas, se caracterizan por la pérdida de la parte superficial de la dermis además del epitelio. Estas pueden regenerarse debido a la migración de queratinocitos del borde de la herida y desde los folículos y glándulas sudoríparas de la dermis restante. Sin embargo cuando la cantidad de tejido perdido supera un tamaño crítico, que depende de la especie, se presenta cicatrización ⁷.

2.1.1.2 Heridas de espesor total

En este caso, además de perder el epitelio se destruye totalmente la dermis y el tejido graso subyacente. Su cierre conduce a la formación de cicatriz con hiperplasia y en heridas de espesor total con un tamaño mayor a 1cm de diámetro, es necesario colocar un injerto para disminuir la formación extensa de cicatriz con contractura ^{7,16}.

2.1.2 Cierre de Heridas de la Piel

El cierre de las heridas de piel es un proceso que se lleva a cabo en etapas, en el que intervienen diferentes respuestas que son activadas en el momento en que se produce el daño. Como se mencionó, solamente resulta en regeneración tisular cuando hay daño del epitelio, o, cuando habiendo pérdida de la parte superficial de la dermis y del epitelio la herida es de un tamaño menor al crítico. Cuando hay pérdida de epitelio y dermis y las heridas son de un tamaño mayor al crítico, ocurre reparación. En éste caso, el tejido perdido es reemplazado por tejido cicatrizal ^{15,16,18,19}. Las etapas del proceso de cierre de una pérdida de continuidad de la piel, son:

2.1.2.1 In inflamación

Inmediatamente después de que se produce una herida, se forma un coágulo de fibrina que actúa como hemostático y sirve como matriz extracelular (MEC) provisional para la migración de las células del lecho de la herida, su proliferación y diferenciación. Las plaquetas incluidas en el coágulo liberan factores que intervienen en la modulación de la respuesta al daño. Entre ellos el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que activa macrófagos y fibroblastos ²⁰; el factor de crecimiento transformante beta (TGF-B), promotor de la diferenciación de monocitos a macrófagos durante la inflamación y durante la formación del tejido

de granulación; y el factor de crecimiento epidermal (EGF), que promueve el inicio de la fase de proliferación, ayuda a formar el tejido de granulación y es indispensable para el crecimiento de los queratinocitos durante la reepitelización ²¹. Si en la lesión no se produce hemorragia, las plaquetas no son indispensables ya que cuando se rompe el epitelio, los queratinocitos liberan interleuquina 1 (IL-1) la cual actúa como señal que inicia la fase inflamatoria ^{20,21}; así como, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Aunque el TNF- α fue llamado así por su capacidad de producir necrosis en sarcoma de tejidos blandos ²², es secretado por células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos dañados. Estas señales junto con las de otros factores proinflamatorios, atraen y activan células del sistema inmune al área de la herida iniciando la etapa inflamatoria ^{23,24}. Las citoquinas IL-1, TNF- α y el factor derivado de las plaquetas (PDGF), reclutan neutrófilos, que limpian la herida de bacterias, residuos de células muertas y matriz extracelular dañada. Paralelo a esto, los monocitos reclutados al sitio se diferencian a macrófagos con la ayuda del TGF-B; los cuales, además de aportar al proceso de fagocitosis y a la limpieza de la herida, producen y secretan más mediadores proinflamatorios (IL-1 y IL-6 y TNF- α), y factores de crecimiento como EGF, TGF- β , PDGF, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y proteínas de la familia del FGF. Las citoquinas y factores de crecimiento secretados por los macrófagos, activan y reclutan fibroblastos y células endoteliales, promoviendo la formación del tejido de granulación. Por eso, los macrófagos juegan un papel esencial en la transición de la fase inflamatoria a la fase de reparación ^{19,21,24,25}.

2.1.2.2 Fase de proliferación

Esta fase se caracteriza por la migración de fibroblastos desde el lecho de la herida hasta la matriz provisional proporcionada por el coágulo de fibrina; los que después de adherirse y proliferar, secretan proteinasas que degradan la matriz de fibrina y proteínas con las que sintetizan nueva matriz extracelular (MEC). Durante la fase proliferativa de los fibroblastos, se observa la formación de abundante tejido de granulación. El TNF- α además de ser proinflamatorio, estimula la proliferación de

fibroblastos y tiene un efecto quimioatrayente de células endoteliales, de ahí la importancia de su participación en la formación del tejido de granulación ^{24,26}. Sin embargo, la presencia sostenida en las heridas de altas concentraciones de ésta y otras citoquinas que promueven la inflamación, se ha relacionado con patologías como úlceras crónicas ²¹. Por esto, la regulación de la respuesta inmune por citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 4 (IL4), es importante en ésta fase. La IL-4 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, ya que inhibe la secreción de factores e interleuquinas proinflamatorias (TNF- α IL-1, y IL-6). Además, activa la secreción de colágeno, de otras proteínas de la matriz extracelular, disminuye la producción de metaloproteinasas e incentiva la diferenciación celular ^{24,26,27}.

El TGF- β juega un papel importante durante la proliferación, ya que induce la síntesis de componentes de la MEC como colágeno, proteoglicanos y fibronectina [10]. Señaliza, junto con el PDGF, el cambio de fenotipo de los fibroblastos a miofibroblastos, quienes se alinean en los bordes de la herida y generan las fuerzas contráctiles que facilitan su cierre y la formación del tejido cicatrizal ^{20,21,28}. Durante esta etapa, la reepitelización es estimulada por la presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF) liberado por las plaquetas y los queratinocitos; así como, por el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF o FGF-2) y el TGF- α , producidos por los macrófagos activados en la herida. Estos factores estimulan la migración y proliferación de las células epiteliales del borde de la herida, promoviendo la disolución de las interacciones célula- célula y célula matriz, para facilitar la polarización y migración epitelial. Al final, cuando se llega a la reepitelización total, los queratinocitos se diferencian y se estratifican para restaurar la barrera ^{20,21,28}. Otro factor importante durante la fase de proliferación, es el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF I). Producido por varias células de la piel, entre ellas los fibroblastos, promueve la proliferación celular y junto con el EGF, estimula la migración de queratinocitos durante la reepitelización. La secreción de este factor en heridas crónicas de pacientes diabéticos se ve disminuida y su aplicación exógena aumenta la velocidad de curación de las heridas en ratones

diabéticos; sin embargo, su sobreexpresión está relacionada con la producción de cicatriz hipertrófica ^{24,29}.

Durante la proliferación ocurre la neovascularización, que permite suplir con nutrientes y oxígeno el sitio en reparación y es esencial para el remodelamiento de la MEC. Es iniciada por factores ambientales como pH bajo, aumento de lactato y reducción en la tensión de oxígeno; además es estimulada por VEGF, bFGF FGF-2 y TGF- β . ¹⁹⁻²¹ La familia VEGF incluye cinco isoformas (A,B,C,D,E), que resultan del "splicing" alternativo del RNA mensajero que los codifica; estos 5 péptidos contiene 121, 145, 165, 189, y 206 amino ácidos, respectivamente ³⁰. Participan en el cierre de heridas atrayendo células endoteliales y estimulando su proliferación durante la formación y maduración del tejido de granulación, promoviendo la angiogénesis de forma paracrina ^{19,21,30}. Las isoformas del VEGF reconocen tres receptores tirosina quinasa transmembranales: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. El factor de esta familia que tiene la mayor participación en la regulación de la angiogénesis y vasculogénesis es VEGF-A ²⁴; actúa sobre los receptores VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR); la señalización mediada Flt-1 es clave en la organización de los vasos sanguíneos, mientras que la señalización vía KDR induce la diferenciación de las células endoteliales y promueve su quimiotaxis *in-vitro* ³⁰. Cuando se cierra una herida de piel, el VEGF-A es una de las primeras moléculas en señalizar, debido a que es secretado por las plaquetas activadas que forman el coágulo y por los macrófagos que son atraídos por las señales inflamatorias producidas por la ocurrencia de la herida; además, su expresión en queratinocitos y fibroblastos es aumentada por la hipoxia generada por la pérdida de la red vascular y por factores como TNF- α ²⁶.

Las angiopoyetinas son un grupo de factores de crecimiento que al igual que los VEGF's señalizan a las células endoteliales. Se han descrito cuatro angiopoyetinas, las cuales actúan sobre receptores tirosina quinasa transmembranales (TIE-2), que se encuentran exclusivamente en células del endotelio vascular ^{31,32}. Esta familia de factores interviene en la maduración, estabilización y remodelación de los vasos

sanguíneos actuando de manera coordinada y complementaria con los VEGF's ^{24,33}. De las cuatro angiopoyetinas, Ang-1 y Ang-4 son agonistas del receptor Tie-2 mientras que Ang-2 y Ang-3 son antagonistas del mismo; de ahí, que mientras la Ang-1 ayuda a la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos la Ang-2 desestabiliza los vasos participando en su remodelación ^{24,33,34}.

La existencia de citoquinas que tienen un efecto angiostático, es decir que inhiben la proliferación de células endoteliales, también ha sido reportada. Entre ellas se encuentra la endostatina, producida por el clivaje del colágeno tipo VIII en su extremo carboxi-terminal. Aunque actúa como anti-angiogénico en tumores porque inhibe la formación de vasos sanguíneos y deteriora su maduración, su aplicación en heridas de espesor total en piel de ratón, no retrasa su cierre y disminuye la densidad de las fibras de colágeno mejorando las características de la cicatriz formada ³⁵.

2.1.2.3 Fase de remodelamiento

Esta es la fase final de la reparación, empieza en la segunda o tercera semana después de ocurrida la herida; puede durar entre 1 a 2 años y en algunos casos más tiempo. Durante el remodelamiento se presenta un equilibrio entre la degradación y la síntesis de los componentes de la MEC; en este proceso aumenta la producción de colágeno tipo I, que reemplaza al colágeno tipo III presente en mayor cantidad en el tejido de granulación formado durante la fase de proliferación ¹⁹. También, aumenta la actividad de los inhibidores de las metaloproteinasas del tejido (TIMPs) para permitir la deposición de matriz extracelular. Aunque al principio las fibras de colágeno se depositan de forma desordenada, a medida que ocurre el remodelamiento del tejido las fibras del nuevo colágeno se orientan y entrecruzan más, lo que hace que aumente la contracción de la herida iniciada durante la fase proliferativa. Aunque en la fase de remodelación intervienen una gran cantidad de mediadores, PDGF, TGF- β , y bFGF son considerados los más importantes ^{19,21,36}.

2.2 Tratamiento de las Lesiones de Piel

Las lesiones de piel que no regeneran espontáneamente, son tratadas tradicionalmente con injertos. El tratamiento más seguro y efectivo es el autoinjerto; sin embargo cuando las heridas son extensas, el tejido para tomar como injerto no es suficiente y se produce morbilidad en el sitio donante (Langer & Vacanti, 1993; Lazic & Falanga, 2011). La obtención de injertos de donantes humanos (homoinjertos) o de individuos de otras especies (xenoinjertos), son las opciones alternativas al autoinjerto. Sin embargo, están limitados por el riesgo de rechazo inmunológico y contagio con agentes infecciosos no detectadas en el momento de colectar el tejido ³⁷.

Para resolver las limitaciones de los injertos convencionales, se han desarrollado sustitutos celulares o acelulares de la piel. De hecho, el primer sustitutivo artificial de un tejido humano, denominado Integra®³⁸, fue una matriz tridimensional de colágeno I y glicosaminoglicanos que funge como dermis, recubierta por una capa de silicona que reemplaza a la epidermis, la cual es removida después de que la dermis artificial ha sido degradada y recambiada por nuevo tejido por las células del mismo paciente. Después, han sido aprobados otros sustitutos que reemplazan epidermis, dermis sola o dermis y epidermis ³⁸⁻⁴¹, los cuales se utilizan para favorecer la regeneración tisular y evitar la cicatrización con contractura ⁴². Junto con las terapias celulares, hacen parte del grupo de terapias avanzadas dirigidas a estimular el poder regenerador de tejidos que como la dermis, no regeneran después de que en útero ha ocurrido la organogénesis ⁴³. El material para injerto elaborado artificialmente, es considerado producto de la ingeniería de tejidos, campo multidisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida, para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de tejidos u órganos dañados o perdidos ^{37,42}.

Los productos de ingeniería de tejidos se elaboran con matrices o soportes, células y moléculas de señalización con actividad auto, yuxta y paracrina; que se utilizan

separados o en diferentes combinaciones ³⁷. Cuando se injertan soportes en heridas de piel, reemplazan a la dermis confiriendo la tridimensionalidad característica de ésta; pueden contener o no células y estar o no cubiertos por sustitutos del epitelio ^{40,41}. Comúnmente se fabrican con materiales naturales, sintéticos y de tejidos descelularizados como dermis o submucosa intestinal, provenientes de donante cadavérico humano o de otras especies animales ^{10,16,41,44}.

Las células pueden ser colocadas directamente en suspensión o como láminas confluentes, pero debido a que este tipo de tratamientos presentan limitaciones como baja integración en la herida, alta friabilidad y resultados clínicos poco alentadores ^{45,46}, se prefiere sembrarlas y cultivarlas en soportes ⁴¹. Las más empleadas son queratinocitos, fibroblastos y células madre de diferente origen; pueden ser autólogas u homólogas, la fuente más usada de éstas últimas es la piel de prepucio de neonato ^{41,47}. Las moléculas de señalización más comunes son los factores de crecimiento y citoquinas que naturalmente intervienen en el cierre de heridas ^{2,16,24}; se usan solas, en cocteles o como parte del secretoma presente en los medios provenientes de cultivos celulares ^{48,49}. Aunque se pueden colocar directamente en el sitio de la lesión, se llevan a cabo investigaciones y estudios clínicos en diferentes fases orientadas a asociarlos a soportes que sirven como sistemas de liberación controlada ^{50,51}. Las estrategias a seguir para la elaboración de un sustituto de piel, su complejidad y modo de aplicación dependen de las características de la herida que se quiere tratar.

Los materiales naturales o sintéticos empleados en la producción de soportes se denominan biomateriales porque son bioactivos, es decir inducen respuestas biológicas en el sitio donde son injertados. Deben ser biocompatibles para que permitan la migración, proliferación y diferenciación de las células; también, biodegradables para que los soportes producidos con ellos, puedan ser recambiados por el organismo y sustituidos por tejido sintetizado de *novo* ⁵²⁻⁵⁴. Cualquiera que sea la composición química o procedencia de los biomateriales con que se elaboran, las propiedades microestructurales y mecánicas que posean los

soportes determinan su bioactividad ^{55,56}. La microestructura proporciona a las células del lecho de la herida muchas de las señales que necesitan durante el proceso de sustituir el tejido perdido para migrar, adherirse, proliferar y diferenciarse ⁵⁷. Las características microestructurales de los soportes más importantes y más estudiadas son la porosidad, el tamaño de los poros, la interconectividad y la orientación de las fibras y los poros. Estas influyen en el comportamiento de las células que crecen en los soportes, lo cual se evidencia en cambios morfológicos y de los perfiles de factores proteicos y polisacáridos secretados por éstas ^{3,52,55,58}.

2.3 Productos de Ingeniería de Tejidos que Sustituyen Piel

En el mercado se encuentran diferentes productos que sustituyen a la epidermis. Después de que se reportó el cultivo *in vitro* de colonias de queratinocitos humanos ⁵⁹, se pudo lograr el crecimiento de queratinocitos en láminas de epitelio estratificado que fueron empleadas como injertos de piel ⁶⁰. Fueron las primeras terapias celulares aplicadas en pacientes quemados ^{61,62}. Actualmente, las láminas de queratinocitos autólogas son usadas para tratar la pérdida grande de la epidermis o en combinación con soportes para el tratamiento de heridas profundas. Ejemplo de un sustituto epitelial comercial es Epicel®, autoinjerto epidérmico que se obtiene cultivando queratinocitos del paciente sobre una cama alimentadora de fibroblastos de ratón para promover su crecimiento y estratificación. Fue el primero de este tipo aprobado por la FDA, como dispositivo para uso humanitario en el tratamiento de quemaduras. Sin embargo, debido a que las láminas de queratinocitos son obtenidas en un cocultivo con fibroblastos 3T3 de origen murino, fue aprobado como xenoinjerto ^{40,41,63}.

Hoy en día, hay sistemas que permiten la aplicación directa de queratinocitos autólogos en la zona afectada con el fin de promover su epitelización. CellSpray®, el primer producto de estas características en contar con aprobación de agencias

regulatorias, está indicado en el tratamiento de lesiones epiteliales y de espesor parcial. Para que su aplicación sea exitosa en heridas de espesor total, debe hacerse primero un injerto de piel o de sustitutos dérmicos que ayuden a restituir la dermis perdida. Para obtener los queratinocitos se coloca una biopsia de espesor parcial de piel del paciente en un dispositivo denominado ReCell®, en el que se lleva a cabo la disgregación enzimática de las células. El resultado de la digestión enzimática es una suspensión celular enriquecida con queratinocitos y melanocitos, la cual es esparcida en la zona que se quiere tratar ^{45,64,65}.

El desarrollo de sustitutos dérmicos ocurrió después de la aparición de los autoinjertos epidermales. Fue motivado por la fragilidad de las láminas de queratinocitos cultivados, la variabilidad observada en los resultados de su aplicación clínica, y el papel crucial de la dermis en la formación del epitelio ^{41,45}. Como se mencionó, Integra® fue el primer producto en ser aprobado por una agencia regulatoria como reemplazo dérmico. Su elaboración, producción industrial y aprobación se basó en el conocimiento proveniente de los estudios seminales realizados por I.V Yannas y J.F. Burke ^{38,66}. Autorizado inicialmente por la FDA como injerto en pacientes quemados y en cirugías reconstructivas de cicatrices con contractura, actualmente también está indicado para el tratamiento de úlceras diabéticas ⁶⁷. En Colombia se puede conseguir a precio muy alto, lo cual limita el acceso de la mayoría de la población a su aplicación.

Además de los soportes artificiales se emplea la dermis descelularizada, proveniente principalmente de donante cadavérico o ganado porcino, como sustituto dérmico. Alloderm® desarrollada por la compañía LifeCell, Inc., es dermis cadavérica descelularizada indicada como injerto en heridas de espesor total de diferente etiología y en cirugía reconstructiva ^{41,68}. Aunque es un sustituto alogénico, no es inmunógeno debido a que el proceso descelularización elimina los componentes antigénicos y el potencial de transmitir enfermedades infecciosas ^{10,39,41}.

La mayoría de los sustitutos dérmicos aprobados para uso humano son soportes acelulares; sin embargo, algunos contienen células vivas cultivadas *in vitro*. Este es el caso de Dermagraft® producido por Advanced Biohealing Inc, cultivando fibroblastos de piel de prepucio de neonato en un malla de poliglactina. Durante el tiempo de incubación, el polímero del soporte se va degradando por hidrolisis mientras las células van produciendo componentes de la matriz extracelular (fibronectina, tenascina, colágenos, glicosaminoglicanos), factores de crecimiento y citoquinas. Este producto está indicado en el tratamiento de heridas crónicas (diabéticas y vasculares) de espesor total, donde ha demostrado su eficacia ⁶⁹. Aunque este sustituto es relativamente seguro y los pacientes aparentemente no rechazan los fibroblastos homólogos, presenta los mismos riesgos y problemas de los homoinjertos. De hecho existen reportes de ocurrencia de infecciones, celulitis y osteomielitis durante su utilización, sin embargo, se han hecho los mismos hallazgos con otros productos; por lo cual no pueden ser atribuidos exclusivamente al uso de Dermagraft® ^{39-41,69}. Hyalograft 3D es un sustituto dérmico elaborado con soportes de ácido hialurónico donde se siembran y cultivan fibroblastos autólogos. Combinado con sustitutos epidérmicos como Laserskin®, ha mostrado eficacia en el tratamiento de úlceras crónicas en la planta del pie, además se ha reportado su uso eficaz en úlceras cutáneas severas por esclerodermia ^{41,70}. La combinación de éste producto con queratinocitos autólogos usado en heridas de espesor total por quemaduras, ha mostrado aumento en la migración de queratinocitos y una menor formación de contractura e hipertrofia en la piel formada comparado con el uso de láminas epiteliales solas; además promueve la rápida formación de la lámina basal ⁷¹.

En el mercado también se encuentran sustitutos vivos de piel constituidos por dermis y epitelio estratificado. Apligraf®, desarrollado y distribuido por Organogenesis Inc., fue el primer producto con estas características en ser aprobado para el tratamiento de úlceras venosas y de pie diabético que no responden a los tratamientos convencionales ⁷²⁻⁷⁴. En su manufactura se utilizan soportes de colágeno bovino tipo I, fibroblastos y queratinocitos homólogos aislados

de prepucio de neonato humano. Inicialmente, los fibroblastos son sembrados en los soportes de colágeno I y cultivados para permitir la formación de dermis artificial viva; luego, se siembran los queratinocitos en la cara superficial de la dermis y se incuban, con el fin de que formen epitelio estratificado. Apligraf® no produce rechazo inmune y las células sobreviven hasta dos meses después de que el producto ha sido injertado ^{41,73}. Orcel®, es otro producto elaborado con fibroblastos y queratinocitos de prepucio de neonato sembrados en un soporte de colágeno tipo I. Está indicado en el tratamiento de epidermólisis bullosa y sitios donantes de autoinjertos ⁷⁵.

A pesar de que la mayoría de los sustitutos de piel vivos que contienen dermis y epitelio contienen células alogénicas, también se han hecho sustitutos con células autólogas, lo que elimina los problemas subyacentes al uso de material exógeno ⁴¹. Estos tejidos artificiales autólogos son costosos, porque se hacen para suplir las necesidades de un solo paciente. Como las células deben aislarse de una biopsia de piel del paciente, el tiempo empleado para su manufactura es mayor que el requerido cuando se utilizan células homólogas criopreservadas en bancos celulares. Por eso, es imposible usarlos en el tratamiento urgente de lesiones ^{40,41}. La **Tabla 1** incluye productos de ingeniería de tejidos y terapias celulares empleadas en el tratamiento de lesiones de piel aprobados por la FDA; se muestra la compañía que los produce, sus componentes y uso aprobado.

Tabla 1. Productos de Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares Empleados en el Tratamiento de Lesiones de Piel

ustituto	Producto	Compañía Productora	Componentes	Uso Aprobado FDA
Epidérmico y terapia celular	Epicel®	Genzyme	Lámina de queratinocitos autólogos	Cobertura permanente de quemaduras ^{76,63} .
	EpiDex®	Euroderm	Lámina estratificada de queratinocitos provenientes de folículos pilosos	Tratamiento de heridas crónicas y áreas de piel despigmentadas ⁷⁷ .
	Epibase™	Laboratoires Genevrier	Lámina de queratinocitos autólogos	Tratamiento de úlceras crónicas ⁷⁸ .
	CellSpray®		Suspensión de queratinocitos autólogos	Tratamiento de heridas por quemaduras superficiales y de espesor parcial. ^{79,80}
Dermo-epidérmico	Apligraf®	Organogenesis	Soporte de colágeno tipo I de origen bobino, sembrado con fibroblastos y queratinocitos de neonato	Tratamiento para úlceras crónicas diabéticas, venosas y neuropáticas de espesor total ⁷² .
	OrCel®	Fortificell Bioscience	Soporte de colágeno tipo I de origen bovino, sembrado con fibroblastos	Tratamiento de sitios donantes de espesor parcial en pacientes con quemaduras ⁷⁵ .
Dérmico	TransCyte®	Fibroblastos de piel de neonato sembrados un soporte de	Fibroblastos criopreservados de prepucio de neonato sembrados en una malla de nailon- colágeno porcino, cubierta con silicona.	Cobertura temporal de heridas de espesor total y parcial de pacientes quemados para preparar las heridas antes de colocar un autoinjerto ⁸¹ .
	Dermagraft®	Organogenesis	Fibroblastos de neonato sembrados incubados y criopreservados en un soporte de poliglactina	Tratamiento de úlceras por pie diabético ⁶⁹ .
	Integra®	Integra Life Sciences Corporation	Soporte de colágeno tipo I de origen bovino, condroitin-sulfato, cubierto por una lámina de silicona.	Tratamiento de quemaduras y reconstrucción de zonas con cicatriz por quemaduras ⁶⁷ .
	AlloDerm®	Life Cell	Dermis de donante cadavérico descelularizada con membrana basal completa.	Preparación de la cama de heridas para ser injertadas ⁶⁸ .
	Permacol™	Tissue Science Laboratoire	Dermis porcina descelularizada.	Como refuerzo de tejidos blandos en procedimientos quirúrgicos ⁸² .
	OASIS®	Cook Biotech	Submucosa intestinal	Tratamiento de Heridas

			porcina descelularizada.	de espesor parcial y total, úlceras de diferente etiología, heridas de sitio donante, laceraciones, quemaduras ⁸³ .
	Terudermis™	Teru corp	Soporte de colágeno tipo I, cubierto por una lámina de silicona.	Tratamiento de quemaduras, uso en sitios donantes de piel y reconstrucción de defectos de tejidos blandos ^{41,84} .
	Hyalograft 3D	Ácido hialurónico	Soporte de ácido hialurónicos	Tratamiento de úlceras en combinación de un sustituto dérmico ^{41,85} .

Se debe resaltar que de los productos de colágeno tipo I incluidos en la tabla anterior, en Colombia solo se pueden adquirir aquellos que no contienen células, a precios elevados. Por ejemplo, una lámina de 20 cm x 25 cm de Integra cuesta \$13.000.000.00 (comunicación personal de Francisco Cano, gerente de la compañía distribuidora Green Button SAS). Los productos que contienen células fabricados en el exterior no se pueden importar, por ser tejidos artificiales vivos; sin embargo, localmente se han desarrollado sustitutos de piel que contienen fibroblastos y queratinocitos autólogos como Keraderm.

2.4 Cuantificación de Muestras Biológicas Usando Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico que combina un componente biológico y un componente fisicoquímico. Los biosensores se clasifican dependiendo del detector que utilizan en ópticos, piezoeléctricos, enzimáticos, electroquímicos, entre otros ⁸⁶. En la Tabla 2 se muestra la clasificación de los biosensores de acuerdo con el tipo de detectores.

Tabla 2. Clasificación de los Biosensores de Acuerdo con el Fenómeno que Detectan

86

Biosensor	Detector
Electroquímicos	Amperométricos
	Potenciométricos
	Conductimétricos
	Impedimétricos
Mecanoacústicos	Piezoeléctrico
	Nanomecánico
Magnéticos	Efecto Hall
	Magneto-resistivos
	Magneto-impedancia
Ópticos	Bioproductos
	Campo evanescente

Cualquiera de los biosensores mencionados en la tabla anterior, pueden hacer detecciones directas o indirectas. Generalmente utilizan como receptor acoplado al biosensor una variedad amplia de moléculas, entre las que se pueden mencionar anticuerpos, ácidos nucleicos denaturados (aptámeros), enzimas, microorganismos, células, secciones de tejidos, polímeros de huella molecular, etc. Las reacciones catalíticas y de afinidad son las formas de interacción receptor- analito más empleadas ^{86,87}. En general estos sistemas permiten hacer el análisis de las sustancias de forma directa sin marcación molecular previa y sin tiempo de incubación, de forma altamente específica y sensible por lo que se necesita poca cantidad de muestra. Además, una vez los chip sensores han sido acoplados se pueden utilizar para analizar muchas muestras debido a que la matriz es regenerada tras cada análisis. Las características descritas hacen que los análisis con biosensores sean rápidos, económicos y versátiles; lo cual, confiere a las determinaciones basadas en biosensores ventajas sobre otras técnicas convencionales de análisis. En la **Tabla 3** se presenta una comparación entre las técnicas basadas en biosensores y las técnicas convencionales ⁸⁶⁻⁸⁸.

Tabla 3. Comparación de Técnicas de Cuantificación Convencionales y Basadas en Biosensores. ⁸⁶

Biosensores	Técnicas Convencionales
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Análisis rápido (en tiempo real) ➤ Fáciles de usar ➤ Técnicas baratas ➤ Portátiles, miniaturizables y automatizables ➤ En su mayoría monoanalito ➤ Marcador no necesario ➤ Muy reducido volumen de muestra ➤ Mínimo pre-tratamiento de muestra ➤ Sensibles, precisos y fiables 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Largos tiempos de análisis ➤ Manejo por parte de personal especializado ➤ Técnicas caras ➤ Técnicas de laboratorio ➤ Multianalito ➤ Necesidad de marcador ➤ Pequeño volumen de muestra ➤ Requiere pre-tratamiento de la muestra ➤ Sensibles, precisos y fiables

Uno de los biosensores de tipo óptico que más se usa, es el de plasmones de resonancia de superficie (SPR). Los SPR, permiten hacer detección específica de biomoléculas en su forma nativa sin necesidad de marcarlas. Con los SPR se pueden seguir en tiempo real y con alta sensibilidad, las interacciones y uniones no covalentes entre macromoléculas ⁸⁷, ya que pueden medir pequeños cambios en el índice de refracción (IR) que ocurren en la vecindad de un lámina delgada de un metal o chip, como repuesta a la progresiva acumulación de moléculas sobre su superficie; la cual, depende a su vez de las uniones por afinidad que ocurren entre estas ^{87,88}.

En los Biosensores SPR, el sistema sensor combina un componente fisicoquímico que detecta los cambios que ocurren en el índice de refracción cerca del chip, un componente electrónico que traduce la señal como unidades de resonancia (UR), y un componente bioquímico o biológico que actúa como sonda que captura los

analitos mediante interacciones específicas. Como componente biológico se utilizan diferentes tipos de proteínas o cadenas de ácidos nucleicos, lo que ha facilitado que esta herramienta se utilice en el estudio de interacciones entre una amplia variedad de biomoléculas. Estas interacciones están basadas en uniones por afinidad como las que se presentan entre un antígeno y un anticuerpo, un sustrato y una enzima o cadenas complementarias de DNA o RNA ⁸⁷.

La alta especificidad de las asociaciones que se dan entre las moléculas que actúan como ligando o analito, y la detección altamente sensible que se alcanza con los biosensores SPR, permite que éstos equipos midan la concentración de los analitos y su interacción en tiempo real con la sonda. De ahí que se hayan desarrollado metodologías SPR, para seguir la cinética de este tipo de reacciones ⁸⁹; así como, algunas metodologías para la detección de sustancias de interés biológico en muestras complejas ^{88,90}. En estos análisis, la diferencia entre las UR en el punto final de la reacción entre los biomoléculas y las sondas, y el punto inicial de ésta, es proporcional a la concentración del analito. De esta forma, la técnica permite estandarizar metodologías para cuantificar proteínas utilizando anticuerpos como ligando. Sin embargo, si el analito a detectar es un anticuerpo, es el antígeno el que se inmoviliza en el chip sensor como sonda específica ^{87,88,90}.

Trabajos publicados reportan el desarrollo de metodologías basadas en el uso de SPR, para la cuantificación factores de crecimiento en muestras complejas. De este modo, ha sido posible cuantificar IL1, IL6, TNF- α recombinantes reconstituidas en medio de cultivo esencial ⁹¹; IL6 presente en medios condicionados provenientes de cultivos de fibroblastos humanos ⁸⁸; interferón- α 2b expresado en *Escherichia coli* y presente en muestras de medio de cultivo de fermentaciones de ésta bacteria; IL8 de saliva humana; factores de crecimiento y citoquinas presentes en medios condicionados provenientes del cultivo de dermis artificial elaborada con fibroblastos de mucosa oral en soportes de colágeno unidireccionales y multidireccionales ^{3,92,93}. En todos estos trabajos básicamente se utilizan dos tipos de chip sensor, que se diferencian en los compuestos químicos con que se

modifican la superficie del metal: los chips de la serie CM, especialmente el CM5, y los chips con monocapas autoensambladas con carboxialcanotioles. Los CM5 son láminas de oro cuya superficie viene modificada con moléculas de carboximetil dextrano, que se usan para la inmovilización de varios tipos de ligandos y para diferentes propósitos ^{3,88,94}.

Uno de los problemas que se presentan con los chips CM5 es la inespecificidad en la cuantificación de muestras complejas (fluidos biológicos o medios provenientes de cultivos celulares), debido a la formación de uniones no específicas que causan la aparición de señales falsas que enmascaran a la señal resultado de la interacción del analito de interés ^{87,91}. Por esto, alternativamente se han usado chips sensores elaborados modificando la superficie de la lámina de oro, mediante la fijación covalente de monocapas autoensambladas (SAM). La monocapas autoensambladas se forman con moléculas orgánicas alquilo que tiene en uno de sus extremos (cola) un grupo tiol, mediante el cual se enlazan covalentemente a los átomos de oro de la lámina, y en el otro extremo (cabeza) un grupo carboxilo o hidroxilo, por donde se pueden inmovilizar proteínas a través de la sustitución nucleofílica del hidroxilo por las aminas primarias del ligando **Figura 1**. Resultados publicados muestran que el uso de monocapas disminuye la formación de uniones inespecíficas de las muestras mejorando la sensibilidad de la técnica ^{88,90,91,95}.

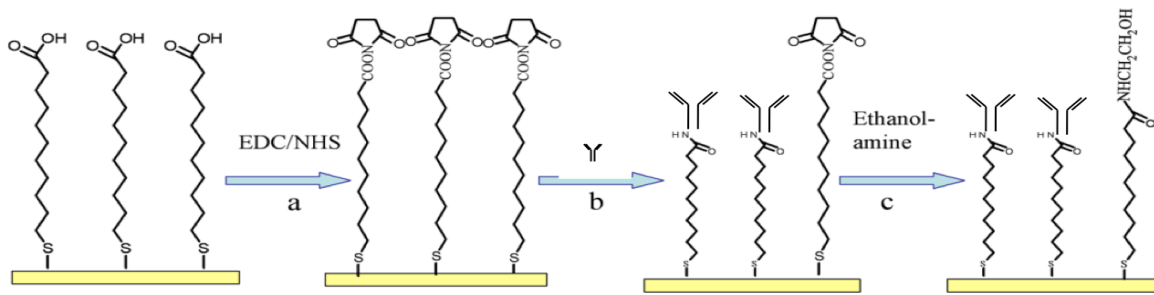


Figura 1. Esquema de la reacción de la inmovilización de los anticuerpos vía amino coupling. **a**, activación de los grupos carboxilos de las moléculas de MUA en las monocapas. **b**, inmovilización a través de ataque nucleofílico y formación de enlace amídico. **c**. Bloqueo de los grupos activos remanentes con etanolamina. Tomada y modificada de.⁹⁶

2.5 Modelos Animales Empleados en la Evaluación del Cierre de Heridas de Piel

El cierre de heridas cutáneas se ve afectado por un complejo ambiente extracelular, el cual es generado por la respuesta de diferentes tipos de células a señales autocrinas y paracrinas ⁹⁷. Aunque se han desarrollado ensayos in-vitro que permiten estudiar algunas variables que afectan el fenómeno, ninguna de estas estrategias de laboratorio logra replicar el efecto del complejo número de componentes y señales involucrados en la reparación de las heridas. por lo que es necesario emplear modelos in-vivo ^{98,99}.

De los animales utilizados como modelo para el estudio del cierre de heridas, el cerdo es quien tiene la piel más parecida a la de los humanos ⁹⁷. Sin embargo, se utilizan más mamíferos pequeños debido a que la mayoría de bioterios no tiene la infraestructura necesaria para albergar éste tipo de animales y su mantenimiento es costoso ^{97,99,100}. Los mamíferos pequeños más empleados son conejos (*Lagomorpha*), cobayos, ratón y rata (*Rodentia*) debido a disponibilidad, bajo costo y facilidad de manejo. ^{97,101} Sin embargo, la piel de los roedores y lagomorfos

presenta diferencias anatómicas y fisiológicas que hacen que el proceso de cierre de heridas cutáneas sea diferente a como ocurre en humanos ^{99,102}. En ratones, ratas, cobayos y conejos la epidermis se organiza parecido a los humanos; sin embargo, es mucho más delgada y la densidad capilar es mucho mayor. Por ejemplo, en conejos es de aproximadamente de 1800/cm² mientras que en el cuero cabelludo de los humanos, que es la zona de mayor densidad capilar, alcanza aproximadamente los 800/cm² ¹⁰³. Además, son animales de piel suelta ya que pueden deslizarla y contraerla sobre la fascia subcutánea (*Panniculus carnosu*). Ésta membrana subdérmica que separa la piel del musculo, es importante en el cierre de heridas en roedores y lagomorfos por ser altamente vascularizada y porque irriga constantemente el lecho de la herida; además, porque promueve una fuerte contracción que reduce el diámetro de las heridas a la mitad, en las primeras 24 horas ^{102,104}.

Para evitar la rápida y fuerte contracción que se produce en el cierre de heridas en los animales mencionados, se han empleado estrategias que utilizan anillos de diferentes materiales (splint) que se colocan alrededor de las heridas, sobre la piel o de forma subdérmica. En rata, el tipo de splint más utilizado es un anillo de silicona adherido y suturado sobre la piel rasurada del animal, con él se ha logrado retrasar la contracción de las lesiones ^{101,105}. En conejos el área del cuerpo más usada para el estudio de lesiones de piel son las orejas, debido a que el cartílago que la subyace actúa como splint; además, en esta área es fácil cortar la irrigación sanguínea para producir úlceras crónicas vasculares ^{99,105,106}. Las principales limitaciones de este modelo son que el proceso de cierre de la herida sucede sobre un cartílago avascular, que la piel es muy delgada comparada con la piel del dorso del animal ¹⁰⁵ y que el área disponible para hacer las heridas limita el tamaño de las mismas. Por esto, cuando se quieren evaluar heridas de mayor tamaño se usa el dorso de ratones, ratas y conejos ^{5,107,108}.

Nuestro grupo de investigación ha usado un modelo lagomorfo de herida de espesor total de 2 cm² de diámetro, para evaluar el efecto de injertar sustitutos dérmicos acelulares asociados a micropartículas de gelatina-colágeno. Sin embargo, todavía no ha empleado el modelo para evaluar el desempeño como injerto de los tejidos autólogos que produce. Por lo anterior, esta tesis doctoral propuso desarrollar tejido conjuntivo autólogo artificial empleando soportes con orientaciones de poro diferente (multi y unidireccional) y fibroblastos aislados de la piel de los animales incluidos en el estudio. Igualmente, comparar su desempeño como injerto en el modelo lagomorfo previamente establecido ⁵

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a las limitaciones de acceso a tejido artificial biocompatible disponible para injerto, es importante desarrollar localmente la tecnología de producción de tejido conjuntivo autólogo que sustituya a la dermis. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado y evaluado la seguridad y eficacia de tejido conectivo oral autólogo artificial ^{1,2}. También, ha demostrado que fibroblastos orales sembrados en soportes con diferente orientación de poro (multidireccional vs unidireccional) presentan un patrón de secreción (secretoma) diferente ³. En un modelo animal encontró que exudados provenientes de heridas de mucosa oral injertadas con tejido artificial elaborado con soportes con orientación de poro multidireccional contienen concentraciones de factores moduladores de la cicatrización significativamente diferentes a las determinadas en exudados de heridas injertadas con tejido artificial elaborado con soportes con orientación de poro unidireccional. Sin embargo, no ha estudiado la eficacia como sustitutos dermales de los soportes multi- y unidireccionales de colágeno I, sembrados con fibroblastos autólogos aislados de piel. Tampoco ha evaluado si al injertar tejido artificial que varía en la orientación de sus poros, se pueden observar diferencias cualitativas y cuantitativas en algunos de los factores presentes en exudados tomados de las heridas tratadas antes de que ocurra su cierre. Este trabajo fue diseñado con el fin de evaluar los dos fenómenos mencionados.

4 HIPÓTESIS

La cicatrización de heridas de espesor total de piel injertadas con tejido elaborado con fibroblastos autólogos de dermis y soportes de colágeno con orientaciones de fibra/poro diferentes (multidireccional vs unidireccional), es diferente.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si la reparación de heridas de piel de espesor total injertadas con tejido artificial multidireccional o unidireccional es diferente y establecer diferencias cuantificables entre algunos biomarcadores del proceso de cicatrización de las heridas injertadas con estos tejidos.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Desarrollar tejido conectivo artificial a partir de fibroblastos de dermis y soportes multidireccionales y unidireccionales de colágeno tipo I.

5.2.2 Evaluar clínicamente su desempeño como injerto en heridas de piel de espesor total creadas en los animales fuente de los fibroblastos.

5.2.3 Establecer una metodología basada en un biosensor óptico, para la cuantificación de factores solubles presentes en heridas cutáneas de espesor total durante su cicatrización.

5.2.4 Caracterizar factores proteicos presentes en los exudados de heridas de espesor total tratadas con tejido conectivo artificial uni- o multi-direccional en un modelo animal.

5.2.5 Evaluar histológica e histomorfométricamente el tejido cicatrizal formado en las heridas estudiadas.

6 METODOLOGÍA

6.1 Purificación de Colágeno Tipo I

Se tomó el material de inicio fascia bovina (FB) y se lavó con una serie de solventes de diferente polaridad para quitar la mayor cantidad de grasa e impurezas posible, luego se cortó en pequeñas fibras, se repitió el lavado y se dejó secar. El material seco se pesó y se sumergió en una solución de ácido acético 0,5M durante 24h a 48h. La suspensión obtenida se homogeneizó agregando más solución de ácido acético y utilizando una licuadora, luego se centrifugó (30 min a 4500 r.m.p.), se tomó el sobrenadante (colágeno disuelto) y se descartó el pellet (impurezas). La suspensión obtenida se neutralizó agregándole lentamente una solución de NaOH (1M) hasta alcanzar un pH ente 4,0-4.5, con el fin de precipitar las fibras de colágeno antes establemente suspendidas en la solución de ácido acético. Para separar el precipitado, lo obtenido en la neutralización, se centrifugó a 4500 rpm por 30 min. El pellet de colágeno se reprecipitó utilizando una solución de NaCl y se repitió la centrifugación a las condiciones anteriormente mencionadas. Para retirar la sal adicionada, el colágeno se lavó con agua tipo 1 hasta lograr una conductividad del sobrenandante por debajo de 0,5 ms.

6.2 Elaboración de Soportes Multidireccionales y Unidireccionales

Los soportes se hicieron siguiendo la metodología establecida por el grupo ^{109,110}. Brevemente, una suspensión de colágeno tipo I (5mg/mL) se sirvió en moldes de teflón y se congeló. Para obtener los soportes de colágeno tipo I multidireccionales, la suspensión se congeló de forma isotérmica. Para obtener los soportes unidireccionales, la suspensión de colágeno se congeló empleando un gradiente de

temperatura a lo largo del molde. El flujo térmico se logró adaptando uno de los lados del molde con el fin de que pudiera estar en contacto con nitrógeno líquido (Metodología en proceso de solicitar patente). Luego de congelar el colágeno, los soportes se liofilizaron durante 48 h y se entrecruzaron con una solución de glutaraldehído (0.02%) por 24 h. Para retirar los residuos, los soportes se lavaron con agua ultra purificada, se congelaron de nuevo y se liofilizaron (24 h); finalmente, se cortaron y esterilizaron con óxido de etileno.

6.3 Experimento Animal

6.3.1 Recepción de los animales de experimentación

Se recibieron 15 conejos Nueva Zelanda machos con pesos entre 2300 y 2800 g y se les hizo una revisión clínica general por parte de un médico veterinario. Inmediatamente después de la revisión general, se les aplicó una dosis de 0,4 mg/kg de ivermectina vía sub-dérmica que fue reforzada 15 días después de la primera dosis. Una vez los conejos se alojaron en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, se aislaron durante ocho días antes de cualquier intervención quirúrgica, para lograr su adaptación y hacerles profilaxis con el fin de prevenir enfermedades y evitar muertes por impactación, debido al estrés del nuevo ambiente o de las cirugías.

6.3.2 Aislamiento de fibroblastos autólogos de piel

Después del tiempo de adaptación, de cada conejo se tomó una biopsia de piel (1cm²) de la parte superior de la espalda siguiendo las especificaciones del protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias. Brevemente, los conejos fueron sedados mediante la aplicación de una mezcla de xilasina -

ketamina (5mg/Kg - 50mg/Kg), rasurados en la parte superior de la espalda y limpiados con yodo en espuma, alcohol 70% y yodo solución; después de la limpieza se aplicó ácido fusídico (2%) dejándolo actuar durante 10 minutos. En la zona preparada de la forma descrita, se tomó un 1cm² de piel completa, mediante escisión con un escalpelo numero15. La herida resultante se suturó y a los animales se les aplicó tramadol (2mg/Kg) como analgésico cada 24 h durante 2 días. Las biopsias se lavaron con antibiótico y antimicótico (4X) disueltos en PBS y se pasaron a dos tubos con medio de transporte (DMEM), el cual también contenía antibiótico antimicótico (4X). Luego se trasladaron a la cabina de flujo laminar, en donde se procesaron para obtener los explantes.

Luego de obtener fragmentos bien pequeños y limpios, se colocaron dentro de una caja de cultivo T-25 distanciados entre sí, se dejaron adherir, se cubrieron con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB (20%) teniendo cuidado de no desprenderlos. Durante la incubación, los explantes se mantuvieron con 8mL de DMEM suplementado, hasta obtener monocapas de fibroblastos 80% confluentes; el medio se cambió cada tres días. Para los subcultivos, las células se disgregaron mediante el uso de tripsina- EDTA (0,25% P/V -) en PBS, se lavaron, se contaron y se pasaron a nuevas cajas T-75.

6.3.3 Elaboración del tejido conectivo artificial (TCAA)

Sobre soportes (4 cm²) de colágeno tipo I, multidireccionales y unidireccionales, se sembraron los fibroblastos (5 X 10⁵ células/cm²) provenientes de los animales incluidos en el estudio. Los soportes con las células se incubaron (24h, 37°C, 5%CO₂) con medio DMEM suplementado (10%SFB) en cantidad suficiente para alimentar el constructo sin sumergirlo; después se agregó medio hasta cubrirlos. El medio se cambió cada dos días, durante una semana, al séptimo día los injertos se lavaron tres veces con PBS y el medio DMEM suplementado se cambió por medio

ADVANCE libre de SFB, suplementado con L-glutamina, antibióticos-antimicóticos. Después de incubar durante 3 días, se tomó el tejido artificial a injertar, se tomaron alícuotas del medio de cultivo para cuantificar los factores y las citoquinas secretadas por las células, se evaluó viabilidad con MTT y se fijaron muestras para ser analizadas histológicamente.

6.3.4 Experimentación quirúrgica

Para el estudio se usaron 15 conejos divididos en tres grupos. Los animales fueron sedados mediante la aplicación de una mezcla de Xilasina 5mg/Kg (Rompun®, Bayer) y Ketamina 50mg/Kg (Ketamina ® , Holliday). Luego de que entraron en plano anestésico, se les rasuró la espalda y se limpió la zona de la cirugía con yodo en espuma, alcohol 70%, yodo solución y finalmente se aplicó ácido fusídico al 2% dejándolo actuar durante 10 minutos. En cada animal se hicieron dos heridas (2cm x 2cm) contralaterales de espesor total, en la parte dorsal de la región escapular. Luego se colocaron los tratamientos de forma aleatoria. En dos de los grupos, una de las heridas fue tratada con tejido unidireccional o multidireccional y la otra herida se dejó sin tratamiento como control. El último grupo se injertó con tejido multidireccional en una de las heridas y con unidireccional en la otra. Después de fijar los injertos con puntos simples utilizando sutura reabsorbible I (Vicryl ® 5.0 Ethicon), se aislaron las heridas rodeándolas con un splint y se cubrieron con una lámina semipermeable de poliuretano (Tegaderm R), sobre esta se colocó un apósito estéril de gasa y se cubrió con esparadrapo **Figura 2**. Durante su recuperación, los animales fueron alojados individualmente y se les aplicó Tramadol a dosis de 3mg/Kg (Tramadol Genfar ®) por vía subcutánea cada 24 horas durante 3 días consecutivos. Profilácticamente, fueron inyectados subcutáneamente con Enrofloxacin (7mg/Kg; Baytril ® Bayer) cada 12 h durante 5 días.

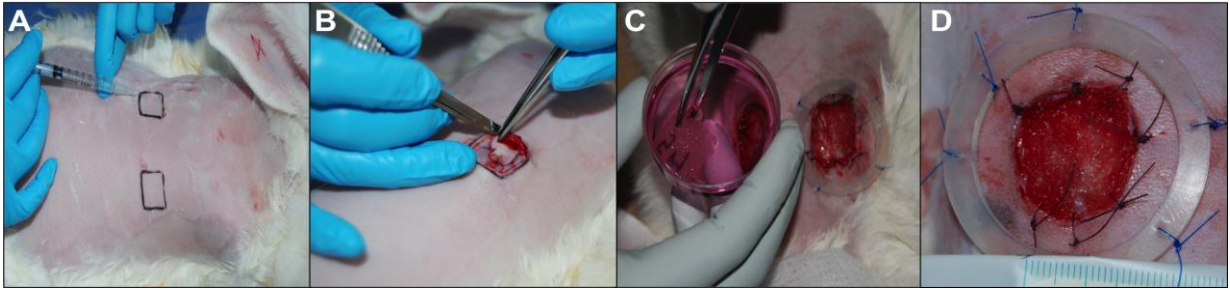


Figura 2. Procedimiento Quirúrgico. (A) Espalda rasurada comarcada con el fin de delimitar el lugar de la herida; (B) Escisión quirúrgica; (C) Aplicación del tratamiento; (D) Herida injertada y rodeada con splint.

Los conejos se observaron diariamente para verificar su estado de salud y revisar los vendajes. Las heridas se destaparon para su observación y seguimiento fotográfico los días 3, 6, 9, 20, 30 post-cirugía. En los días 3 y 6 se tomaron muestras de los exudados colocando cuadros de papel filtro (4cm²) directamente en las heridas **Figura 3**. Las muestras se colocaron en 2,5 mL de solución buffer de fosfatos (PBS) y se congelaron.

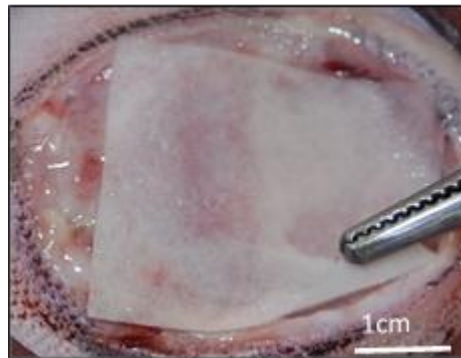


Figura 3. Toma de los exudados presentes en las heridas.

En el día 30 los animales se sacrificaron siguiendo procedimientos establecidos ¹ y se tomaron biopsias que comprendieron la zona de la herida y tejido sano adyacente. Las biopsias se embebieron en parafina y mediante un micrótopo se obtuvieron secciones de 4µm los cuales fueron teñidos con hematoxilina eosina.

6.4 Cuantificación de Factores en los Exudados de las Heridas

6.4.1.1 Reactivos y materiales

Las cuantificaciones de los factores solubles en los medios de cultivo y en las muestras de exudados fueron hechas a 25°C usando un BIAcore 2000 Pharmacia Instrument con chips de oro (Kit SIA-Au BIAcore, Uppsala, Sweden). GE Healthcare Life Sciences (Fairfield, CT, USA) proporcionó los reactivos para el acoplamiento amino: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxi-succinimida (NHS) y etanolamina HCl. La acetona usada fue comprada a Merck (Darmstadt, Germany). El ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) y el 6-mercapto-1-hexanol (MCH), a Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para la preparación de las monocapas se utilizó acetona (Merck, Darmstadt, Germany), etanol absoluto grado analítico (Merck, Darmstadt, Germany), ácido sulfúrico, peróxido de hidrógeno, ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) y 6-mercapto-1-hexanol (MCH), Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la inmovilización de los anticuerpos se usó: para la activación de las monocapas, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) GE Corporate. Como Buffer de flujo para el biosensor y para diluir las muestras: HBS-EB (4Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacini]- etanosulfónico (HEPES) 10mM, NaCl 150 mM; Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 3.4 mM Tween 20, 0.005% pH 7.4). Como solución de regeneración se utilizó Glicina 10mM pH 2,0. Los

anticuerpos usados fueron: anticuerpos monoclonales (anti-VEGF, anti-TNF- α) ratón/humano (Invitrogen Corporation, USA); anticuerpos monoclonales (anti-EGF, anti-TGF- β 1), anticuerpo policlonal (anti-Ang2) ratón/humano (Abcam, UK), anticuerpo policlonal (anti-endostatina humana), anticuerpo policlonal (anti-ang1) humano/ratón, anticuerpo monoclonal(anti- TGF- β 1) anti- TGF- β (2 y 3) humano /R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA).

6.4.1.2 Preparación de monocapas autoensambladas (SAM)

Los chips de oro se limpiaron sumergiéndolos por un minuto en acetona, luego se sumergieron durante un minuto en una solución piraña recién preparada (H_2SO_4 : H_2O_2) en una proporción volumétrica 3:1. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua ultrapurificada y finalmente se pasaron a etanol absoluto grado analítico por 5 minutos. Luego los chips se pusieron a reaccionar en la solución mezcla de los tioles (MUA 0,63 mM y MHC 1,88mM), o con una solución de (MUA 0,63 mM). Con la mezcla de MUA y MHC se probaron dos tiempos de reacción (8 y 24 horas) y con MUA se dejaron reaccionar por 24 horas. Los chips se lavaron con etanol absoluto, se secaron en cabina de flujo laminar y se guardaron a 4°C. Como control negativo de la formación de las monocapas, se utilizó un chip que se sometió al proceso de limpieza.

6.4.1.3 Inmovilización de los anticuerpos

Los extremos carboxilo e hidroxilo de los tioles fueron activados con una mezcla de NHS (0,1M) y EDC (0,4 M) en una relación volumétrica 1:1. Con la ayuda del BIACORE, la mezcla descrita se pasó por la superficie de los chips (flujo: 5 μ L/min) durante 7 min. Después de la activación de las monocapas, se corrieron de forma individual los anticuerpos (50 μ g/mL de anticuerpo en buffer HBS-EP), permitiendo su interacción con las monocapas activadas. Los grupos de la monocapas que no

reaccionaron uniéndose a los anticuerpos, fueron desactivados inyectando etanolamina (1M, pH 8,5 por 7 minutos).

6.4.1.4 Elaboración de las curvas de calibración

Como estándares se usaron las proteínas recombinantes EGF, IL-4, Angiopoyetina-2, Angiopoyetina-1, TNF- α , VEGF, FGF-2, IGF-1, TIE-2, VEGF-R2, Endostatina, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, VEGF-R1), diluidas serialmente en solución buffer HBS-EP (2500, 1500, 1000, 500, 250, 100, 20 ng/mL). Cada solución patrón fue inyectada a un flujo de 60 μ L/min por 5 min, por triplicado y la respuesta en UR para cada concentración fue registrada. Luego de cada medida la matriz fue tratada con solución de regeneración, para restaurar los sitios activos de los anticuerpos inmovilizados en las monocapas autoensambladas. Para graficar las curvas de calibración, se promediaron los triplicados de las respuestas en (UR) para cada concentración estándar y se calculó el error mediante la desviación estándar. Luego se graficó el promedio de las respuestas contra los valores de concentración de los estándares y se observó el error para detectar los valores de UR que estadísticamente fuesen iguales para sacar uno de ellos, el de mayor concentración, de las curvas finales. Esto se hizo debido a que los sitios activos de los anticuerpos inmovilizados se saturan a determinada concentración, después de este punto la respuesta en UR no aumenta y no se puede relacionar con concentraciones mayores de los patrones. Una vez se identificaron y retiraron los puntos por encima de las concentraciones de saturación, se graficó el logaritmo neperiano de la respuesta \ln (UR) contra el logaritmo neperiano de las concentraciones de los estándar \ln (ng/ml).

6.4.1.5 Cuantificación de los factores solubles en los exudados

Los papeles de filtro conteniendo las muestras de exudados de las heridas fueron descongelados, disgregados mecánicamente, colocados en 1mL de solución buffer PBS y centrifugados a 4500 r.p.m. (30 min) con el fin de aislar el sobrenadante.

Las muestras se diluyeron en buffer HBS a la mitad (1:2) y se pasaron a través del micro fluido por los canales de los chips con cada uno de los 14 anticuerpos inmovilizados. Las muestras que dieron respuestas mayores a las obtenidas con las mayores concentraciones de las curvas de calibración (2500 ng/ml) se diluyeron, con el fin de que los valores de (UR) obtenidos quedaran interpolados. Las muestras se midieron por duplicado para cada factor o citoquina. Los valores de UR obtenidos al analizar las muestras se interpolaron y a los valores obtenidos, se les aplicó la función inversa del logaritmo natural para obtener el valor de concentración de las proteínas en las muestras. Finalmente, estos valores se multiplicaron por el factor de dilución para obtener las concentraciones de los factores y citoquinas en los exudados y en los medios de cultivo.

7 Resultados

7.1 Elaboración de Tejido Conectivo Artificial a Partir de Fibroblastos de Dermis y Soportes Multidireccionales y Unidireccionales de Colágeno Tipo I

La **Figura 4** muestra imágenes representativas de soportes cuadrados de colágeno tipo I (4cm²) con fibras orientadas multi- y unidireccionalmente. Se puede apreciar que los soportes multi y unidireccionales son diferentes.

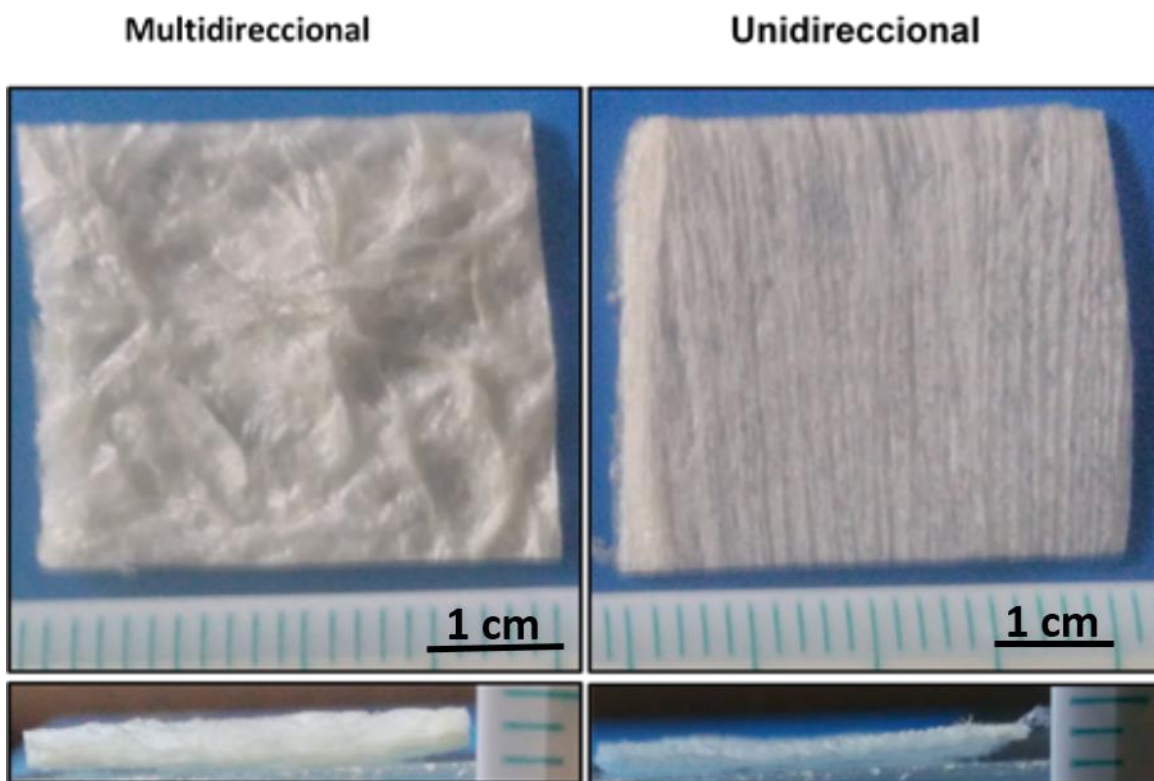


Figura 4. Fotografías de los soportes multidireccionales y unidireccionales. Se muestran imágenes representativas de la apariencia longitudinal y transversal de los soportes multi- y unidireccionales elaborados.

Con el fin de obtener los fibroblastos de piel de los animales incluidos en el estudio, se hicieron cultivos primarios mediante el método de explantes. En la **Figura 5** se observan fibroblastos que han migrado de los explantes para adherirse y proliferar en la superficie del plato de cultivo (Panel A). Con mayor resolución, se puede ver la morfología típica de los fibroblastos obtenidos (Panel B).

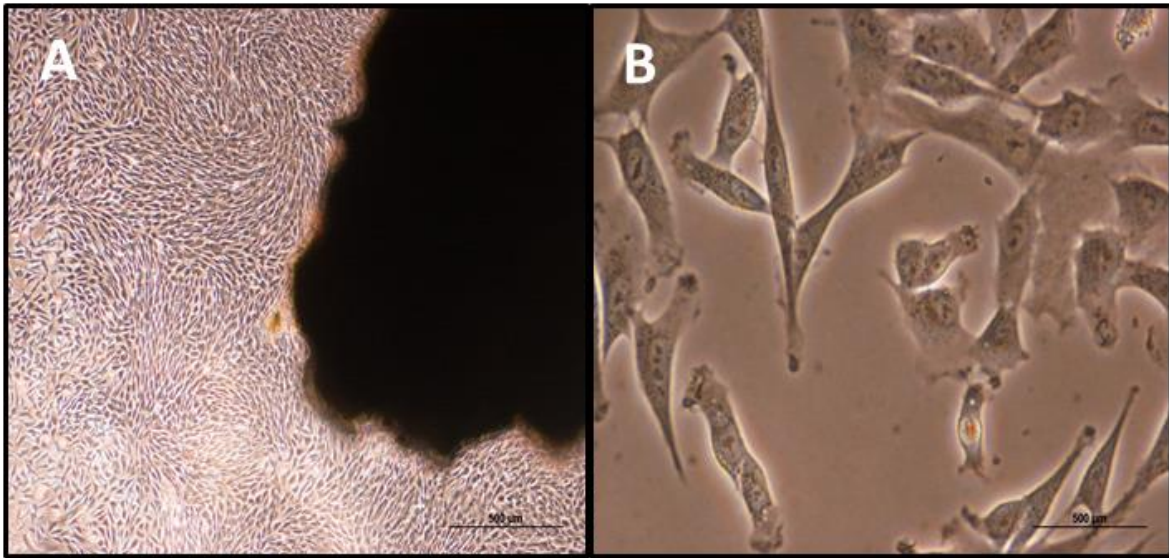


Figura 5. Micrografías de cultivos primarios de fibroblastos de piel de conejo. (A) Células que han migrado de un explante. **(B)** Células con morfología fusiforme. Escala de 500μm.

Los dos tipos de tejido elaborados (multi y unidireccional) redujeron MTT a formazan, lo que verifica que se mantiene la actividad metabólica mitocondrial de las células en el momento de su implante. En las micrografías con mayor resolución, se alcanzan a ver las células asociadas a las fibras de colágeno tipo I de los dos tipos de soportes **Figura 6**.

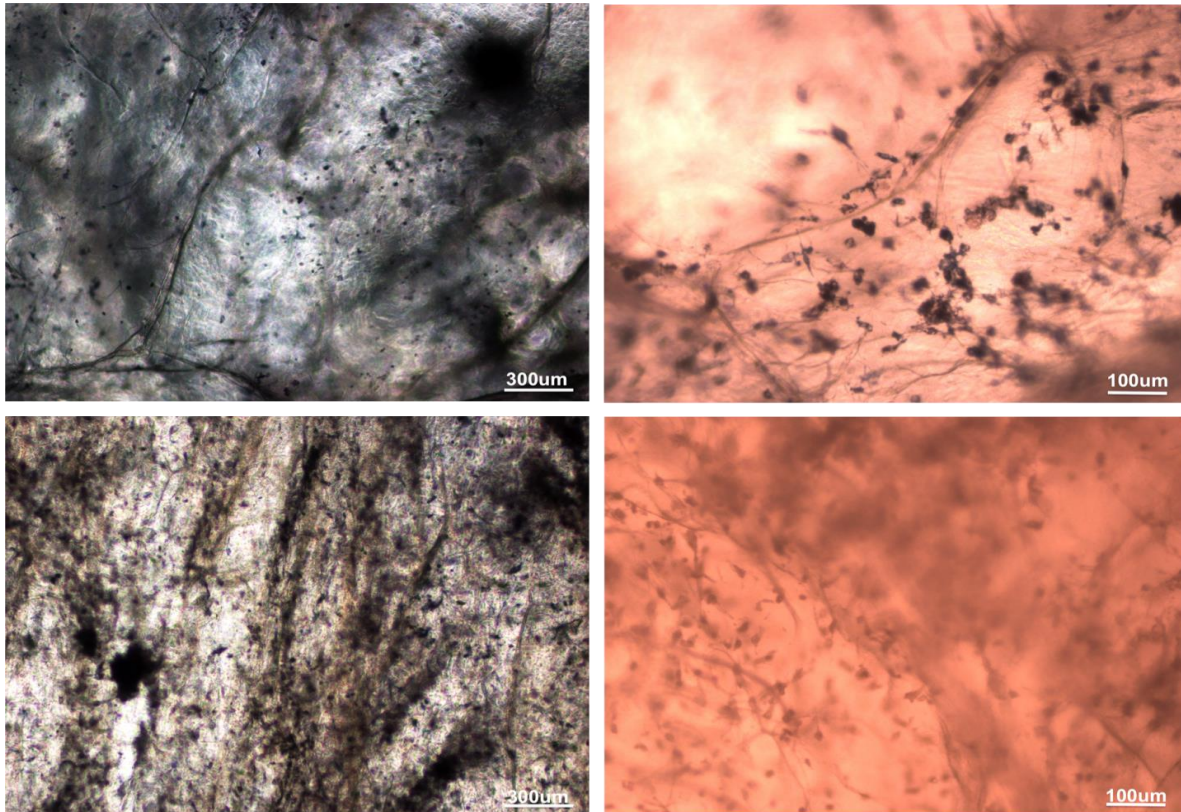


Figura 6. Ensayo con MTT para verificar viabilidad de los tejidos. (A y B) Micrografías tomadas en el microscopio de luz invertido (menor y mayor magnificación, respectivamente), del tejido elaborado con soporte multidireccional. (B y C) Micrografías tomadas en el microscopio de luz invertida (menor y mayor magnificación, respectivamente), del tejido elaborado con soporte unidireccional.

7.2 Evaluación Preclínica del Tejido Artificial

7.2.1.1 Seguimiento clínico de las heridas

Se hizo el seguimiento de la reparación de heridas contralaterales hechas en la parte escapular del dorso de cada conejo, tratadas con tejido elaborado con soportes unidireccionales (UTCA) y tejido elaborado con soportes multidireccionales (MTCA). En dos de los grupos una de las heridas de cada conejo se dejó sin tratamiento como control (SI).

La **Figura 7** muestra heridas injertadas con los dos tipos de tejido en el día 6. El tejido hecho con fibras de colágeno orientadas multidireccionalmente (MTCA) permaneció fijado con los puntos al borde de la herida y se integró al lecho; además, en algunos de los bordes fueron evidentes signos de su recambio (**Panel A**). Contrariamente, el tejido unidireccional (UTCA) se contrajo perpendicularmente a la orientación de los poros observándose el rompimiento de los puntos que lo fijaban a la piel. Su apariencia y color no cambiaron y no se observó evidencia física de adhesión al lecho, así como de recambio del tejido artificial por nuevo tejido (**Panel B**).

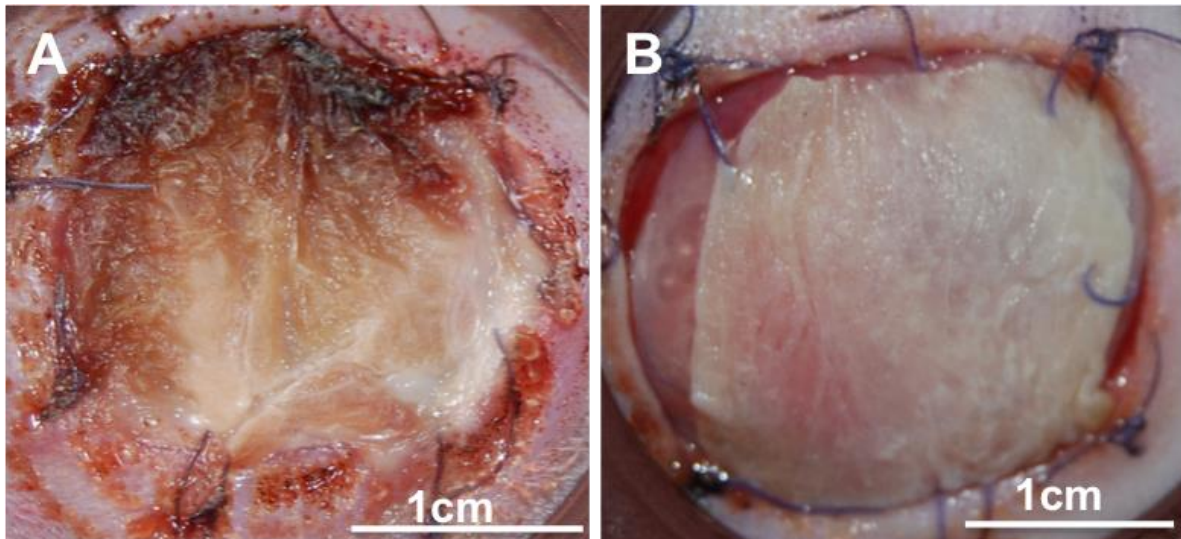


Figura 7. Imágenes representativas de heridas injertadas. (A). Zona injertada con tejido multidireccional (MTCA); **(B).** Zona injertada con tejido unidireccional (UTCA). Se puede ver la diferencia en la integración de los tejidos artificiales a la cama y el borde de las heridas.

En la **Figura 8** se registra el seguimiento clínico realizado entre el día 0 y el día 30 pos-cirugía, de conejos de los grupos en que se compararon heridas injertadas con UTCA o MTCA con heridas sin injertar (SI), usadas como control del cierre por segunda intención. Las imágenes obtenidas hasta el día nueve, confirman que el MTCA permaneció integrado al lecho y fue recambiado gradualmente; también, que el UTCA se contrajo, hubo dehiscencia y aparentemente menor integración que la observada en las heridas injertadas con MTCA. En las observaciones

posquirúrgicas de las heridas injertadas con los dos tipos de tejido artificial a los días 3, 6 y 9 se encontraron bordes definidos, presencia de exudado moderado y ausencia de inflamación. En las heridas control (SI) se observaron bordes inflamados, exudado seroso y en algunos casos purulento. Para el día 20 fue evidente la formación de cicatriz en todos los animales incluidos en éste estudio. En el día 30 en una de las heridas control se observó una pústula corneal

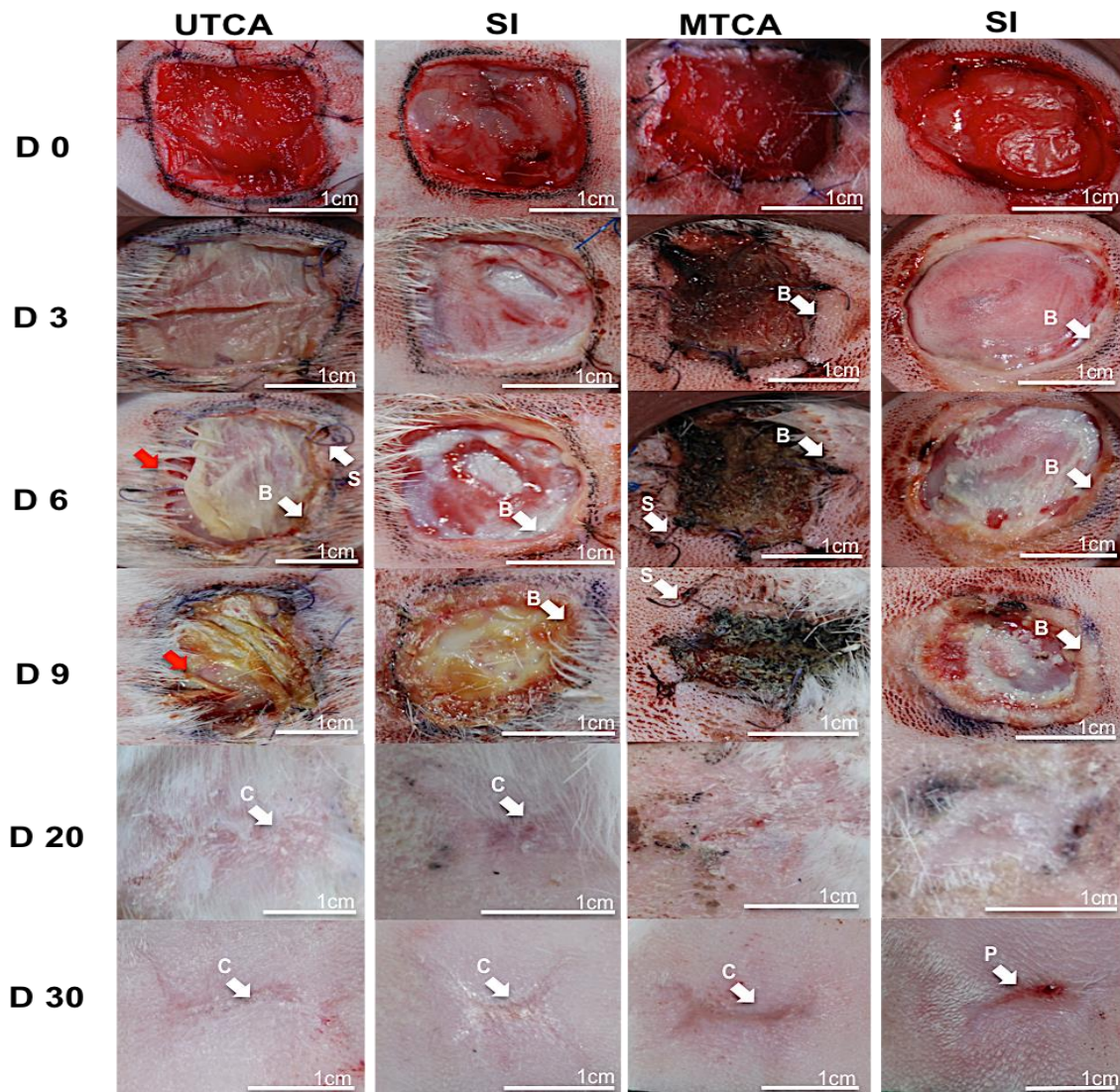


Figura 8. Seguimiento clínico de heridas injertadas con UTCA o MTCA y sus respectivos controles (SI). Convenciones: Borde de la herida (B); sutura (S); tejido cicatrizal (C); pústula (P).

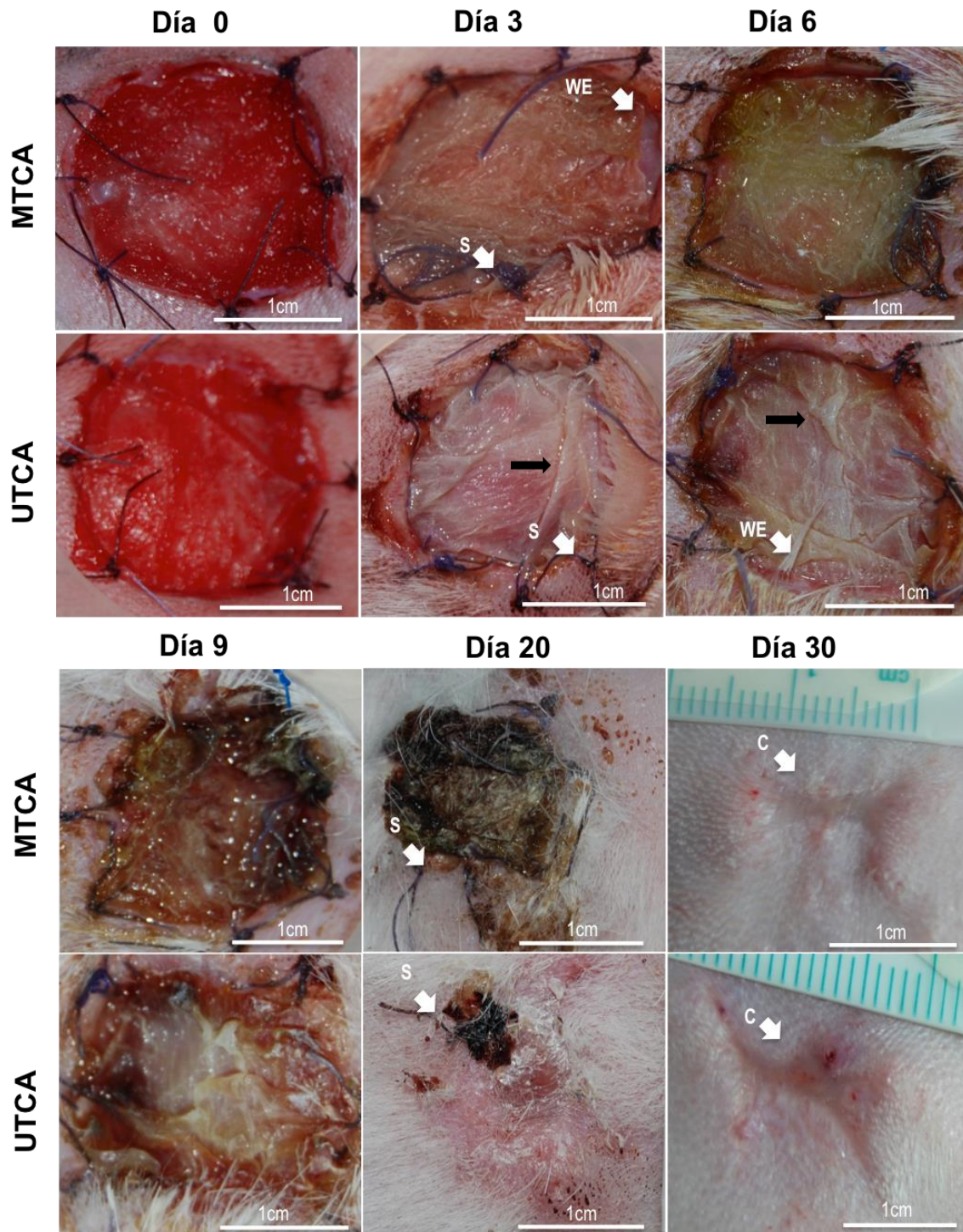


Figura 9. Seguimiento clínico de heridas injertadas con MTCA o UTCA. Convenciones: Borde de la herida (WE); sutura (S); tejido cicatrizal (C).

La **Figura 9** presenta imágenes representativas de la evolución clínica de los animales injertadas con MTCA y contralateralmente con UTCA. Las heridas injertadas con MTCA o con UTCA mostraron un comportamiento similar al descrito para las heridas injertadas con tejido artificial de los grupos MTCA vs Control y UTCA vs Control. En las imágenes obtenidas hasta el día nueve se ve el MTCA integrado al lecho de la herida, también, recambio parcial del mismo y formación de tejido de granulación. La integración del UTCA fue menor, como lo sugieren los plegamientos del injerto en la región central de la herida. A pesar de que la herida injertada con MTCA se observó cubierta por una costra, en el día 20 todas las heridas habían cerrado. Al finalizar el estudio se observó cicatriz en todos los animales incluidos en este estudio.

7.3 Evaluación Histológica e Histomorfométrica

7.3.1 Descripción histológica

La **Figura 10** muestra imágenes representativas de cortes histológicos de biopsias tomadas de heridas injertadas con MTCA y UTCA y sus respectivos controles. Las zonas injertadas con MTCA mostraron la presencia de fibras de colágeno laxas, paralelas al epitelio; así como, zonas con fibras dispuestas de forma aleatoria. En las heridas control se vieron fibras de colágeno densas, orientadas paralelamente al epitelio y muy pocas zonas con fibras densas organizadas aleatoriamente. Aunque se observaron vasos sanguíneos y abundantes células, características del tejido de granulación, tanto en las muestras de la zona injertada como en su control, aparentemente estos fueron más abundantes en la zona control que en la zona injertada (**Paneles A y B**). A pesar de que en las heridas injertadas con UTCA y en sus controles se observaron fibras de colágeno paralelas al epitelio, en ambos casos estas fueron densas. Aparentemente, el número de vasos sanguíneos y células, fue similar tanto en las muestras de la zona injertada como en su control (**Paneles C y D**). En todas las biopsias analizadas se encontraron otras características

propias del tejido cicatrizal como engrosamiento del epitelio y adelgazamiento del tejido conectivo. En la mayoría de los casos, hubo reepitelización completa salvo en algunos controles.

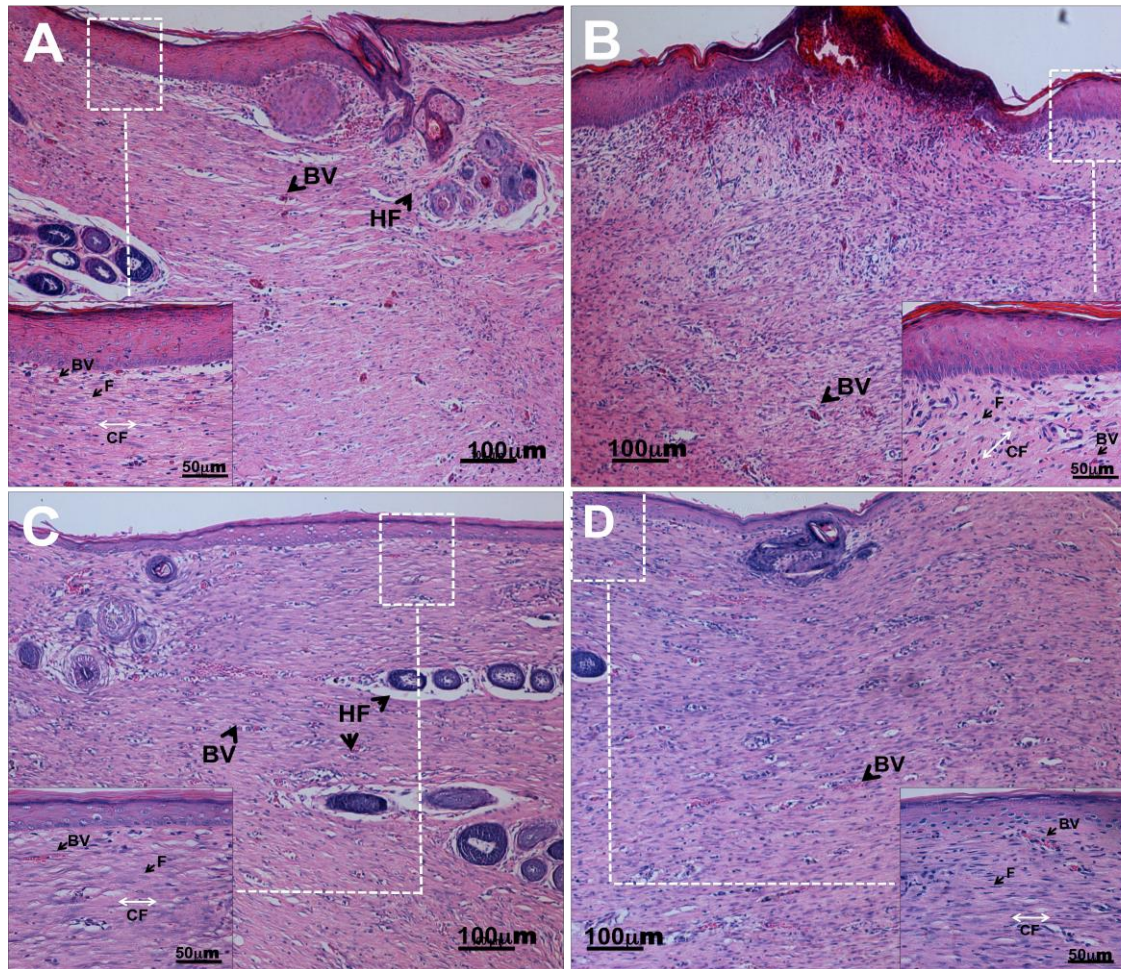


Figura 10. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos. (A) Imagen de corte proveniente de biopsia de herida injertada con MTCA; (B) Imagen de corte proveniente de la herida contralateral usada como control, (C) Imagen de corte proveniente de herida injertada con UTCA, (D) Imagen de corte proveniente de herida usada como control. Convenciones: Vaso sanguíneo (BV); folículo piloso (HF); fibroblasto (F); fibra de colágeno (CF).

La **Figura 11** contiene imágenes representativas de los cortes de biopsias tomadas de heridas injertadas con MTCA o UTCA. Aunque en ambos cortes la dermisperficial presenta fibras de colágeno paralelas al epitelio, en el tejido proveniente de la zona injertada con MTCA se aprecian áreas de tejido laxo organizado aleatoriamente y aparentemente con menor celularidad (**Panel A**). En la zona injertada con UCTA las fibras de colágeno paralelas al epitelio fueron más densas que las observadas en las zonas injertadas con MTCA; también, se aprecian unas pocas regiones de tejido denso organizado aleatoriamente (**Panel B**). En todas las biopsias analizadas se observó el engrosamiento del epitelio y adelgazamiento del tejido conectivo propios del tejido cicatrizal.

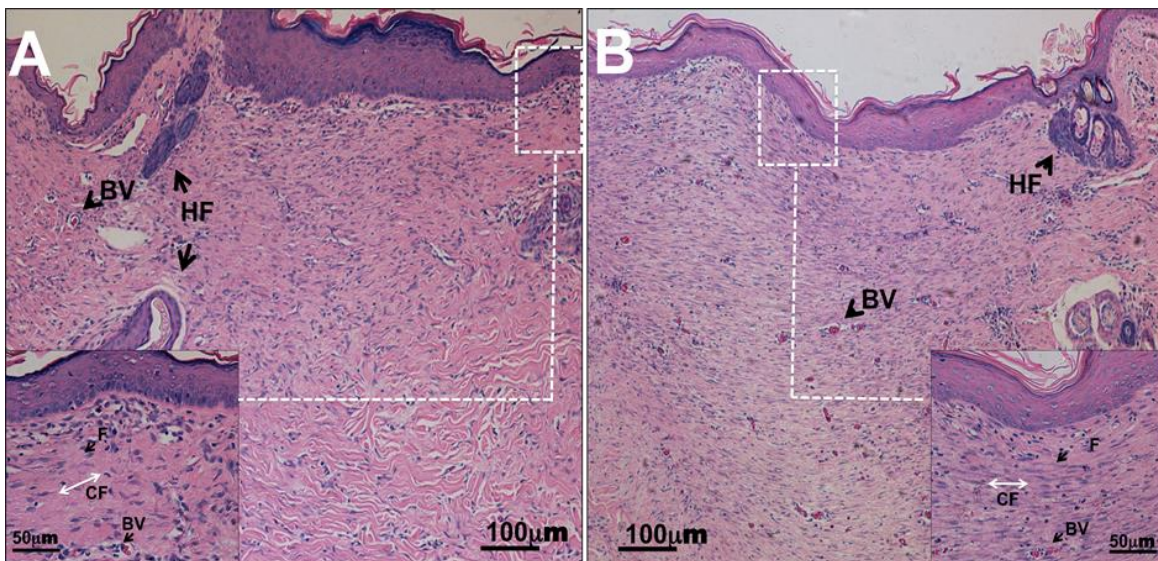


Figura 11. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos. (A) Tejido proveniente de herida injertada con UTCA, (B) Tejido proveniente de herida injertada con MTCA. Vaso sanguíneo (BV); folículo piloso (HF); fibroblasto (F); fibra de colágeno (CF).

La **Figura 12** incluye imágenes de los epitelios formados sobre heridas injertadas con MTCA y UTCA y de la zona sana circundante, obtenidas de cortes de biopsias provenientes de un mismo conejo. Tanto en las heridas injertadas con los dos tipos de tejido artificial como en el control se observó la formación de epitelio con una adecuada estratificación y presencia de queratina. En los epitelios de todas las

heridas tratadas y controles se observó hiperplasia ortoqueratótica, siendo esta aparentemente mayor en las heridas tratadas con UTCA.

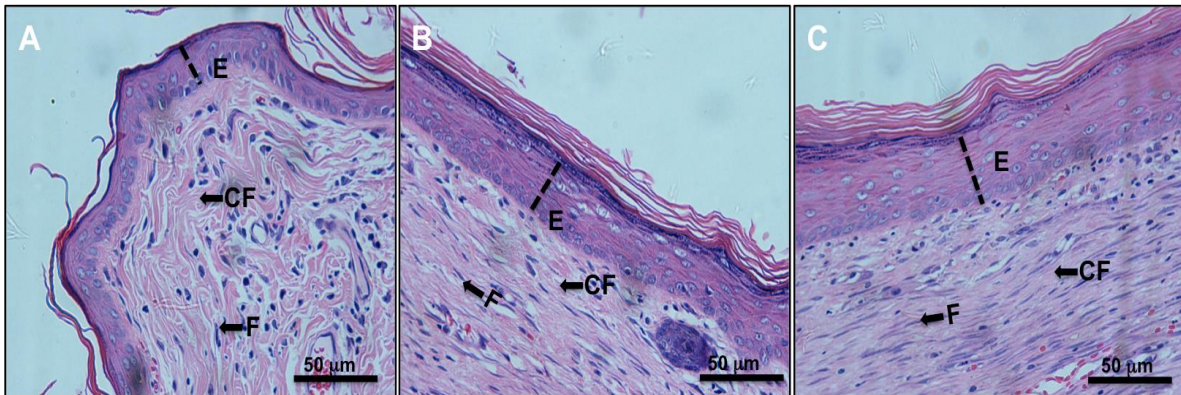


Figura 12. Micrografías representativas de los tejidos resultantes después a los 30 días de las cirugías y de la aplicación de los tratamientos comparadas con la piel sana. A: Piel sana B: MTCA, C: UTCA. Convenciones: Fibroblasto (F); Fibra de colágeno (CF); Epitelio (E).

7.3.2 Evaluación histomorfométrica

En la parte reparada y el tejido sano adyacente a las heridas se midieron el espesor del tejido conectivo, el espesor del epitelio y se contaron los vasos sanguíneos empleando el programa Image J. Los datos provenientes de los tratamientos y los controles se dividieron por los resultados de las medidas de la zona sana, con el fin de normalizar los resultados y bloquear las variables inherentes a los individuos. Las relaciones obtenidas (**R/S**) al alejarse o acercarse a 1, permitieron determinar la diferencia o similitud del parámetro evaluado en las heridas con los de la piel sana circundante. Para las medidas del epitelio se tomaron 10 campos al azar por cada caso (magnificación 40X), para las medidas de la dermis se tomaron imágenes de dos cortes histológicos por cada tratamiento (magnificación 2X). Para el conteo de vasos sanguíneos se tomaron 10 campos por cada biopsia (magnificación 40X). Los resultados fueron sometidos directamente a la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon debido a que en total hubo menos de 10 unidades experimentales por cada tratamiento y control.

7.3.2.1 Espesor del tejido conectivo (dermis)

En general en las heridas tratadas y sus controles, se observó una disminución en el grosor de la dermis con respecto a la piel sana. Los resultados de la comparación entre los grosores del tejido conectivo, mostraron que hay diferencias significativas entre las heridas injertadas con MTCA y sus controles ($p= 0.0019$). También, que hay diferencias significativas entre las heridas injertadas con MTCA y las injertadas con UTCA ($p= 0.0023$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p> 0.05$) entre las heridas tratadas con UTCA y sus controles. Debe destacarse que los valores de la relación R/S más cercanos a 1, provinieron de dividir los resultados de las heridas tratadas con MTCA por los valores de la piel sana (**Figura 13**).

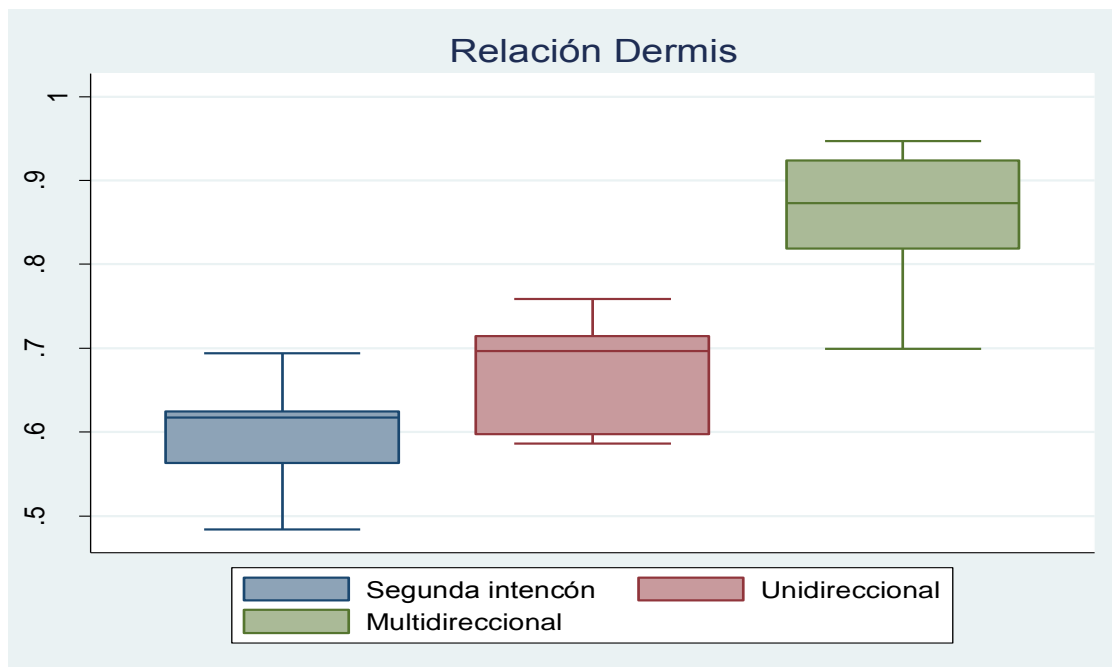


Figura 13. Relación entre el espesor del tejido conectivo de las heridas injertadas (MTCA, UTCA) y control, con el espesor de la dermis sana circundante.

7.3.2.2 Comparación del número de vasos sanguíneos

El grosor del epitelio fue significativamente diferente en las heridas injertadas con MTCA y sus controles ($p = 0.0117$); así como en las heridas contralaterales injertadas con MTCA o con UTCA ($p= 0.0067$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grosor del epitelio de las heridas injertadas con UTCA y sus controles ($p= 0.1556$). La relación **R/S** más cercana a 1, se obtuvo al dividir los valores de grosor del epitelio provenientes del tejido formado en las heridas injertadas con MTCA por el grosor del epitelio medido en el tejido sano circundante (**Figura 14**).

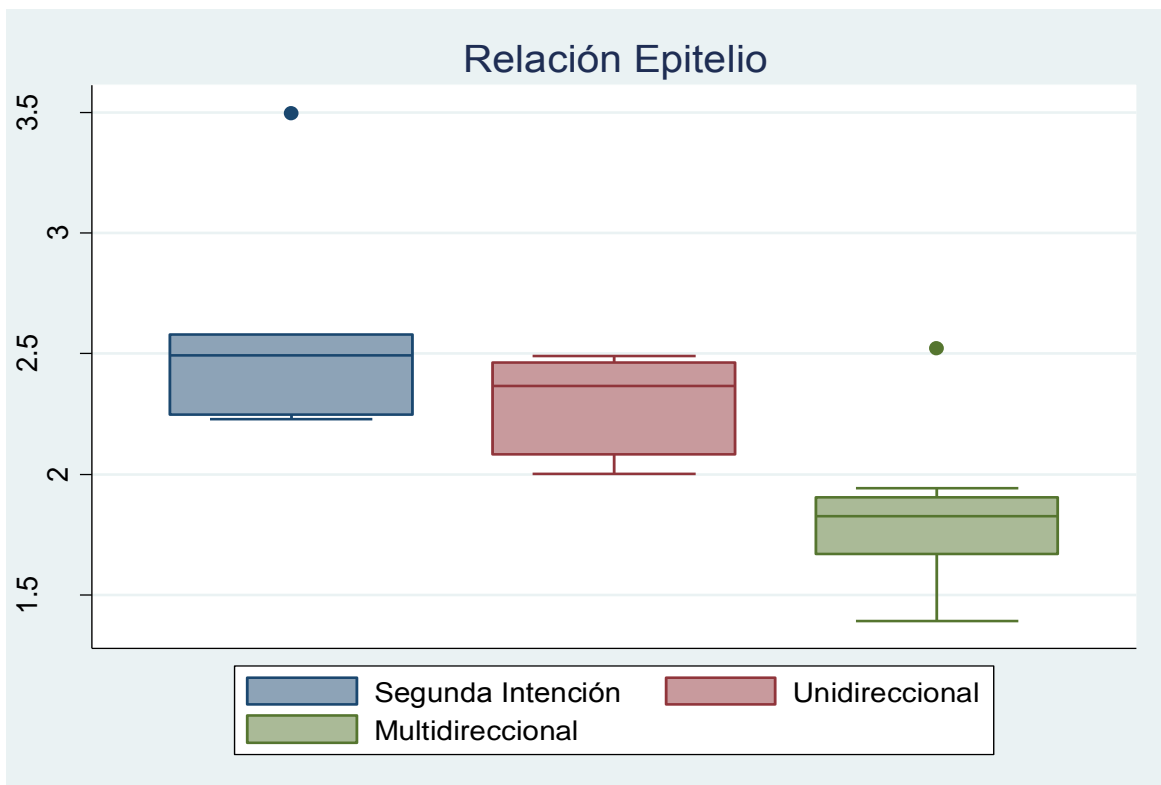


Figura 14. Relación entre el grosor del epitelio de las heridas injertadas (MTCA, UTCA) y control, con el grosor de la piel sana circundante.

7.3.2.3 Comparación del número de vasos sanguíneos

En la **Figura 15** se muestran los valores R/S obtenidos al relacionar el número de vasos sanguíneos contados en las zonas injertadas (MTCA, UTCA) y heridas control con el número de vasos contados en la piel sana circundante. No se encontraron diferencias significativas en el número de vasos sanguíneos entre los grupos evaluados ($p > 0.05$); sin embargo, se puede ver que en general el número de vasos en el tejido reparado (tratamientos y controles) es el doble y el triple del número de vasos presentes en la piel sana.

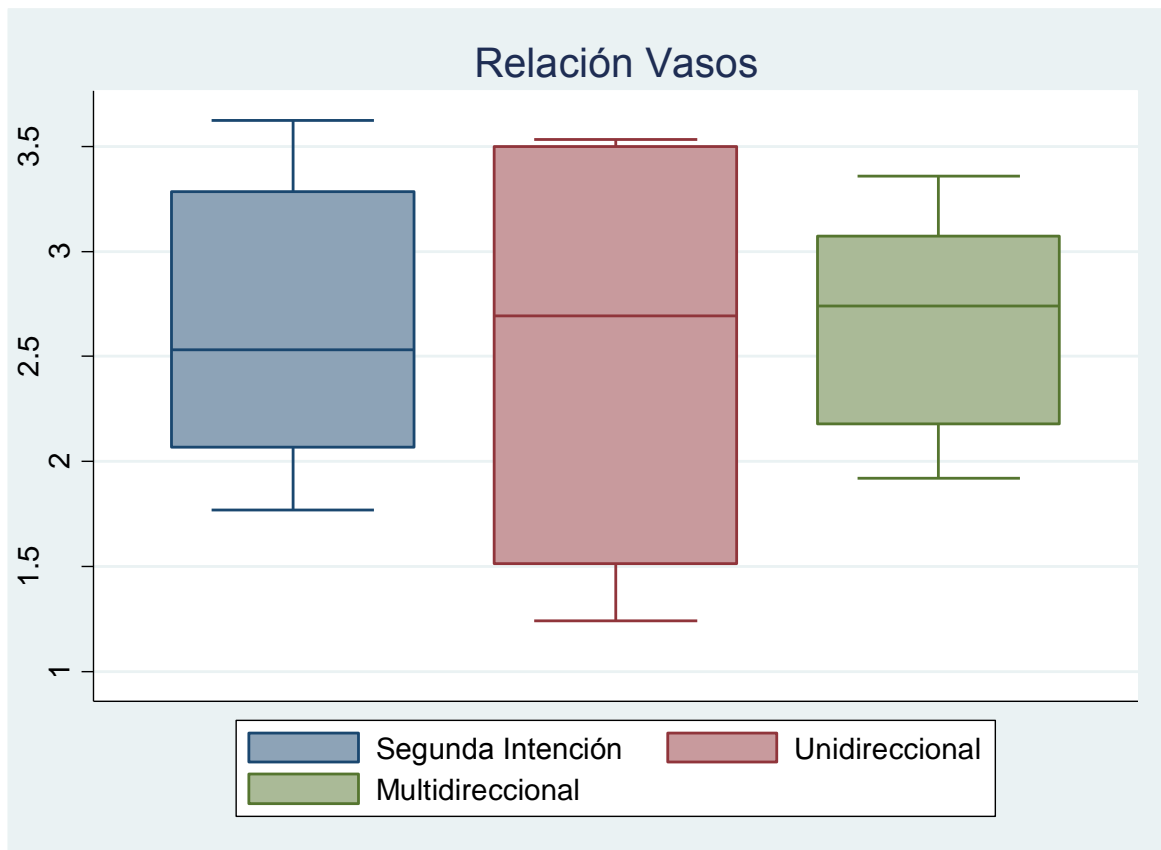


Figura 15. Relación entre el número de vasos sanguíneos en la dermis de las heridas tratadas (MTCA, UTCA), heridas control y número de vasos de la piel sana circundante.

7.3.2.4 Disposición de las fibras de colágeno I

En general se observaron cuatro tipos de disposición de las fibras de colágeno: i) Haces densos orientados aleatoriamente; ii) Haces densos paralelos al epitelio; iii) Haces aleatorios laxos; iv) Haces laxos paralelos al epitelio (**Figura 16**). Para determinar el porcentaje de fibras con cada disposición se tomaron 10 campos (magnificación 40X) y de cada tratamiento se analizaron los cortes histológicos de 6 biopsias. De esta forma, se analizó el mismo número de campos para cada caso.

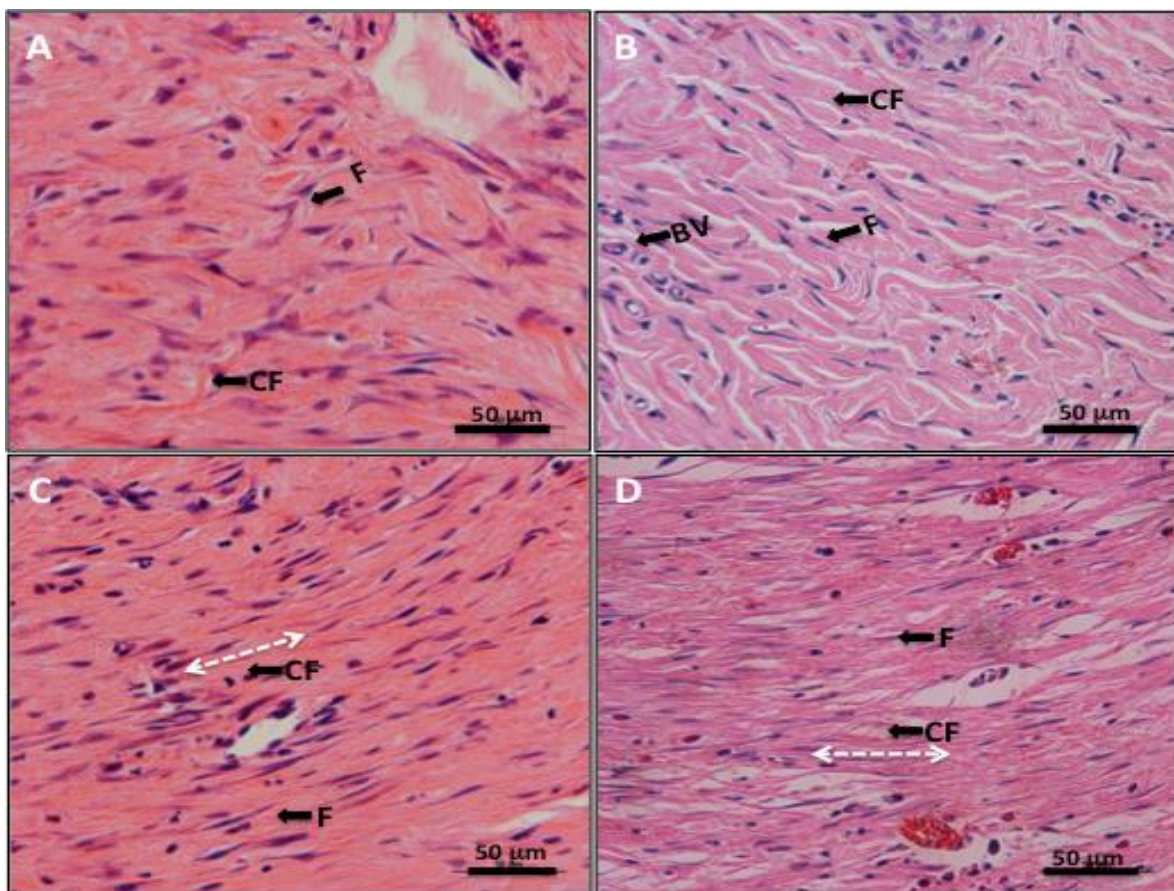


Figura 16. Disposición de las fibras de colágeno en el tejido obtenido. (A) Fibras densas en haces orientados aleatoriamente. (B) Fibras laxas en haces orientados aleatoriamente. (C) Fibras densas paralelas al epitelio. (D) Fibras laxas paralelas al epitelio

En la **Figura 17** se puede ver que el porcentaje de haces densos orientados aleatoriamente fue mayor en las heridas control (48%) que en las injertadas con UTCA (30%) y en las heridas injertadas con MTCA (22%). El porcentaje de haces densos paralelos al epitelio fue mayor en las zonas injertadas con UTCA (42%) que en los controles (38%) y en las heridas injertadas con MTCA (20%). Es importante resaltar que el porcentaje de haces aleatorios laxos fue mayor en las heridas injertadas con MTCA (82%) que en las heridas tratadas con UTCA (14%) y en las heridas control (4%). Este mismo comportamiento fue observado en el porcentaje de haces laxos paralelos al epitelio, que fue mayor en las heridas injertadas con MTCA (67%) que en las heridas injertadas con UTCA (22%) y los controles (11%)

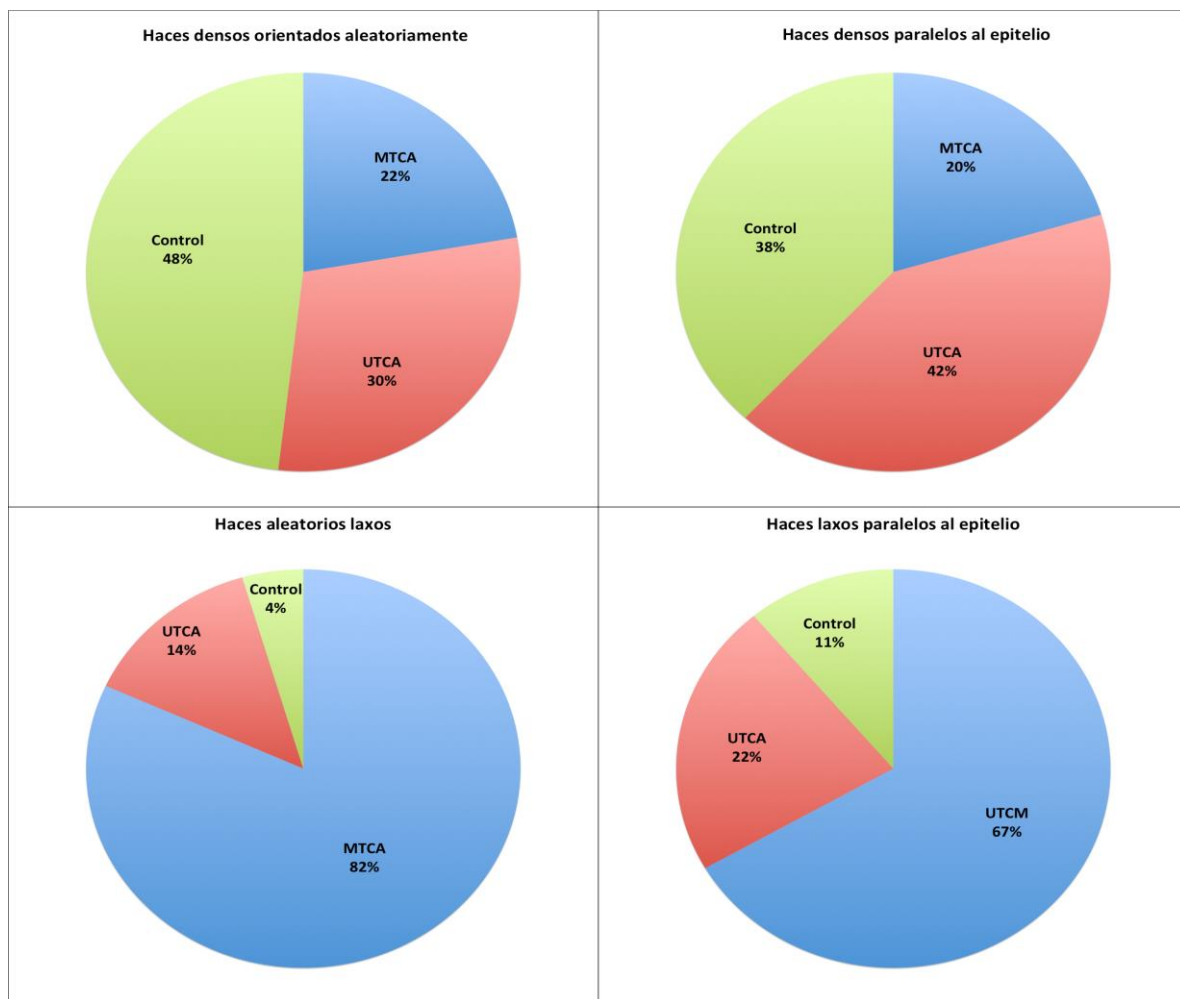


Figura 17. Porcentaje de la disposición de las fibras de colágeno en el tejido formado para cada tratamiento MTCA, UTCA y los controles.

7.4 Establecimiento de la Metodología Para la Cuantificación de Factores Solubles Presentes en Heridas Cutáneas de Espesor Total Durante su Cicatrización

7.4.1 Modificación de la superficie de los chips de oro con monocapas autoensambladas (SAM) de MHC-MUA.

Inicialmente se estandarizó una metodología para la cuantificación de 15 factores y citoquinas en medios de cultivo y exudados de heridas de piel de espesor total de conejo, basada en un biosensor óptico de resonancia de plasmones de superficie (SPR). La primera parte del proceso de estandarización consistió en modificar la superficie de los chips de oro uniéndoles covalentemente a los alcanotioles MHC y MUA; los cuales, funcionan como puentes moleculares que permiten inmovilizar los anticuerpos (ligandos) e interaccionan de forma específica con las proteínas a cuantificar (analitos). En el sensorgrama correspondiente a la estandarización de las monocapas autoensambladas (SAM), se aprecia la diferencia en unidades de resonancia entre la señal que se produce con el chip sin modificar y el chip después de reaccionar durante 8 y 24 horas. Los diferencia en los valores de resonancia entre las señales obtenidas antes y después de la formación de las monocapas fueron de 1820 UR y 3288 UR, respectivamente (**Figura 18**).

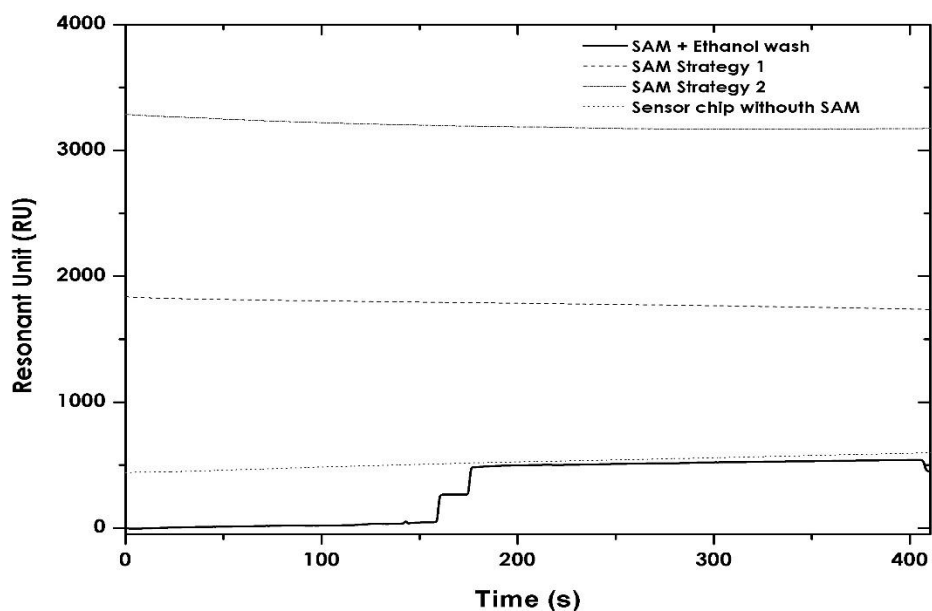


Figura 18. Sensorgrama representativo de la estandarización de monocapas autoensambladas (SAM) de MHC y MUA. Se evaluaron dos estrategias con diferentes tiempos de reacción del oro de la superficie del chip con los compuestos orgánicos. Estrategia 1: 8 horas de reacción; Estrategia 2: 24 horas de reacción.

7.4.2 Inmovilización de los anticuerpos

Se ensayaron dos formas de inmovilización de los anticuerpos en los chips de oro. Una de ellas se dirigió a unir directamente el anticuerpo a las monocapas autoensambladas a través de los grupos hidroxilo del MHC o del grupo carbonilo del MUA y alguna amina primaria de las proteínas (método directo); la otra, a unir los anticuerpos por afinidad a proteína G pre-inmovilizada en las monocapas autoensambladas (método indirecto). Los sensorgramas obtenidos con ambos métodos al inmovilizar anti-Angiopoyetina-2 se muestran en la Figura 19. Como se puede apreciar, después de inmovilizar el anticuerpo con el método directo se produjo un aumento en las unidades de resonancia (UR) con respecto a la línea base (Panel A). Contrariamente, durante la inmovilización indirecta del mismo anticuerpo no se observó cambio en la señal de la línea base (Panel B). Al

inmovilizar otro anticuerpo escogido al azar (anti-TNF- α) se encontraron los mismos resultados (ver Anexo 1). Considerando los hallazgos descritos, todas las cuantificaciones realizadas en éste trabajo se llevaron a cabo con anticuerpos inmovilizados directamente

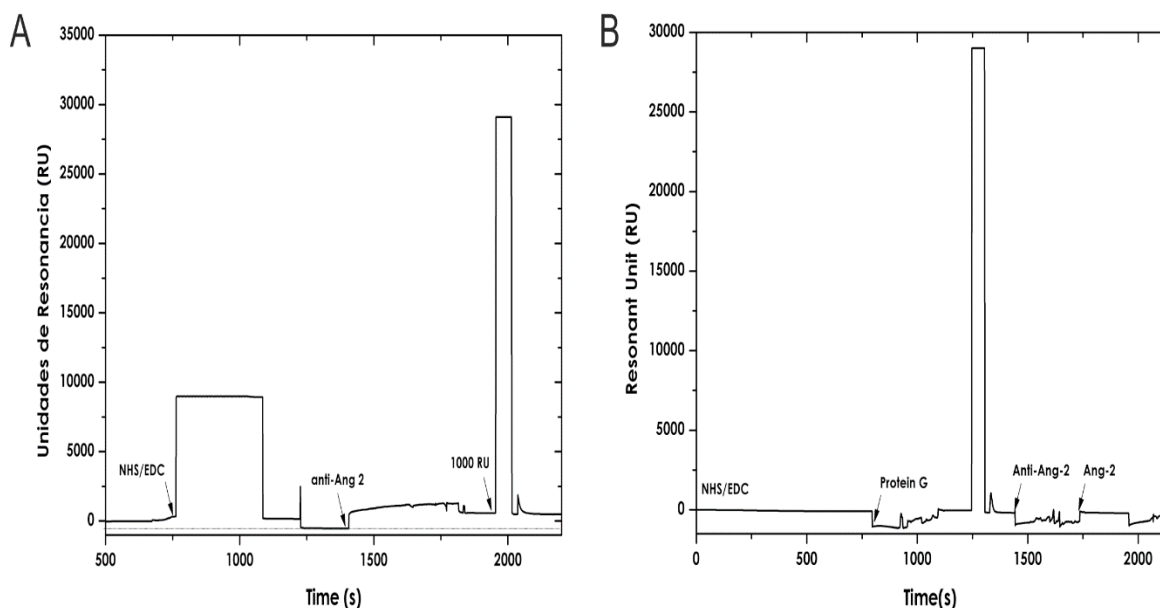


Figura 19. Sensorgramas de la inmovilización directa e indirecta de anti-Ang-2. (A) Inmovilización directa anti-Ang-2 en la superficie del chip de oro. (B) Inmovilización indirecta de anti-Ang-2 en el chip con proteína G pre-inmovilizada.

Una vez se escogió el método de inmovilización directa de los ligandos a las monocapas autoensambladas de MUA-MHC, se hicieron las curvas de calibración para cinco estándares (Ang-2, EGF, TNF- α , TGF- β 1, y VEGF). Las curvas obtenidas diluyendo estos factores en HBS-EP mostraron el incremento de los valores de RU al aumentar la concentración de cada uno de ellos (**Figura 20**). El ajuste lineal y el coeficiente de variación (CV) de cada una de las curvas obtenidas cumplieron con los requerimientos para las metodologías analíticas del “International Council for Harmonisation (ICH)”.

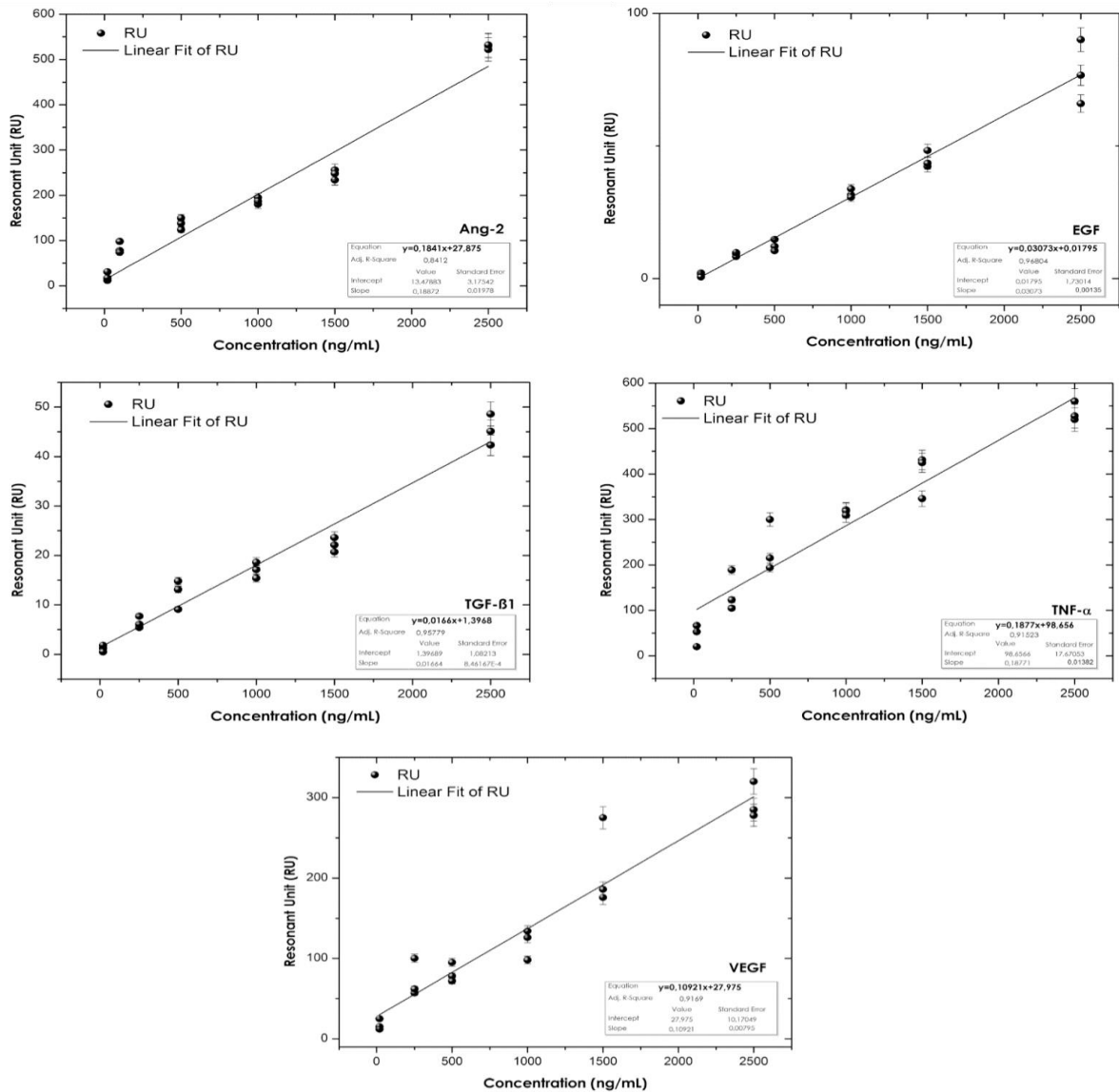


Figura 20. Curvas de calibración obtenidas con monocapas autoensambladas de MUA y MHC. Se muestra el aumento en la señal UR a medida que aumenta la concentración de las proteínas patrón.

Las curvas de calibración anteriores se usaron para cuantificar Ang-2, EGF, TNF- α , TGF- β 1 y VEGF en los exudados provenientes de los grupos en que se compararon heridas injertadas con UTCA o MTCA con heridas sin injertar (SI). Las soluciones de regeneración que permitieron un porcentaje de regeneración mayor que el 94% para cada uno de los estándares mencionados, se muestran en la Tabla 4. La solución lww, corresponde a la mezcla de un agente iónico y caotrópico con dos

volúmenes de agua; la solución B_{ww}, a la mezcla de una base con dos volúmenes de agua y la solución Gly, a una solución de glicina (pH: 2.0). Como indica la tabla, la mejor regeneración se observó al utilizar la solución Gly.

Tabla 4 Soluciones de Regeneración

PROTEÍNA	SOLUCIÓN DE REGENERACIÓN*	% REGENERACIÓN
Ang-2	I _{ww}	95%
EGF	B _{ww}	96%
TGF-β1	B _{ww}	94%
TNF-α	B _{ww}	95%
VEGF	Gly	98%

7.4.3 Cuantificación de factores de crecimiento y citoquinas en los exudados tomados de las heridas tratadas con MTCA o UTCA y sus controles en chips con monocapas elaboradas con MHC y MUA.

La **Figura 21** muestra un ejemplo de las curvas de asociación obtenidas empleando chips con monocapas autoensambladas de MHC y MUA. Se puede apreciar que ocurre un aumento de los valores de RU, en respuesta a la interacción específica de la Ang-2 presente en los exudados con el anticuerpo anti-Ang-2 inmovilizado en las monocapas. La figura también presenta la curva de disociación obtenida al remover las proteínas que no se unieron específicamente al ligando y la curva de regeneración obtenida al eliminar con la solución regeneradora, todas las interacciones antígeno-anticuerpo con el fin de habilitar los ligandos para una nueva medición. El retorno de la señal (UR) a la línea base observado en la figura, demuestra la regeneración de la matriz.

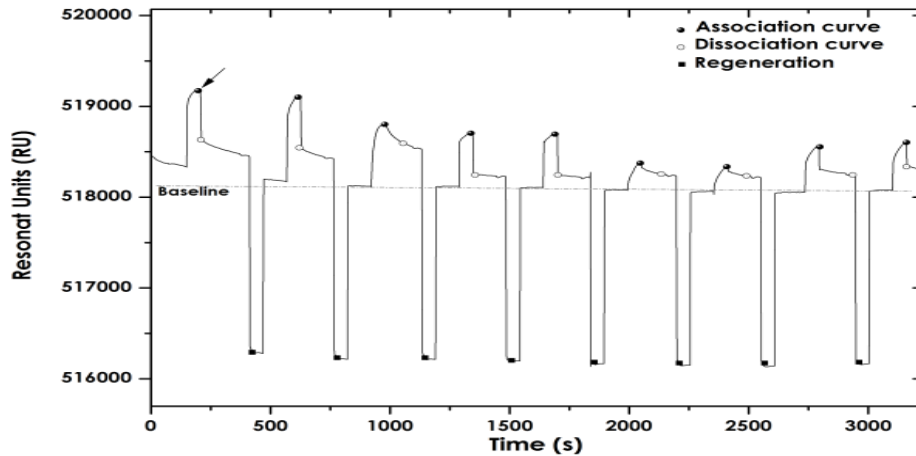


Figura 21. Sensorgrama de curvas de asociación y disociación. Cuantificación de Ang-2 en los exudados obtenidos de las heridas injertadas con tejido autólogo artificial.

Después de obtener los sensorgramas de las curvas de asociación, disociación y regeneración se procedió a cuantificar Ang-2, EGF, TGF-B1, TNF-Alfa y VEGF en muestras tomadas tres días después de haber realizado el procedimiento quirúrgico, de los conejos tratados con MTCA y UTCA y sus controles (SI) (**Figura 22**). Como se mencionó, estas cuantificaciones fueron llevadas a cabo con los chips cubiertos por monocapas autoensambladas de MUA y MHC. Los datos obtenidos indican que la expresión de Ang-2, EGF, TNF- α , TGF- β 1, y VEGF fue significativamente menor ($p < 0.05$) en las heridas injertadas con MTCA que en las heridas control. Contrariamente, en las heridas injertadas con UTCA las concentraciones de Ang-2, EGF, TNF- α y VEGF fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que en los controles; sin embargo, en este grupo la concentración de TGF- β 1 fue significativamente menor en el exudado de las heridas injertadas que en las heridas control.

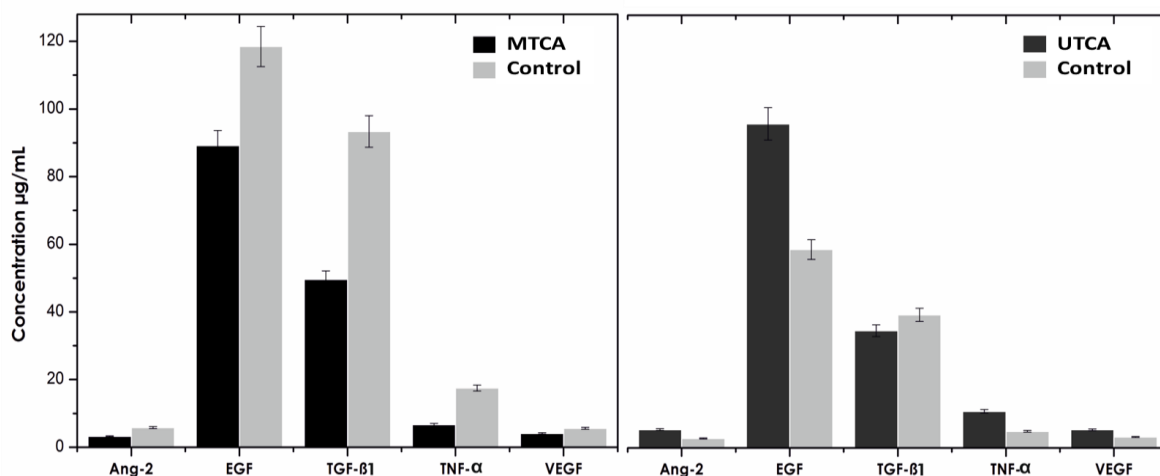


Figura 22. Determinación de las concentraciones de factores proteicos en exudados de heridas injertadas con AADm y AADu y sus respectivos controles (SI).

7.4.4 Cuantificación factores de crecimiento y citoquinas en los medios de cultivo de los tejidos artificiales y en las muestras de exudados de las heridas injertadas con estos tejidos.

Debido a que las monocapas autoensambladas de MUA y MHC empezaron a funcionar mal, se quiso determinar si monocapas autoensambladas de MUA mejoraban la respuesta. Se pensó en utilizar únicamente éste reactivo, debido a que la longitud de sus cadenas es mayor que la de las cadenas de MHC. Las monocapas autoensambladas de MUA se elaboraron de la misma manera en que se hicieron las monocapas de la mezcla de tioles (MUA-MHC). Se empleó como tiempo de reacción para el autoensamblaje, el tiempo usado en la obtención de las monocapas de MUA y MHC (24 h). Inicialmente se hicieron las inmobilizaciones de dos anticuerpos (anti-Ang-2 y anti-TGF-β1) y las curvas de calibración para los factores recombinantes Ang-2 y TGF-β1, empleados como patrones. Se observó mejor respuesta con las monocapas autoensambladas de MUA que con las monocapas de la mezcla MUA-MHC (Tabla 5, Paneles A y B). Por esta razón, para cuantificar la totalidad de los factores en las muestras obtenidas del grupo en el que

se comparó el desempeño de los dos tratamientos (AADm vs AADu) se usaron chips con monocapas autoensambladas de MUA.

Tabla 5. Comparación de la Respuesta Observada con SAM de MUA-MHC y SAM de MUA. A Ang1

A

Concentracion Ang-2 ng/mL	Respuesta (UR) monocapas MUA-MHC	Respuesta UR monocapas MUA
2500	528,0	836,7
1500	246,0	550,4
500	187,3	390,1
250	137,3	130,6
100	83,33	59,5
20	20,0	25,4

B

Concentracion TGF- β 1 ng/mL	Respuesta UR monocapas MUA- MHC	Respuesta UR monocapas MUA
2500,0	45,3	483,1
1500,0	37,2	273,0
500,0	28,9	201,8
250,0	22,1	146,1
100,0	21,4	64,9
20,0	18,7	34,7

Para la metodología en que se emplearon las monocapas ensambladas de MUA, se calculó el límite de detección (LOD) para cada factor, midiendo por triplicado la señal (URs) resultante de pasar la solución en que se diluyeron las muestras de los exudados por el biosensor con los chips con los anticuerpos inmovilizados. Los resultados obtenidos, permitieron estimar el valor de concentración promedio de cada proteína utilizando las curvas de calibración; a cada concentración promedio se le sumó tres veces la desviación estándar^{88,90}. En la Tabla 6 se muestran los resultados del límite de detección estimado para cada proteína.

Tabla 6. Límite de Detección

Proteína	LOD ng/mL	Proteína	LOD ng/mL
Ang-1	1,14	VEGF-R2	0,17
Ang-2	4,97	VEGF-R1	2,81
Endostatina	1,16	VEGF	6,45
Tie-2	1,24	TNF-Alfa	7,02
FGF-b	0,05	Il-4	4,71
EGF	0,80	TGF-B2,3	159,93
IGF-1	0,04	TGF-B1	9,89

7.4.4.1 Cuantificación factores de crecimiento y citoquinas en los medios de cultivos de MTCA y UTCA. Y de las muestras de exudados tomadas de las heridas tratadas con estos tejidos.

Para estas cuantificaciones se elaboraron las curvas de calibración utilizando proteínas recombinantes como patrones; las concentraciones de los patrones utilizadas fueron 2500, 1500, 1000, 500, 250, 100, 20 (ng/mL). Cada patrón se midió por triplicado y se registraron las respuestas en UR. Para algunas curvas fue necesario suprimir el punto de mayor concentración, debido a que por saturación de los anticuerpos no hubo aumento de las URs. En la **Figura 23**, se muestra la curvas Ang-1 en que se identificó que la respuesta en UR del último punto no aumenta por la saturación de los ligandos. .

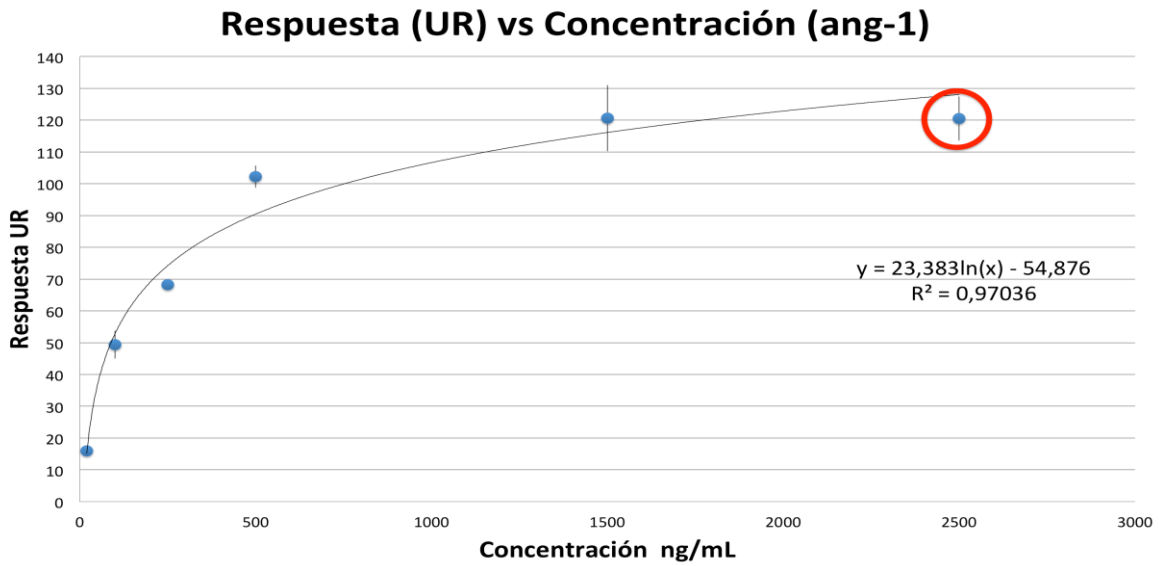
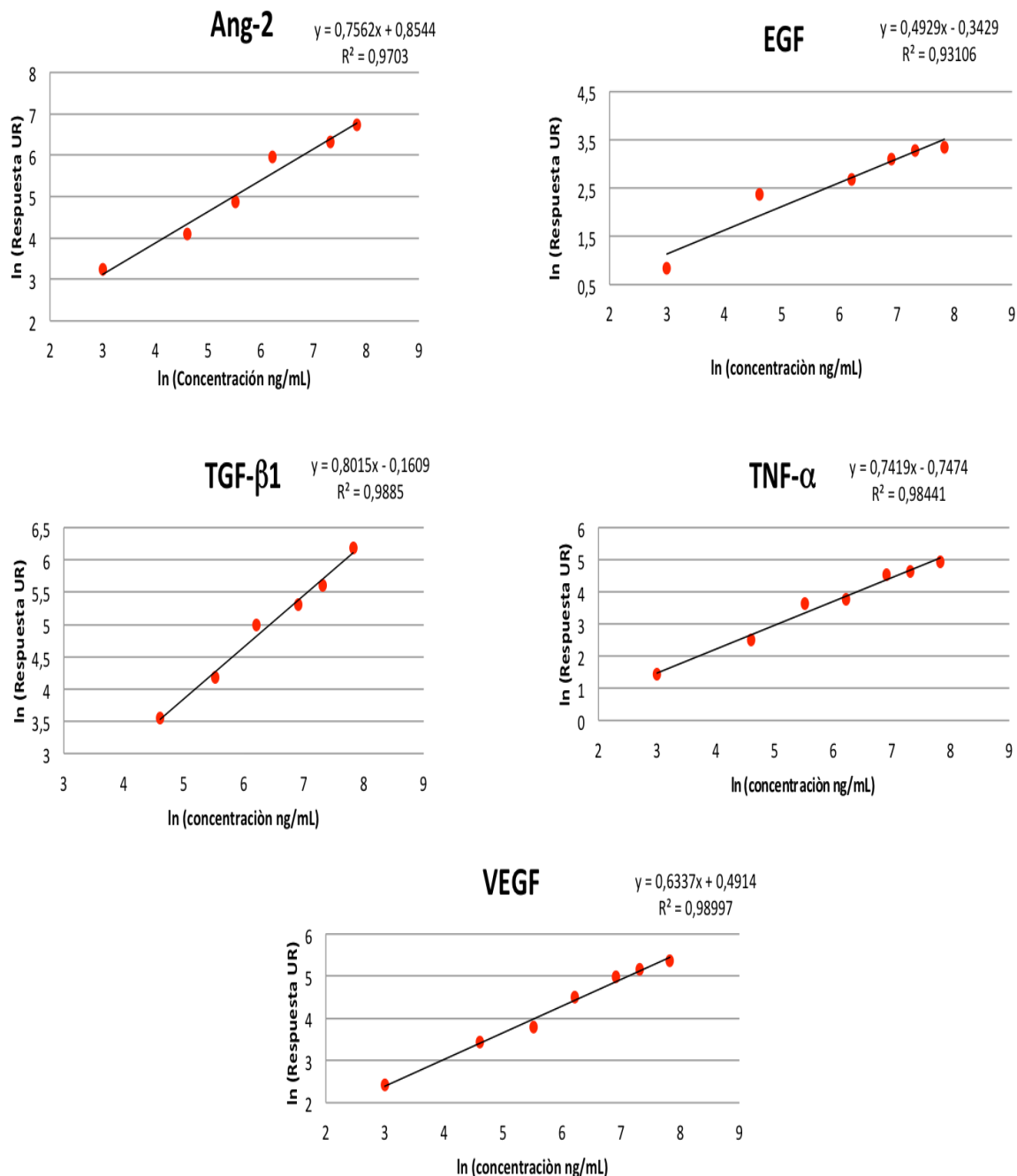
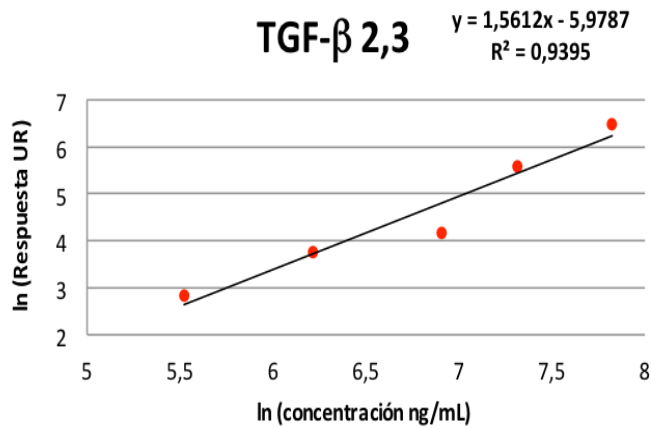
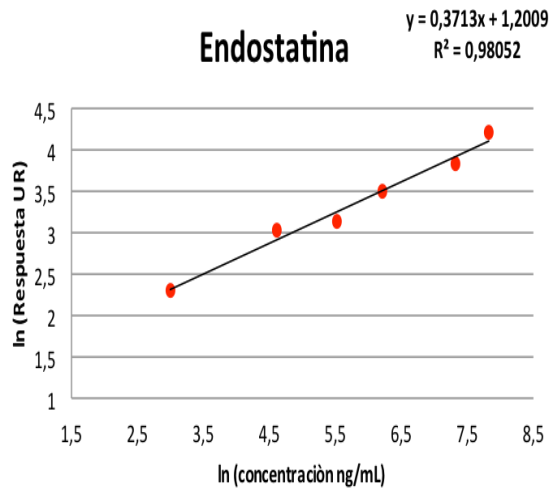
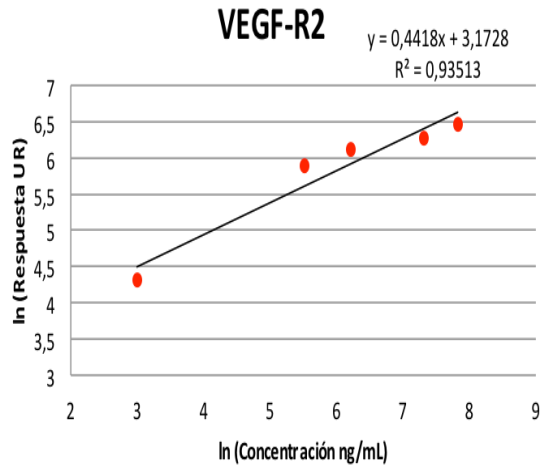
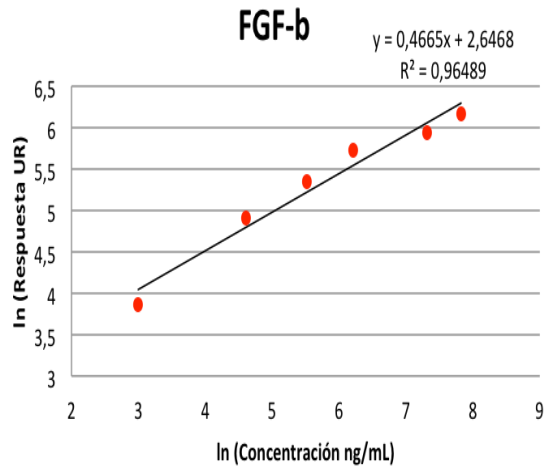
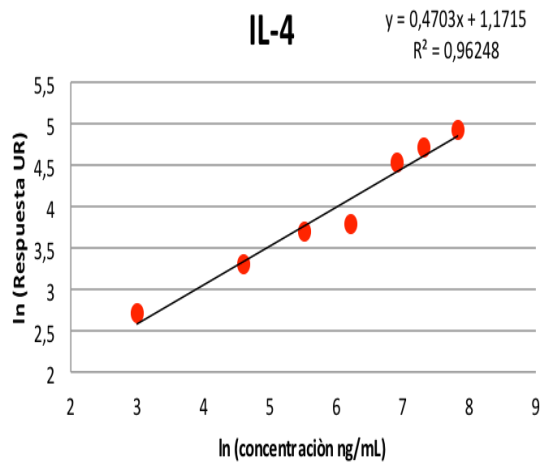


Figura 23. Identificación de la concentración de saturación del anticuerpo anti- Ang-1. Relación de la concentración la proteína patrón y la respuesta en UR e identificación de puntos de saturación (círculo rojo).

La **Figura 24** contiene las curvas de calibración elaboradas para cuantificar cada uno de los factores de interés. Los coeficientes de correlación obtenidos para cada una de ellas, indican la buena aproximación de los valores representados a una línea recta.





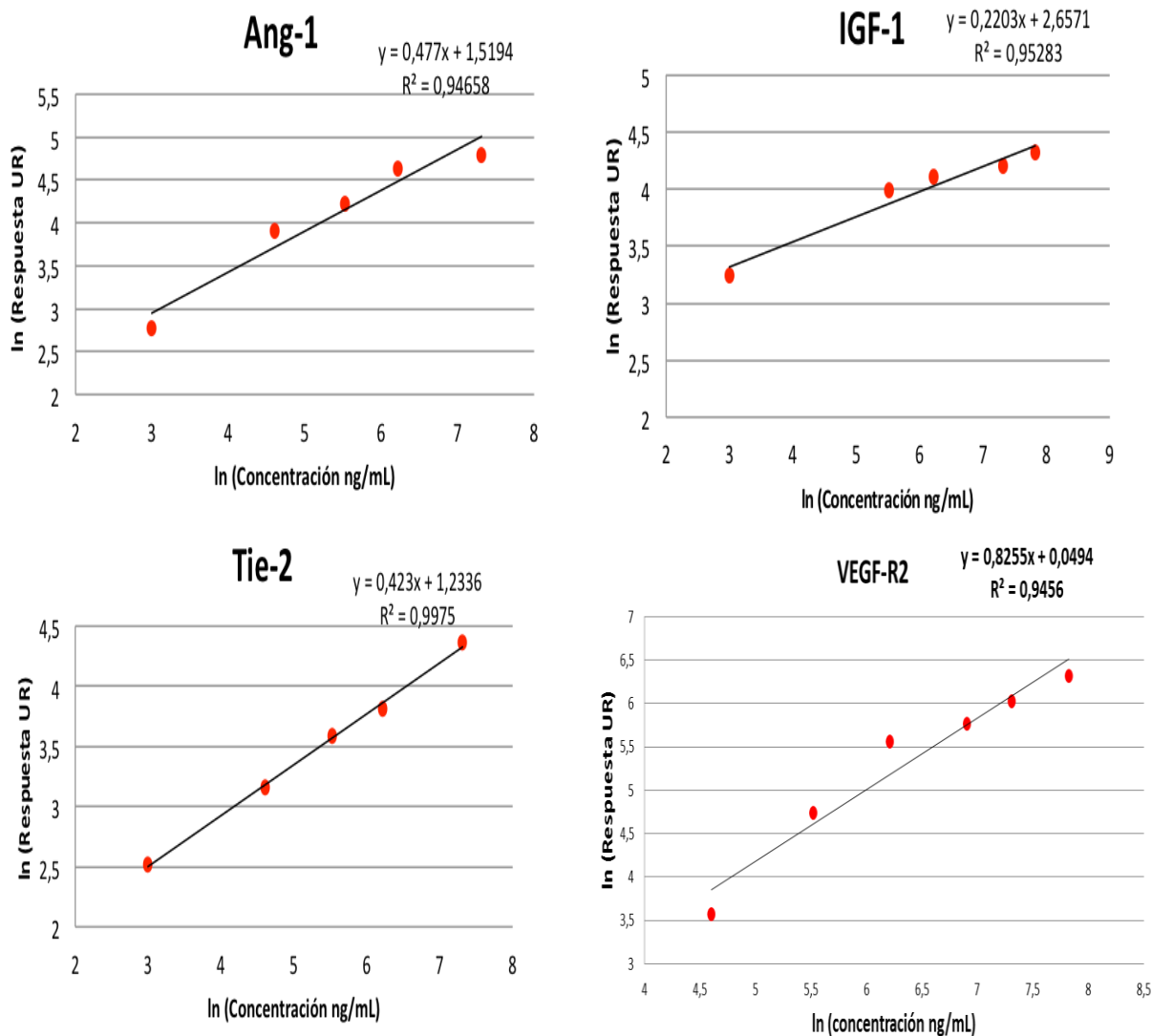
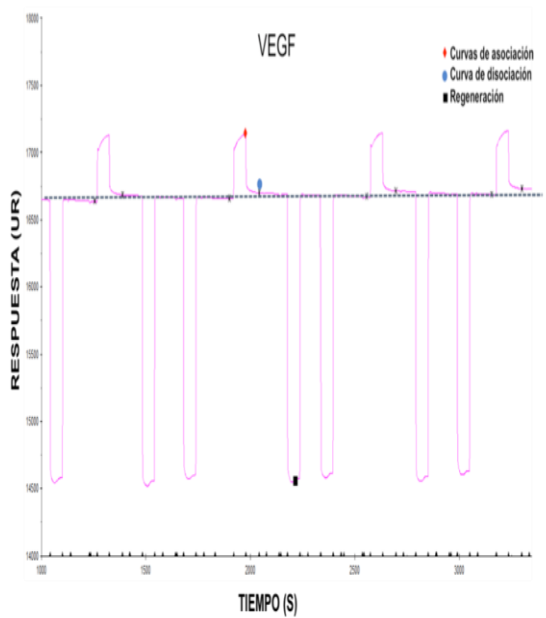
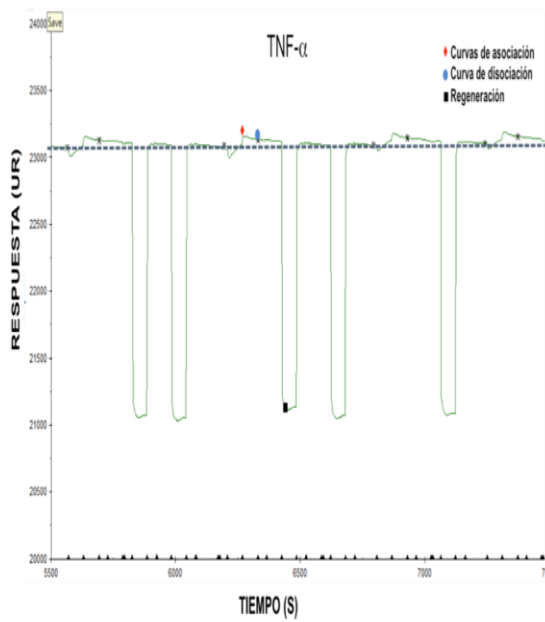
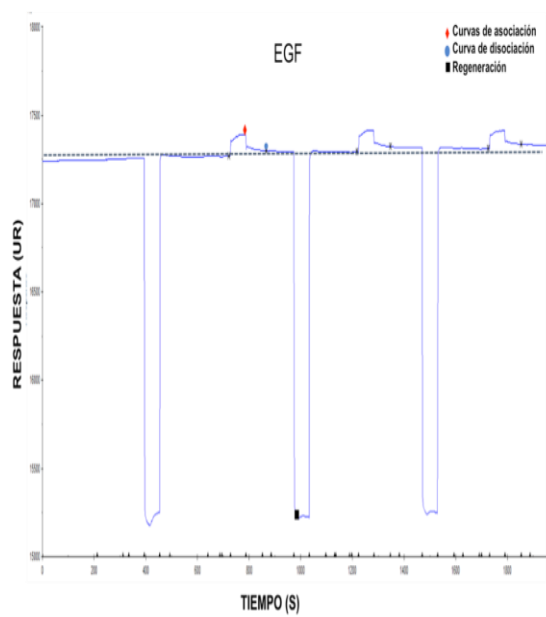
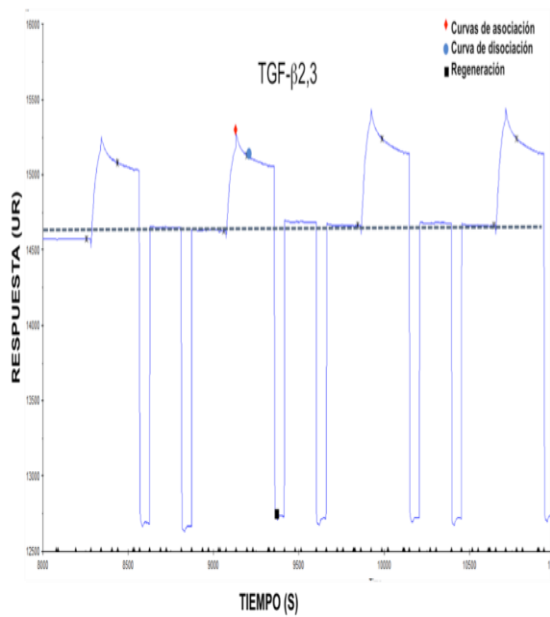
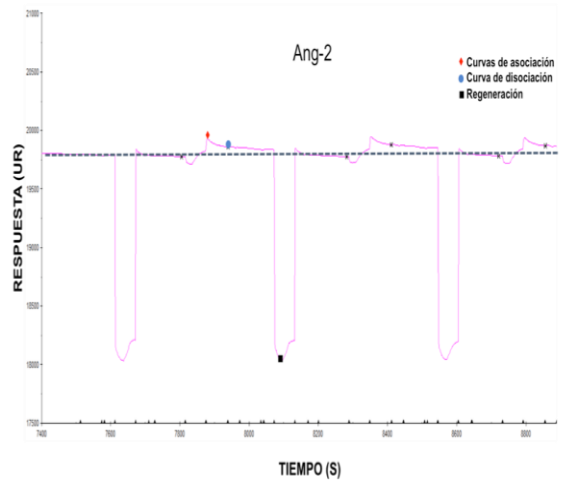
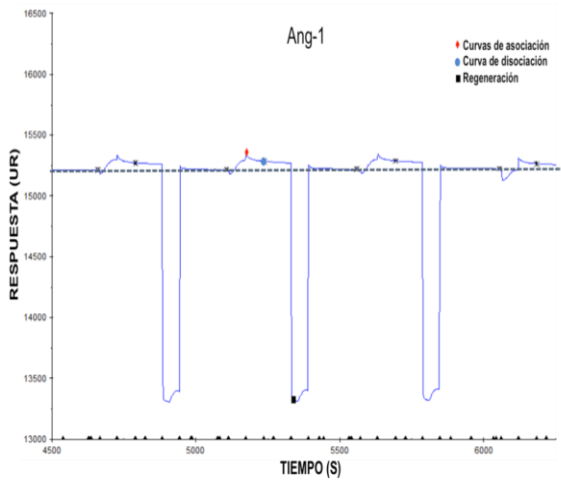
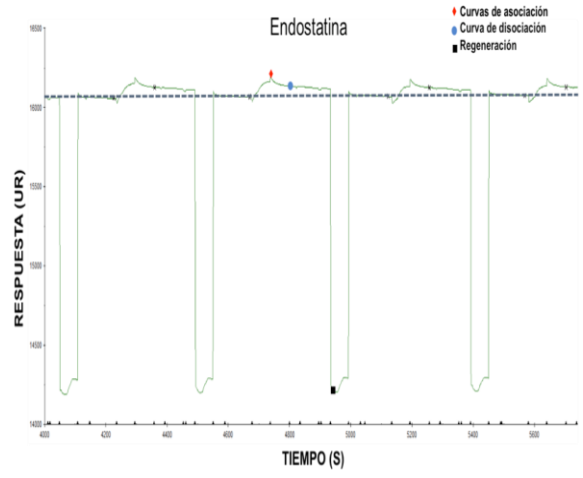
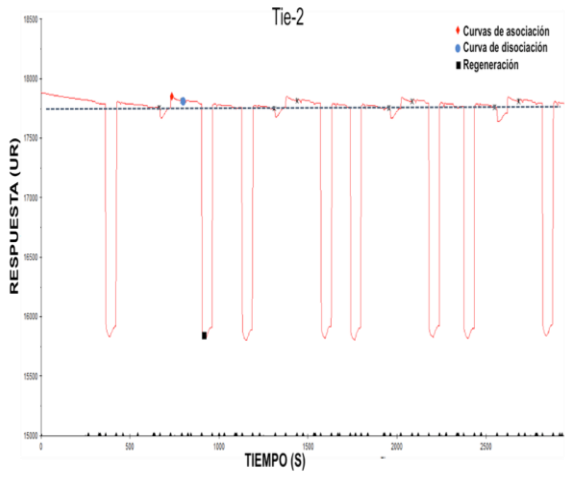
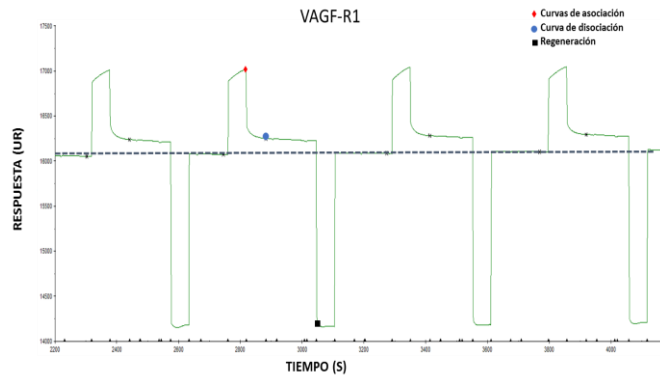


Figura 24. Curva de calibración con monocapas autoensambladas con MUA para 15 factores de crecimiento y citoquinas.

La **Figura 25** muestra las curvas de asociación-disociación-regeneración obtenidas con las monocapas autoensambladas de MUA, en las se observa el aumento de la señal (UR) con respecto a la línea base en respuesta a las uniones específicas de cada analito con su respectivo ligando. En ellas también se puede apreciar la regeneración de los sitios activos de las monocapas autoensambladas, después de inyectar la solución de regeneración.





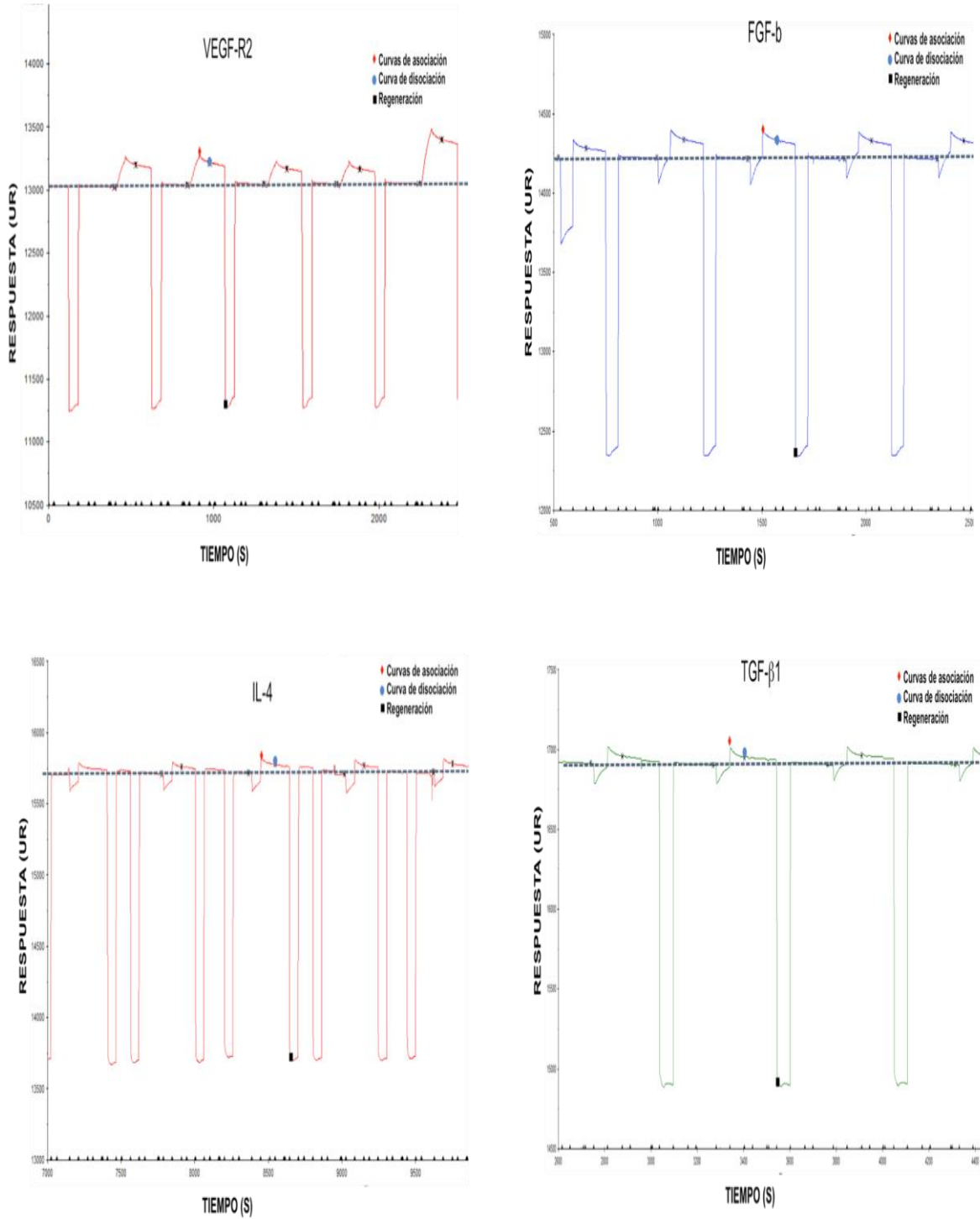


Figura 25. Curvas de asociación y disociación los factores y las citoquinas cuantificadas en las muestras de exudados

En la **Figura 26** se presentan los resultados de la cuantificación de los factores en los medios de cultivo provenientes de la incubación de los tejidos artificiales (MTCA

y UTCA). Los factores con concentraciones mayores a 800 ng/mL fueron graficados en el Panel A; claramente se ve que endostatina, EGF, TGF- β 2 y β 3 se expresan significativamente más en los medios provenientes del cultivo de UTCA que en los de los cultivos de MTCA. Sin embargo, IGF-1 fue mayor en los medios en que se cultivó MTCA. En esta gráfica la concentración de TGF- β 2 y β 3 es la misma, debido a que el anticuerpo usado como ligando reconoce a estos dos factores. Los factores cuya concentración fue menor a 600 ng/mL (Ang-1, Ang-2, Tie-2, bFGF, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, TNF- α , IL-4 y TGF- β 1) fueron graficados en el Panel B. La concentración de Ang-2, Tie-2, VEGF y TGF- β 1 fue mayor en los medios provenientes de los cultivos de UTCA que en los de los cultivos de MTCA. Las concentraciones de bFGF, VEGF-R1, VEGF-R2 y TNF- α , fueron mayores en los medios provenientes de los cultivos de MTCA. Cuando se analizó Ang-1 no hubo diferencia significativa entre las concentraciones medidas en los dos tipos de medio de cultivo, a pesar de que la tendencia fue a que la concentración fuera mayor en el medio de cultivo de UTCA. Tampoco se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de IL-4; sin embargo, se observó la tendencia de la concentración en el medio de cultivo de MTCA a ser mayor que en el medio de cultivo de UTCA.

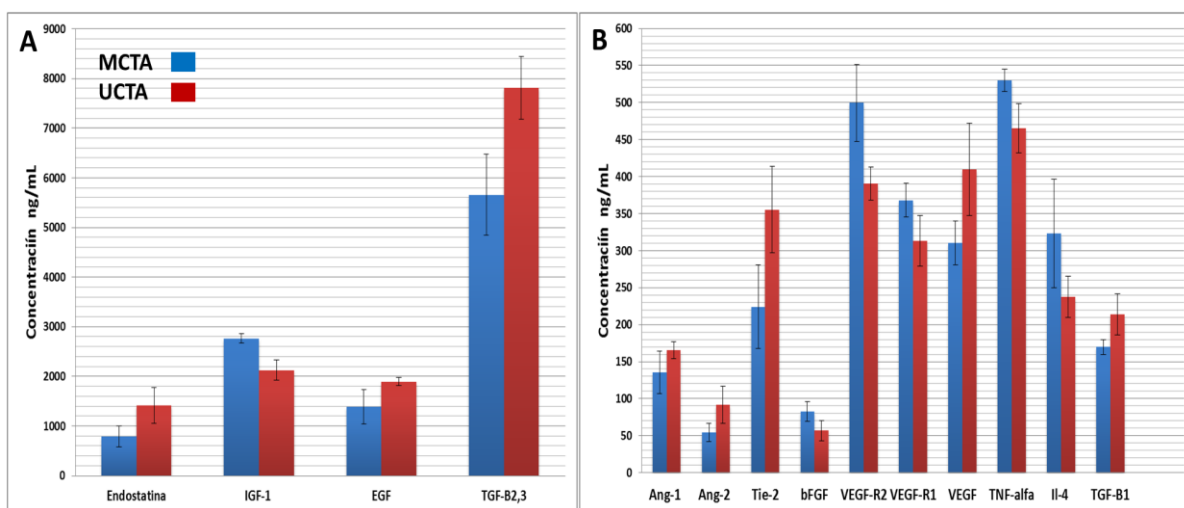


Figura 26. Concentraciones de los factores de crecimiento y citoquinas presentes en los medios de cultivo de MTCA y UTCA.

Las cuantificaciones de los factores en los exudados provenientes de las heridas contralaterales de animales que fueron injertados con MTCA y UTCA, se hicieron en dos tiempos (3 y 6 días). En la **Figura 27** se presentan los resultados de las muestras de los exudados tomadas tres días después de haber realizado la cirugía. En el **Panel A** se encuentran los factores con concentraciones mayores a 25.000 ng/mL; se puede observar que la concentración de endostatina fue mayor en las muestras provenientes de las heridas injertadas con MTCA que en las de las heridas injertadas con UTCA. Igualmente, que no hay diferencias significativas en las concentraciones de EGF, TGF- β 2 y TGF- β 3 encontradas en las muestras.

En el **Panel B** se presentan los factores cuya concentración fue menor a 15000 ng/mL. Las concentraciones de Ang-1, Ang-2, EGF, IGF-1, FGF-b y VEGF-R1 en los exudados de las heridas injertadas con los dos tratamientos, no fueron significativamente diferentes. Por otro lado, las concentraciones de Tie-2, TNF- α , VEGF y VEGF-R2 fueron significativamente mayores en las heridas injertadas con UTCA que en las heridas injertadas con MTCA; contrariamente, las concentraciones de la citoquina antiinflamatoria IL-4 y TGF- β 1 fueron mayores en las heridas tratadas con MTCA.

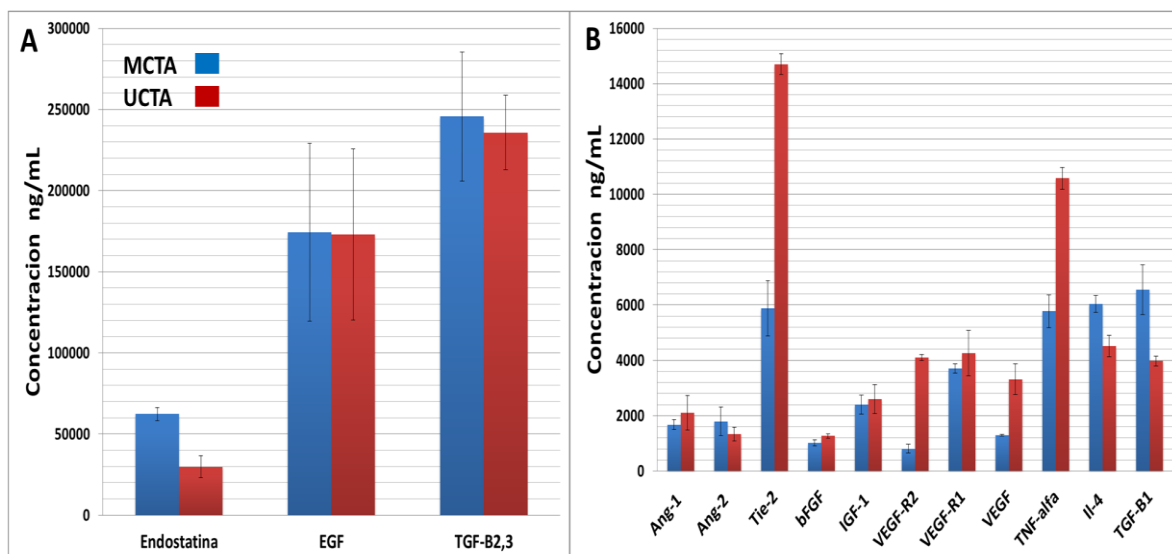


Figura 27. Concentraciones de factores y citoquinas en los exudados tomados de las heridas injertadas con MTCA y UTCA.

En la **Figura 28** se observan las concentraciones de los factores y las citoquinas cuantificadas en las muestras tomadas de las heridas injertadas seis días después de la cirugía. Los factores con concentraciones mayores a 25.000 ng/mL, se muestran en un panel diferente al que presenta los que tuvieron concentraciones menores a 6.000 n/mL. Las concentraciones de EGF, TGF- β 2 y TGF- β 3 no fueron significativamente diferentes a pesar de que los valores promedio de las mismas fueron mayores en los exudados de las heridas injertadas con MTCA que en las injertadas con UTCA (**Panel A**). Aunque las concentraciones de IL-4, TNF- α , VEGF-R1, y bFGF fueron mayores en las heridas injertadas con UTCA, las concentraciones de endostatina, VEGF-R2 y Tie-2 fueron mayores en las heridas tratadas con MTCA. Las concentraciones de los factores restantes (Ag-1, Ang-2, IGF-1, VEGF, EGF y TGF- β 1) no fueron significativamente diferentes.

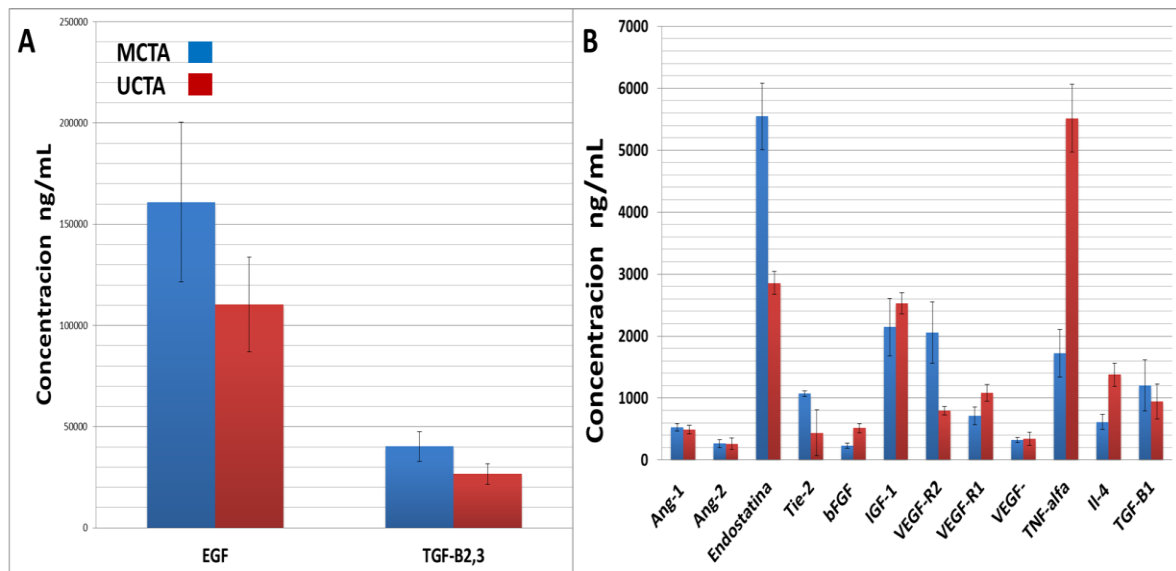


Figura 28. Cuantificación de las concentraciones de factores y citoquinas en los exudados tomados de las heridas injertadas con MTCA o UTCA, en el día sexto.

Finalmente, es importante notar que las concentraciones de la mayoría de los factores cuantificados (endostatina, Ang-1, Ang-2, Tie-2, bFGF, VEGF, VEGF-R1, TNF- α , IL-4 y TGF- β 1) fueron considerablemente menores en el sexto que en el tercer día.

8 Discusión

En este trabajo se propuso evaluar el desempeño de sustitutos artificiales de tejido conectivo desarrollados con soportes de colágeno I con fibras/poros multidireccionales y unidireccionales, en un modelo lagomorfo de herida cutánea de espesor total. Teniendo en cuenta resultados previos del grupo, se buscó determinar si heridas injertadas con tejido elaborado con fibroblastos autólogos de dermis y soportes de colágeno con orientaciones de fibra/poro diferentes cierran con características disimiles.

La hipótesis mencionada se formuló teniendo en cuenta resultados previos del grupo. Una tesis de maestría encontró que heridas de espesor parcial de mucosa oral injertadas con tejido conectivo artificial autólogo elaborado con soportes de colágeno I con fibras con orientación diferente (multidireccional vs unidireccional), cicatrizan diferente. Igualmente, que exudados provenientes de las heridas mucosas injertadas con el tejido conectivo multidireccional contienen concentraciones diferentes de cinco factores que modulan la fase inflamatoria del proceso del cierre de las heridas y estimulan la formación y maduración de nuevo tejido ⁴. Un trabajo paralelo demostró que en los medios de cultivo de tejido conectivo oral multidireccional y unidireccional, las concentraciones de cinco factores de crecimiento y citoquinas que intervienen en la cicatrización son significativamente diferentes³.

Durante su cierre las heridas de mucosa oral y de piel atraviesan etapas similares, así se produzca más tejido cicatrizal en la piel que en la mucosa oral ¹¹. En este contexto, las heridas de piel pueden ofrecer un mejor escenario que el proporcionado por las heridas mucosas para estudiar el efecto de la orientación de las fibras y poros de un tejido artificial en la cicatrización.

Las cuantificaciones llevadas a cabo en los dos trabajos mencionados, se hicieron con un biosensor óptico de plasmones de resonancia (SPR) con chips de oro CM5

útiles para analizar un amplio rango de moléculas^{92,112,113}. La matriz de carboximetildextrano que cubre la superficie de oro de estos chips, aumenta la distancia que hay entre el analito y la señal producida por la asociación del ligando a la superficie; en consecuencia, la sensibilidad del análisis puede disminuir ¹¹³ sobre todo, durante el cuantificación de muestras complejas como medios de cultivo y exudados de heridas ⁸⁸.

Ha sido demostrado que monocapas autoensambladas (SAM) de moléculas orgánicas sobre la superficie del chip de oro, aumentan la sensibilidad de las detecciones analito-ligando porque disminuyen las interacciones inespecíficas ^{88,90}. Las moléculas orgánicas empleadas en esta estrategia poseen una cola con grupos funcionales, especialmente tioles, que pueden unirse covalentemente a la superficie de oro del chip (Camillone, N. *Langmuir* **2004**, 20 (4), 1199–1206); también tienen cabezas polares, generalmente grupos carboxilo e hidroxilo, que se encuentran separadas de los tioles por dominios hidrofóbicos. La organización descrita permite que las cabezas polares sean expuestas facilitando la interacción con el ligando ¹¹⁴. Por esta razón, los tioles de cadena larga con grupos carboxilo o hidroxilo terminales pueden conectar eficientemente la superficie de oro de un chip con un ligando, favoreciendo la especificidad de la interacción ligando-analito y disminuyendo las interacciones inespecíficas^{114–116}. Teniendo en cuenta lo expuesto, en este trabajo se decidió utilizar monocapas autoensambladas (SAM) en la metodología de cuantificación basada en SPR.

Un estudio publicado en 2010, utilizó SAM de MUA y MCH para cuantificar la IL-6 secretada al medio de cultivo por fibroblastos MRC5-CV1 expuestos a LPS ⁸⁸. Con el fin de analizar los exudados de la piel de espesor completo, muestra más compleja que un medio de cultivo, en el presente trabajo tuvimos que estandarizar nuevas condiciones para la reacción de formación de SAM de la mezcla MUA-MHC. En la literatura revisada se encontró que los tiempos de reacción comúnmente usados para el ensamblaje de este tipo de monocapas, están entre 3h y 24h.^{88,117,118} Por lo tanto, se decidió comparar la formación de SAM a 8H y 24H. Con el mayor

tiempo de reacción se obtuvieron mayores valores de UR, lo cual indica la unión de una mayor cantidad de moléculas (MHC; MUA) a la superficie del chip de oro. El incremento en la densidad de alcanotioles, condujo a una mejor organización de las monocapas porque aumentaron los grupos carboxilo o hidroxilo disponibles para interactuar con el ligando^{114,119}; de ahí, que los valores de UR fueron mayores.

En este trabajo se ensayaron dos metodologías para la inmovilización de los anticuerpos, una directa sobre las monocapas y otra indirecta vía proteína G; sin embargo, el método indirecto se desestimó para la inmovilización de los ligandos, cuando los sensogramas resultantes para la inmovilización de anti-Ang-2 y Anti-TNF- α no mostraron un incremento en los valores de UR después de la interacción de la monocapas activadas y la proteína G. Una explicación para este hecho puede ser que el pH usado no favoreció la unión entre esta proteína y los grupos carboxilo e hidroxilos de las SAM, ya que este pH es mayor al punto isoeléctrico de la proteína G.^{120,121} En esta tesis, se usó un pH fijo (5.5) reportado previamente para la inmovilización de proteína G⁸⁸ y no se realizó una evaluación de la incidencia del pH en el ensamblaje de las monocapas.

Los experimentos animales se llevaron a cabo en dos etapas. En la primera, en dos grupos de cinco conejos se compararon heridas injertadas con MTCA o UTCA con heridas control (cierre por segunda intención). Con el método directo se inmovilizaron los anticuerpos en las monocapas autoensambladas de la mezcla MUA-MHC, para detectar y cuantificar cinco factores y citoquinas (Ang-2, EGF, TNF- α , TGF- β 1 y VEGF) en los exudados provenientes de las heridas tratadas y control. Los datos mostraron diferencias significativas en las concentraciones de estas proteínas en las muestras tomadas de las heridas tratadas y sus controles.

Las observaciones clínicas del día 30 después de las cirugías indicaron que en las heridas tratadas con MTCA, UTCA y sus controles hubo contracción del tejido y cicatrización con epitelización completa, a excepción de algunos controles donde la epitelización se vió retardada. Sin embargo, los cortes histológicos de las biopsias tomadas el día 30 de heridas tratadas con MTCA mostraron la formación de tejido

fibroso paralelo al epitelio, más laxo que el formado en las heridas tratadas con UTCA y en los controles. Lo anterior sugiere la formación de tejido cicatrizal más maduro en las heridas injertadas con el tejido multidireccional, que en las heridas injertadas con UTCA y en los controles.

Los resultados histomorfométricos soportan las observaciones histológicas, ya que en general los tejidos injertados con MTCA presentaron mayor porcentaje de tejido con fibras laxas. Estos resultados también mostraron, que el grosor de la dermis del tejido formado en las heridas injertadas con MTCA fue diferente al de las heridas control y más parecido al grosor de la dermis del tejido sano circundante. Resultados similares han sido obtenidos en trabajos anteriores del grupo, cuando en heridas de espesor total en espalda de conejo y de cobayo, se injertaron soportes de colágeno tipo I multidireccionales ^{5,6,122}. Aunque en esos trabajos no se encontraron diferencias significativas entre los grosores de los epitelios de las heridas tratadas con el soporte y las heridas sin tratamiento, en esta tesis se encontró que los epitelios de los tejidos formados en las heridas tratadas con MTCA fueron diferentes a los de las heridas control, probablemente por la acción de las células que contiene el tejido artificial. Esta observación también confirma datos obtenidos por el grupo, en un trabajo donde se comparó el cierre de heridas mucosas tratadas con soportes y con tejido conectivo artificial autólogo.¹

En general, los resultados histomorfométricos (grosor de dermis y epitelio) no mostraron diferencias significativas entre las heridas tratadas con UTMA y sus controles. Lo anterior sugiere que el tejido multidireccional estimula mejor el cierre de la herida, probablemente porque se integra mejor al lecho y a los bordes de las heridas que el UTCA. Los problemas de integración que presentó este último sustituto, aparentemente se deben a la unidireccionalidad de sus poros; esta orientación parece inducir su contracción, lo cual perjudica su interacción con la herida y favorece su dehiscencia.

Aunque las concentraciones de los cinco factores cuantificados en los exudados de las heridas en estos dos grupos de animales mostraron diferencias entre las heridas tratadas y sus controles, por sí solas, no explican la diferencia observada en el comportamiento y eficacia de MTCA y UTCA. En los resultados se ven factores que presentaron concentraciones similares (como el EGF) en los exudados tomados de las heridas comparadas; así como, factores con concentraciones mayores o menores en las heridas tratadas. Sin embargo, se necesita un estudio más amplio que evalúe el efecto directo de los factores estudiados en parámetros asociados con la calidad de la cicatrización para poder concluir sobre el significado clínico de estas observaciones. Además, es importante ampliar el número de factores evaluados con el fin de tener un panorama más amplio de lo que ocurre durante el tratamiento con cada uno de los sustitutos.

Una vez realizadas las cuantificaciones de los exudados provenientes de animales con heridas contralaterales que fueron injertadas (tratamiento) o no (control) con MTCA o UTCA, se procedió a comparar directamente los exudados tomados de heridas contralaterales de piel de espesor total creadas en un último grupo de cinco conejos, injertadas con MTCA y UTCA. En este grupo se tomaron muestras de los exudados, tres y seis días después de las cirugías y se cuantificaron 15 factores que modulan el cierre de una herida, los cinco mencionados y 10 adicionales. Estos 15 factores, también fueron cuantificados en los medios de cultivo donde se incubaron los tejidos artificiales antes de ser injertados.

Durante la elaboración de los chips sensores para la cuantificación de los 15 factores en los exudados provenientes de las heridas tratadas (MTCA vs UTCA), se presentaron problemas con la inmovilización de los anticuerpos en las monocapas autoensambladas de la mezcla MUA-MHC. El más crítico de ellos fue que el registro de las señales detectadas inducidas por la interacción ligando-analito, siempre estuvo por encima del límite superior del rango de la escala de medición establecida. Después de repetir tres veces los experimentos y encontrar los mismos resultados, se decidió ensayar con chips cubiertos por monocapas de MUA elaboradas con la

misma concentración y tiempo de reacción empleados para la formación de las monocapas de la mezcla MUA-MHC. Esta decisión se tomó, porque SAM de MUA han sido empleadas exitosamente en la cuantificación de TNF- α en suero humano, que es una muestra compleja ⁹⁰.

Para verificar la factibilidad de esta nueva estrategia, inicialmente se compararon cuantificaciones de los cinco factores evaluados en los exudados de los conejos en que se compararon heridas injertadas con MTCA o UTCA y sus controles, hechas con las SAM de la mezcla MUA-MHC y las SAM de MUA. Con los dos tipos de monocapas hubo inmovilización, sin embargo, el intervalo de respuesta fue más amplio en las curvas de calibración obtenidas con las monocapas autoensambladas de MUA. Por esta razón, se decidió utilizar SAM de MUA para hacer las cuantificaciones de los 15 factores en los medios de cultivo y en los exudados provenientes de las heridas contralaterales tratadas con MTCA o UTCA.

En los medios de los cultivos de MTCA y UTCA, las concentraciones de la mayoría de los factores y citoquinas resultaron significativamente diferentes. Estos resultados coinciden con datos previos del grupo, que demuestran que la secreción de algunos factores importantes en el cierre de heridas es diferente en tejidos elaborados con fibroblastos orales y soportes de colágeno I con diferente orientación de poros y fibras ³. De hecho, al igual que en el trabajo citado, en esta tesis se encontró que la concentración de EGF, Ang-2, TGF- β 1 y VEGF fue mayor en los medios provenientes del cultivo de UTCA que en los medios de cultivo de MTCA. Además de los factores anteriores, en esta tesis se encontró que la concentración de Tie-2, endostatina y TGF- β 1 y β 3 es mayor en los medios del tejido artificial unidireccional que en el multidireccional. Igualmente, que la concentración de bFGF, VEGF-R1, VEGF-R2 y TNF α es mayor en los medios de cultivo de MTCA que en los medios de cultivo de UTCA.

El que los tejidos artificiales que se injertan secreten diferencialmente factores en función de la orientación multidireccional o unidireccional de los poros de los

soportes de colágeno I que se utilizan para su elaboración, sugiere que estos pueden promover desenlaces de la cicatrización diferentes. Esta observación es importante ya que en este estudio el único parámetro de la microestructura que se cambió fue la direccionalidad de los poros/fibras; los otros parámetros microestructurales importantes, porosidad y tamaño de poro, se mantuvieron constantes.

Las diferencias en concentración de los factores presentes en los exudados de las heridas injertadas con MTCA o UTCA y sus controles, así como, en las heridas contralaterales injertadas con MTCA y UTCA, indican que la presencia de uno u otro afecta la concentración de muchos de los factores estudiados en este trabajo y en consecuencia, cambia el microambiente químico de las heridas. El conjunto de datos sugiere que la variación en la concentración de factores que afectan procesos tan importantes como quimiotaxis, inflamación, proliferación y diferenciación de los fibroblastos, recambio de la matriz extracelular y angiogénesis es suficiente para limitar la reparación con cicatriz y contractura y favorecer la regeneración de tejidos perdidos; aún, en escenarios que se caracterizan por cicatrizar con fibrosis como los proporcionados por la piel de los conejos.

En las muestras de exudados obtenidas tres días después de la cirugía, se encontró que la concentración de TNF- α fue casi el doble en las heridas injertadas con UTCA que en las heridas injertadas con MTCA. Además de ser proinflamatorio, el TNF- α estimula la diferenciación de monocitos, la quimiotaxis de células endoteliales y la expresión de factores antigénicos ^{24,26}. Esto explica porque en los exudados de las heridas injertadas con UTCA, la concentración de VEGF fue mayor que en los exudados de las heridas injertadas con MTCA. Otro hallazgo importante fue que la concentración de la citoquina antiinflamatoria IL-4 fue mayor en los exudados de las heridas tratadas con MTCA que en el de las tratadas con UTCA. La IL-4 también estimula la proliferación celular y la producción de matriz extracelular ²⁷; por eso, es probable que al encontrarse en mayor concentración en las heridas tratadas con MTCA, incrementa el recambio del tejido artificial por nuevo tejido mejorando la

calidad del cierre. En conjunto, los datos mencionados sugieren que el tejido unidireccional es más proinflamatorio que el tejido multidireccional y que la regulación diferencial del proceso inflamatorio en esta primera etapa del cierre de las heridas, contribuye a las diferencias en la cicatrización observadas.

En los exudados muestreados seis días después de la cirugía, la concentración de TNF- α siguió siendo dos veces mayor en las heridas injertadas con UTCA que en las heridas injertadas con MTCA. Aunque el TNF- α es importante para iniciar la fase de proliferación y estimular la angiogénesis, su presencia continua en la herida puede retardar la iniciación de la fase de remodelación e incluso se ha relacionado con la formación de úlceras²¹. Este hecho, puede explicar la falta de integración de UTCA al lecho de la herida y su aparente bajo recambio.

Es importante resaltar que en las muestras obtenidas en el tercer y sexto día, la concentración de la endostatina fue significativamente mayor en los exudados de las heridas injertadas con MTCA que en las injertadas con UTCA; aunque este factor es un angiostático, se ha reportado que su aplicación en heridas cutáneas en ratones resulta en formación de tejidos con fibras de colágeno más laxas que las observadas en las heridas donde no se aplicó la proteína³⁵.

Durante la comparación clínica e histológica de las heridas injertadas con MTCA con las heridas injertadas con UTCA, se encontró que el tejido multidireccional induce mejor cicatrización que el unidireccional. Sin embargo, en todas las heridas tratadas y control se vio la formación de tejido fibrótico con contractura y con características propias del tejido cicatrizal. Esto se debe al tipo de modelo animal con el que se trabajó. Se ha reportado que las especies de roedores y lagomorfos, cierran sus heridas de piel principalmente por contracción^{101,102,104}. Adicionalmente, su piel es suelta por lo que se puede deslizar y contraer libremente¹⁰². Estas características de la piel de los conejos, hacen que el modelo sea menos sensible a los efectos de los tratamientos dirigidos a disminuir la contracción y mejorar la cicatrización de heridas de espesor parcial de tamaños grandes. Sin embargo,

permiten desafiar fuertemente propiedades de los sustitutos como la integración y capacidad de promover regeneración o acelerar el proceso reparativo en las heridas

123 .

Los resultados histológicos mostraron una mayor cantidad de tejido laxo aleatorio y paralelo laxo en las biopsias tomadas de las heridas injertadas con MTCA que en las heridas injertadas con UTCA, en donde predominó la formación de tejido denso con fibras paralelas al epitelio. Estas observaciones fueron confirmadas por los resultados histomorfométricos, que muestran diferencias significativas en el grosor de la dermis y del epitelio entre las heridas injertadas con cada tipo de tratamiento, siendo los tejidos provenientes de las zonas injertadas con MTCA los más parecidos al tejido sano circundante.

9 Conclusiones

En este trabajo se estandarizó una metodología basada en SPR con monocapas auto-ensambladas, para la detección y cuantificación de factores solubles en medios de cultivos de tejidos artificiales autólogos y en exudados de heridas cutáneas de espesor total injertadas o no con MTCA o UTCA, en un modelo lagomorfo. El procedimiento establecido detectó específicamente las interacciones ligando-analito evaluadas, en estas muestras biológicas complejas. La sensibilidad de las determinaciones permitió detectar diferencias en la concentración de factores que modulan la cicatrización, que ayudan a explicar algunas de las observaciones clínicas, histológicas e histomorfométricas realizadas. A pesar de que se ensayaron dos métodos de inmovilización, directo e indirecto vía proteína G, este último no sirvió para detectar interacciones ligando-analito debido a la pobre absorción de la proteína G en las monocapas autoensambladas de las moléculas orgánicas empleadas. Nuestros datos indican que la inmovilización directa de anticuerpos en SAM, es una buena estrategia para detectar y cuantificar factores en medios de cultivo y exudados de heridas.

A pesar de la cicatrización fibrosa de las heridas de piel característica del modelo lagomorfo, fue posible evaluar el desempeño como injerto de dermis autóloga artificial multi y unidireccional en heridas de espesor total de 4 cm². El conjunto de resultados obtenidos soporta la hipótesis de que el tejido conectivo autólogo actúa como un sistema de entrega de señales bioactivas cuyo perfil de concentraciones cambia cuando las células se cultivan en soportes con diferente orientación de fibras y poros. Las observaciones clínicas, histológicas, histomorfométricas y las cuantificaciones de factores que modulan la cicatrización indican que los injertos elaborados con soportes multidireccionales mejoran el cierre de heridas de piel de espesor total en comparación al cierre de heridas injertadas con tejidos unidireccionales o dejadas cerrar por segunda intención.

10 Recomendaciones.

Aunque el modelo lagomorfo permitió ver diferencias en el desempeño de MTCA y UTCA, sería interesante realizar los experimentos en un modelo animal donde el proceso de reparación se base mayormente en la formación de tejido de granulación que en la contracción o en modelos de heridas crónicas.

Debido a que la metodología de cuantificación basada en SPR estandarizada en este trabajo permite estudiar perfiles de concentración de factores solubles en exudados de heridas, se puede implementar su uso para estudiar el estado de heridas crónicas antes y después de aplicar algún tratamiento. Esto puede ser importante para nuestro grupo, durante los estudios clínicos que se están planificando para evaluar el primer dispositivo médico a base de colágeno I con registro sanitario del INVIMA, desarrollado por el grupo.

11 Bibliografía

1. Espinosa, Lady, Sosnik, A. & Fontanilla, M. R. Development and Preclinical Evaluation of Acellular Collagen Scaffolding and Autologous Artificial Connective Tissue in the Regeneration of Oral Mucosa Wounds. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1667–1679 (2010).
2. Fontanilla, M. R. & Espinosa, L. G. In Vitro and In Vivo Assessment of Oral Autologous Artificial Connective Tissue Characteristics That Influence Its Performance as a Graft. *Tissue Eng. Part A* **18**, 1857–1866 (2012).
3. Bustos, R. H., Suesca, E., Millán, D., González, J. M. & Fontanilla, M. R. Real-Time Quantification of Proteins Secreted by Artificial Connective Tissue Made from Uni- Or Multidirectional Collagen I Scaffolds and Oral Mucosa Fibroblasts. *Anal. Chem.* **86**, 2421–2428 (2014).
4. Herrera, A. del P. E. Evaluación del proceso de reparación en heridas de mucosa oral de conejos injertadas con tejido conjuntivo artificial autólogo elaborado con soportes de colágeno unidireccionales y multidireccionales. (Universidad Nacional de Colombia, 2013).
5. Millán, D. *et al.* Preclinical evaluation of collagen type I scaffolds, including gelatin-collagen microparticles and loaded with a hydroglycolic Calendula officinalis extract in a lagomorph model of full-thickness skin wound. *Drug Deliv. Transl. Res.* **6**, 57–66 (2016).
6. Cifuentes, L. R. G. Evaluación del desempeño preclínico de soportes de Colágeno tipo I asociados con extractos vegetales de Aloe vera en un modelo animal de Cavia porcellus. Liliana. (Universidad Nacional de Colombia, 2016).
7. Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. & Schenke-Layland, K. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Clin. Plast. Surg.* **39**, 33–58 (2012).
8. Lorenti, A. Wound Healing: From Epidermis Culture to Tissue Engineering. *CellBio* **1**, 17–29 (2012).
9. Varkey, M., Ding, J. & Tredget, E. Advances in Skin Substitutes—Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing. *J. Funct. Biomater.* **6**, 547–563 (2015).
10. Schulz III, J. T., Tompkins, R. G. & Burke, J. F. Artificial Skin. *Annu. Rev. Med.* **51**, 231–244 (2000).
11. Lee, S. H., Jeong, S. K. & Ahn, S. K. An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Med. J.* **47**, 293 (2006).

12. Poulson, N. D. & Lechler, T. in 199–232 (2012). doi:10.1016/B978-0-12-394306-4.00012-5
13. Halata, Z., Grim, M. & Bauman, K. I. Friedrich Sigmund Merkel and his ?Merkel cell?, morphology, development, and physiology: Review and new results. *Anat. Rec.* **271A**, 225–239 (2003).
14. Guo, S. & DiPietro, L. A. Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* **89**, 219–229 (2010).
15. Enoch, S. & Leaper, D. J. Basic science of wound healing. *Surg.* **23**, 37–42 (2005).
16. Fontanilla, M. R., Suesca, E. & Casadiegos, S. in *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados* 219–251 (Imprensa da Universidade de Coimbra). doi:10.14195/978-989-26-0881-5_6
17. Yannas, I. V., Kwan, M. D. & Longaker, M. T. Early Fetal Healing as a Model for Adult Organ Regeneration. *Tissue Eng.* **13**, 1789–1798 (2007).
18. Yannas, I. V., Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M. & Murphy, G. F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 933–7 (1989).
19. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
20. Epstein, F. H., Singer, A. J. & Clark, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738–746 (1999).
21. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
22. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3666–70 (1975).
23. Mast, B. A. & Schultz, G. S. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen.* **4**, 411–420 (1996).
24. Werner, S. & Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* **83**, 835–70 (2003).
25. Kapoor, M., Nomiya, T., Bruemmer, D., Kojima, F. & Crofford, L. J. Growth factors and cytokines: Emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis. *Curr. Anaesth. Crit. Care* **17**, 13–20 (2006).
26. Mooney, D. P., O'Reilly, M. & Gamelli, R. L. Tumor necrosis factor and wound

- healing. *Ann. Surg.* **211**, 124–9 (1990).
27. Salmon-Ehr, V. *et al.* Implication of interleukin-4 in wound healing. *Lab. Invest.* **80**, 1337–43 (2000).
 28. Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A. & LeRoux, M. A. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 142–149 (2012).
 29. Borena, B. M. *et al.* Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 1–23 (2015).
 30. Bao, P. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.* **153**, 347–58 (2009).
 31. Davis, S. *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161–9 (1996).
 32. Dumont, D. J. *et al.* Vascularization of the mouse embryo: A study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev. Dyn.* **203**, 80–92 (1995).
 33. Kämpfer, H., Pfeilschifter, J. & Frank, S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab. Invest.* **81**, 361–73 (2001).
 34. Gale, N. W. & Yancopoulos, G. D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* **13**, 1055–66 (1999).
 35. Bloch, W. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J.* (2000). doi:10.1096/fj.00-0490fje
 36. Clark, R. A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am. J. Med. Sci.* **306**, 42–8 (1993).
 37. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–6 (1993).
 38. Yannas, I. V. & Burke, J. F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 65–81 (1980).
 39. Truong, A.-T. N., Kowal-Vern, A., Latenser, B. A., Wiley, D. E. & Walter, R. J. Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *J. Burns Wounds* **4**, e4 (2005).
 40. Nathoo, R., Howe, N. & Cohen, G. Skin substitutes: an overview of the key players in wound management. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **7**, 44–8 (2014).
 41. Shevchenko, R. V., James, S. L. & James, S. E. A review of tissue-engineered

- skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J. R. Soc. Interface* **7**, 229–258 (2010).
42. Varkey, M., Ding, J. & Tredget, E. E. Advances in Skin Substitutes-Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing. *J. Funct. Biomater.* **6**, 547–63 (2015).
 43. Katari, R., Peloso, A. & Orlando, G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Semantic Considerations for an Evolving Paradigm. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, (2015).
 44. Zhou, H. *et al.* The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* (2017). doi:10.1002/jbm.a.35996
 45. Williamson, J. S., Snelling, C. F., Clugston, P., Macdonald, I. B. & Germann, E. Cultured epithelial autograft: five years of clinical experience with twenty-eight patients. *J. Trauma* **39**, 309–19 (1995).
 46. Atiyeh, B. S. & Costagliola, M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns* **33**, 405–413 (2007).
 47. Rowan, M. P. *et al.* Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit. Care* **19**, 243 (2015).
 48. Tavakoli, M., Sayed, M. S., Murdock, J., Portaliou, D. & Lee, W. Safety and efficacy of a growth factor and cytokine-containing topical product in wound healing and incision scar management after upper eyelid blepharoplasty: a prospective split-face study. *Clin. Ophthalmol.* **Volume 10**, 1223–1228 (2016).
 49. Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O. & Tomic-Canic, M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **22**, 569–578 (2014).
 50. Sivashankari, P. R. & Prabakaran, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**, 1382–1389 (2016).
 51. Xie, Z. *et al.* Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomater.* **9**, 9351–9359 (2013).
 52. Williams, D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med. Device Technol.* **14**, 10–3 (2003).
 53. Williams, D. F. Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, 89 (2015).
 54. Williams, D. Metastable biocompatibility: a new approach. *Med. Device Technol.* **18**, 8, 10–1 (2007).
 55. Zeltinger, J., Sherwood, J. K., Graham, D. A., Müller, R. & Griffith, L. G. Effect

- of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Eng.* **7**, 557–572 (2001).
56. Walles, T., Herden, T., Haverich, A. & Mertsching, H. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials* **24**, 1233–9 (2003).
 57. Harley, B. A. C. *et al.* Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions. *Biophys. J.* **95**, 4013–4024 (2008).
 58. Wray, L. S. & Orwin, E. J. Recreating the Microenvironment of the Native Cornea for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1463–1472 (2009).
 59. Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331–43 (1975).
 60. Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5665–5668 (1979).
 61. O'Connor, N., Mulliken, J., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. Grafting of Burns With Cultured Epithelium Prepared From Autologous Epidermal Cells. *Lancet* **317**, 75–78 (1981).
 62. Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O. & Green, H. Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *N. Engl. J. Med.* **311**, 448–451 (1984).
 63. FDA. Epicel (cultured epidermal autografts). (2016). Available at: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm538540.htm>.
 64. Migliano, E., Bellei, B., Govoni, F., Bucher, S. & Picardo, M. Fat and epidermal cell suspension grafting: a new advanced one-step skin regeneration surgical technique. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **33**, 23 (2014).
 65. O'Neill, T. B., Rawlins, J., Rea, S. & Wood, F. Treatment of a large congenital melanocytic nevus with dermabrasion and autologous cell suspension (ReCELL®): A case report. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **64**, 1672–1676 (2011).
 66. Yannas, I. V, Burke, J. F., Orgill, D. P. & Skrabut, E. M. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science* **215**, 174–6 (1982).
 67. US food and drugs administration. FDA approves Integra Omnigraft Dermal Regeneration Matrix to treat diabetic foot ulcers. *US food and drugs*

- administration (2016). Available at: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm480564.htm>.
68. Gholami, G. A., Saberi, A., Kadkhodazadeh, M., Amid, R. & Karami, D. Comparison of the clinical outcomes of connective tissue and acellular dermal matrix in combination with double papillary flap for root coverage: A 6-month trial. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. **10**, 506–13 (2013).
 69. Marston, W. A., Hanft, J., Norwood, P. & Pollak, R. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* **26**, 1701–5 (2003).
 70. Lam, P. K. *et al.* Development and evaluation of a new composite Laserskin graft. *J. Trauma* **47**, 918–22 (1999).
 71. Price, R. D., Das-Gupta, V., Leigh, I. M. & Navsaria, H. A. A Comparison of Tissue-Engineered Hyaluronic Acid Dermal Matrices in a Human Wound Model. *Tissue Eng.* **12**, 2985–2995 (2006).
 72. Curran, M. P. & Plosker, G. L. Bilayered bioengineered skin substitute (Apligraf): a review of its use in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *BioDrugs* **16**, 439–55 (2002).
 73. Griffiths, M., Ojeh, N., Livingstone, R., Price, R. & Navsaria, H. Survival of Apligraf in Acute Human Wounds. *Tissue Eng.* **10**, 1180–1195 (2004).
 74. US food and drugs administration. Apligraf : Support & Resources : Regulatory Documentation. *Apligraf.com* (2017). Available at: http://www.apligraf.com/professional/support_and_resources/regulatoryDocumentation.html.
 75. Santema, T. B., Poyck, P. P. & Ubbink, D. T. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. Santema, T. B.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2014). doi:10.1002/14651858.CD011255
 76. De Bie, C. Genzyme: 15 years of cell and gene therapy research. *Regen. Med.* **2**, 95–97 (2007).
 77. Ortega-Zilic, N. *et al.* EpiDex® Swiss Field Trial 2004–2008. *Dermatology* **221**, 365–372 (2010).
 78. Vaillant, L. [Treatment of venous leg ulcers with Epibase. A prospective study. Preliminary results]. *Ann. Dermatol. Venereol.* **129**, 1245–6 (2002).
 79. Zweifel, C. J. *et al.* Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for burn wound closure. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **61**, e1–e4 (2008).
 80. Wood, F. M., Kolybaba, M. L. & Allen, P. The use of cultured epithelial

autograft in the treatment of major burn wounds: Eleven years of clinical experience. *Burns* **32**, 538–544 (2006).

81. Pham, C., Greenwood, J., Cleland, H., Woodruff, P. & Maddern, G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review. *Burns* **33**, 946–957 (2007).
82. Mirza, A., Gogna, R., Kumaran, M., Malik, M. & Martin-Ucar, A. The surgical management of intercostal lung herniation using bioprosthesis. *J. Surg. Case Reports* **2011**, 6–6 (2011).
83. Administration, U. food and drugs. OASIS® Wound Matrix. (2016). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf6/K061711.pdf.
84. Eo, S., Kim, Y. & Cho, S. Vacuum-assisted closure improves the incorporation of artificial dermis in soft tissue defects: Terudermis® and Pelnac®. *Int. Wound J.* **8**, 261–267 (2011).
85. Giuggioli, D. *et al.* Autologous skin grafting in the treatment of severe scleroderma cutaneous ulcers: a case report. *Rheumatology (Oxford)*. **42**, 694–6 (2003).
86. Gómez, D. R. BIOSENSORES ÓPTICOS DE ALTA SENSIBILIDAD BASADOS EN TÉCNICAS DE MODULACIÓN PLASMÓNICA. (Universidad de Santiago de Compostela, 2012).
87. Nguyen, H., Park, J., Kang, S. & Kim, M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **15**, 10481–10510 (2015).
88. Chou, T.-H., Chuang, C.-Y. & Wu, C.-M. Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors. *Cytokine* **51**, 107–111 (2010).
89. Lea, S. M. *et al.* Determination of the affinity and kinetic constants for the interaction between the human virus echovirus 11 and its cellular receptor, CD55. *J. Biol. Chem.* **273**, 30443–7 (1998).
90. Martinez-Perdiguero, J., Retolaza, A., Bujanda, L. & Merino, S. Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF α biomarker in human serum. *Talanta* **119**, 492–497 (2014).
91. Battaglia, T. M. *et al.* Quantification of Cytokines Involved in Wound Healing Using Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **77**, 7016–7023 (2005).
92. Yang, C.-Y. *et al.* Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR. *Lab Chip* **5**, 1017 (2005).
93. Ramakrishnan, N. R., Tau Chuan, L., Beng Ti, T. & Arbakariya, B. A simple method for quantification of interferon- γ through surface plasmon

resonance technique. *African J. Biotechnol.* **9**, 1680–1689 (2010).

94. Johnsson, B., Löfås, S. & Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **198**, 268–277 (1991).
95. Briand, E. *et al.* Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosens. Bioelectron.* **22**, 440–448 (2006).
96. Yao, F., Zhang, R., Tian, H. & Li, X. Studies on the Interactions of Copper and Zinc Ions with β -Amyloid Peptides by a Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 11832–11843 (2012).
97. Ansell, D. M., Holden, K. A. & Hardman, M. J. Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Exp. Dermatol.* **21**, 581–585 (2012).
98. Shrimanker, M., Patel, N., Modi, H. & Dave, R. A Review: Screening Models for Wound Healing Activity in Animals. *Am. J. PharmTech Res.* **3**, 237–251 (2013).
99. Kim, D. J., Mustoe, T. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing in aging small mammals: a systematic review. *Wound Repair Regen.* **23**, 318–339 (2015).
100. Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. & Gurtner, G. C. Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 1–8 (2011).
101. Galiano, R. D., Michaels, V. J., Dobryansky, M., Levine, J. P. & Gurtner, G. C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* **12**, 485–492 (2004).
102. Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J. Cell Commun. Signal.* **10**, 103–120 (2016).
103. Mangelsdorf, S., Vergou, T., Sterry, W., Lademann, J. & Patzelt, A. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. *Ski. Res. Technol.* **20**, 147–154 (2014).
104. Snowden, J. M., Kennedy, D. F. & Cliff, W. J. Wound contraction. The effects of scab formation and the nature of the wound bed. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **60**, 73–82 (1982).
105. Davidson, J. M., Yu, F. & Opalenik, S. R. Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models. *Adv. Wound Care* **2**, 142–148 (2013).
106. Chien, S. & Wilhelmi, B. J. A Simplified Technique for Producing an Ischemic Wound Model. *J. Vis. Exp.* (2012). doi:10.3791/3341

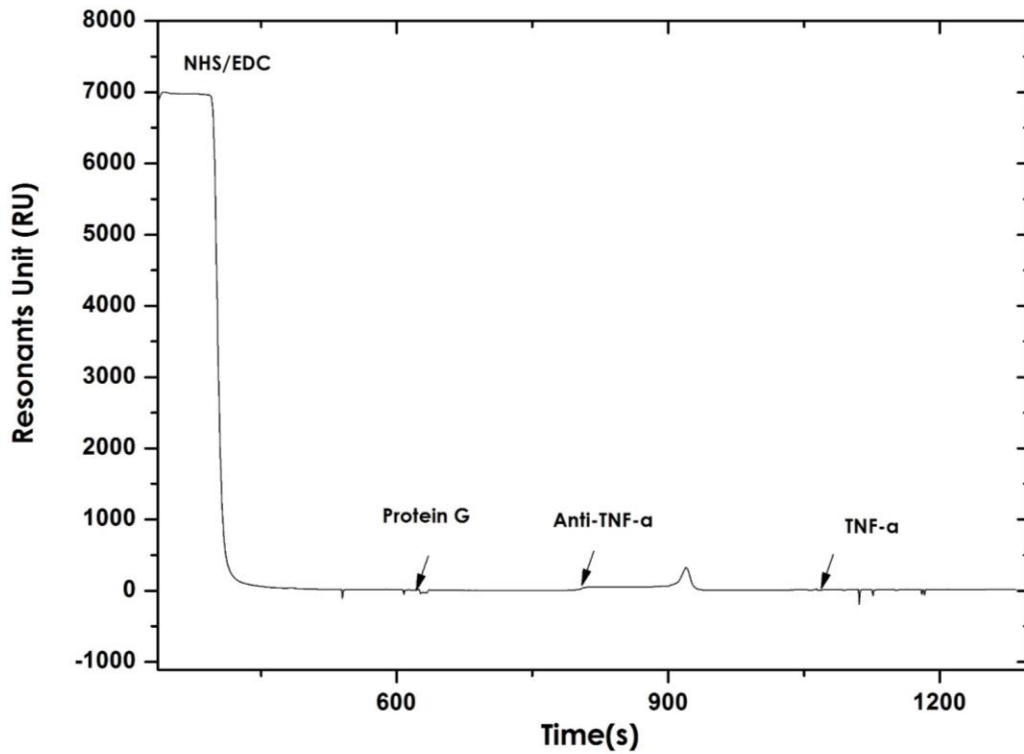
107. Milburn, M. L. *et al.* Acellular Dermal Matrix Compared with Synthetic Implant Material for Repair of Ventral Hernia in the Setting of Peri-Operative Staphylococcus aureus Implant Contamination: A Rabbit Model. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **9**, 433–442 (2008).
108. Ananta, M., Brown, R. A. & Mudera, V. A Rapid Fabricated Living Dermal Equivalent for Skin Tissue Engineering: An In Vivo Evaluation in an Acute Wound Model. *Tissue Eng. Part A* **18**, 353–361 (2012).
109. Suesca, E., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., de Sousa, H. C. & Fontanilla, M. R. Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 333–341 (2017).
110. Suesca, E. Optimización de la Obtención de Soportes de Colágeno y Estudio del Efecto de su Microestructura en el Desarrollo de Mucosa Oral Artificial. (Universidad nacional de Colombia, 2013).
111. Szpaderska, A. M., Zuckerman, J. D. & DiPietro, L. A. Differential Injury Responses in Oral Mucosal and Cutaneous Wounds. *J. Dent. Res.* **82**, 621–626 (2003).
112. Helmerhorst, E., Chandler, D. J., Matt, N. & Mamotte, C. D. Real-time and Label-free Bio-sensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective. *Clin. Biochem. Rev.* **33**, 161–173. (2012).
113. Li, G. *et al.* A Gold Nanoparticles Enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Highly Sensitive Detection of Ischemia-Modified Albumin. *Sensors* **13**, 12794–12803 (2013).
114. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533–1554 (1996).
115. Mobius, D. & Miller, R. *Organized Monolayers and Assemblies: Structure, Processes and Function*. (Elsevier Science, 2002).
116. Bamdad, C. The Use of Variable Density Self-Assembled Monolayers to Probe the Structure of a Target Molecule. *Biophys. J.* **75**, 1989–1996 (1998).
117. Kim, M.-G., Shin, Y.-B., Jung, J.-M., Ro, H.-S. & Chung, B. H. Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray. *J. Immunol. Methods* **297**, 125–132 (2005).
118. Lee, J. W., Sim, S. J., Cho, S. M. & Lee, J. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1422–1427 (2005).

119. Morel, A.-L. *et al.* Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **81**, 304–312 (2010).
120. Wadu-Mesthrige, K., Amro, N. A. & Liu, G.-Y. Immobilization of proteins on self-assembled monolayers. *Scanning* **22**, 380–388 (2000).
121. Pei, Z. *et al.* Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity. *Anal. Biochem.* **398**, 161–168 (2010).
122. Diana, M. Evaluación de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con extracto de claudula (*Calendula officinalis*) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo. (2015).
123. Tamri, P., Hemmati, A. & Boroujerdnia, M. G. Wound healing properties of quince seed mucilage: In vivo evaluation in rabbit full-thickness wound model. *Int. J. Surg.* **12**, 843–847 (2014).

12 Anexos

Anexo 1 . Cuantificación de Factores de Crecimiento y Citoquinas. 1A. Sensograma de la inmovilización indirecta de anti-TNF-alfa por el método indirecto. **1B.** Curvas de asociación y disociación para 5 factores de crecimiento y citoquinas utilizando las mono capas MUA y MHC.

1A



1B

