



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio**

**Dionisio Humberto Malagón Romero**

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

2014



**Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio**

**Dionisio Humberto Malagón Romero**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Doctor en Ingeniería-Área de énfasis Ingeniería Química**

Director (a):

Ph.D., M.Sc., Ingeniero Químico Rubén Darío Godoy Silva

Codirector (a):

M.Sc. Odontóloga Carmen Alicia Cardozo

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química

Bogotá, Colombia

2014



*A Dios fuente y culmen de toda mi historia.*

*A mi familia por todo el apoyo, en especial a mi mamá, mis tías y mis primos.*

*A Camilita y Dieguito por ser unos hijos maravillosos.*

VI Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

## **Agradecimientos**

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por convertirse en mi hogar durante quince años, en los cuales pude crecer como investigador alrededor de varios proyectos.

Al Doctor Rubén Darío Godoy Silva, quien asumió la dirección del proyecto y supo ser en todo momento un buen consejero, un excelente asesor y un gran amigo.

A la Profesora Carmen Alicia Cardozo, por ser cómplice en el desarrollo de mi proyecto y aceptarme en su Grupo de Investigación.

A la Profesora Afife Mrad, por su valioso apoyo, por su sabiduría y por su transparencia como persona.

Al Doctor Bernardo Camacho y al Hemocentro Distrital, por su colaboración y donación del plasma sanguíneo necesario para el desarrollo de este proyecto.

A la Profesora Sonia Ospina, por el apoyo brindado al aceptarme en su laboratorio.

Al Profesor Nicolás Hernández, por sus largas charlas alrededor de la reología y la paciencia y dedicación para sacar adelante el trabajo desarrollado.

Al Doctor Yobany Sánchez, por su colaboración en el análisis por microscopía de los equivalentes.

Al Doctor Larios, por su colaboración permanente en la consecución de muestras para el aislamiento de células humanas.

VIII Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

A la Doctora Linda Guerrero, por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Al Doctor Miguel Concha, por aceptarme a realizar mi pasantía doctoral en la Universidad Austral de Chile.

Al Doctor Álvaro Meana, por la capacitación que me brindó al inicio del proyecto.

Al Doctor Cristian Acevedo, por sus consejos y recomendaciones dadas para el desarrollo de esta tesis.

A la Doctora Dianney Clavijo, por la revisión de parte del manuscrito final.

A los profesores Martha Fontanilla, Fabio Aristizábal y Carlos Guerrero, por sus donaciones para la realización de algunas técnicas.

A la Doctora Yennire Vivas por su colaboración en la realización de algunos ensayos.

Al profesor Diego Garzón, por su apoyo como director del laboratorio de Biomiméticos.

A Laboratorios Rohpson por la donación de ácido tranexámico.

Al personal administrativo del IBUN: Claudia Parra, Raquel Noguera, Miryam Rodríguez y Rocío Oliveros.

A los laboratoristas Yolanda Pardo, Carlos Carranza, Oscar Acosta y Herlinda Amaris por su colaboración.

A la Universidad Santo Tomás, a sus directivas, administrativos, profesores y estudiantes, por aceptarme a ser un miembro más de la Familia Tomasina.

A la Doctora Carmen Rosa Díaz y a la E.P.S. Sanitas, por la caracterización del plasma y del Crioprecipitado.

A los Ingenieros Rodrigo López, Marco Velasco y Elver Carvajal por el apoyo recibido.

A mis compañeros de posgrado: Jorge Cortázar, Mauricio Bernal, Luz Angela Sastoque, Luisa Gómez, Jenniffer Serrano, Willington Bogoya, Javier Espitia, Juan Carlos Duarte, Glaether Flórez, Andrés Milquez, Marby Barón, Wilher Villada, Laura Villa, Jennifer Lorena Gil, Helver Lesmes, Astrid Nausa, Ana Isabel Ramos y Eliana Lozano.

X Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

## Resumen

Una alternativa para resolver la pérdida de piel es el empleo de equivalentes dérmicos. Con miras a generar un equivalente dérmico, este trabajo inició con la formación de geles de plasma sanguíneo humano mezclado con alginato de sodio al 0.8 % y 1.6 % de alginato de sodio, entrecruzado con diversas soluciones de cloruro de calcio (1%, 2% y 3%). Mediante reología dinámica y ensayos mecánicos, se determinó que la concentración que permitía un gel más resistente era al 1.6% de alginato, entrecruzado con cloruro de calcio al 3% p/v. Una mezcla de plasma/alginato al 1.6 % p/v fue descargada a través de una boquilla coaxial sobre una solución de cloruro de calcio (3% p/v), para generar microesferas cuyo diámetro se encontrara entre 150  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ . Con miras a aumentar la adhesión celular, se adsorbió en la superficie de las microesferas poli-L-lisina y fibrinógeno entrecruzado con trombina. Sobre estos microportadores, se realizó el cultivo de fibroblastos murinos de la línea 3T3 y humanos en un reactor *spinner*. Gracias al cultivo en biorreactor se logró reducir el tiempo de duplicación de los fibroblastos, comparado con el tiempo en caja de microtécnica. Los fibroblastos humanos fueron atrapados en geles de plasma/alginato pero dichos geles no fueron estables y ello ocasionó la pérdida de viabilidad a través del tiempo; por lo cual se evaluó en un gel de crioprecipitado entrecruzado con cloruro de calcio al 3% p/v. La viabilidad y proliferación se mantuvieron por 15 días sin que se desintegrara el gel. No se evidenció la formación de redes de colágeno.

**Palabras clave:** Fibrina, microportadores, reactor *spinner*, alginato, plasma sanguíneo humano.

## Abstract

An alternative in order to solution to the loss of skin is by dermal equivalents. For generation a dermal equivalent, in this work started from the formation of human blood plasma mixed with sodium alginate and crosslinked with different calcium chloride solutions (1%, 2% and 3%). Dynamic rheology and mechanical test revealed that the maximum strength of the gel obtained was achieved for a combination of 1.6% alginate, crosslinked with calcium chloride at 3% w/v. A mixture of plasma/alginate at 1.6% w/v was discharged across a coaxial nozzle over a calcium chloride solution (3% w/v) in order to generate microspheres with diameter between 150- 500  $\mu\text{m}$ . In order to enhance the cellular adhesion, adsorption of poli-l-lisine and fibrinogen crosslinked with thrombine was developed under the surface of microspheres. Upper these microcarriers murine fibroblast (3T3) and human fibroblasts was performed in a spinner reactor. Results of culture in the bioreactor shows that the time for the duplication of fibroblasts was reduced significantly compared with the equivalent in petri dishes. Human fibroblast were encapsulated in plasma/alginate gels, but they were not stable along time, causing a corresponding loss in viability cellular. Due to that, gels were fabricated using cryoprecipitated crosslinked with calcium chloride at 3% w/v. The viability and proliferation of fibroblasts were maintained during 15 days without observable gel disintegration. Formation of collagen network was not observed.

**Keywords:** fibrin, microcarriers, spinner reactor, alginate, human blood plasma

# Contenido

<b>1. Bases teóricas para la generación de un equivalente dérmico .....</b>	<b>7</b>
1.1 La piel .....	7
1.2 Cicatrización y reconstrucción de la piel.....	10
1.3 Características generales de los equivalentes de tejidos.....	12
1.4 El soporte tridimensional .....	17
1.4.1 Necesidad del soporte tridimensional .....	17
1.4.2 Características de los materiales empleados.....	18
1.4.3 Generalidades de los materiales evaluados.....	19
1.4.4 Fibrinógeno.....	21
1.5 Teoría de la doble capa.....	35
1.6 Alginato de sodio.....	37
1.7 Adsorción de proteínas .....	40
1.8 Comportamiento mecánico de los materiales .....	42
1.9 Microportadores .....	45
1.9.1 Microportadores para el cultivo de fibroblastos y queratinocitos .....	46
1.9.2 Métodos de producción.....	48
1.10 Uso de biorreactores para el cultivo de fibroblastos .....	49
<b>2. Obtención de un soporte usando mezclas de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio para Ingeniería de Tejidos.....</b>	<b>55</b>
2.1 Materiales y métodos .....	55
2.1.1 Reactivos.....	55
2.1.2 Obtención de plasma sanguíneo .....	56
2.1.3 Determinación del potencial $\zeta$ .....	56
2.1.4 Viscometría del plasma sanguíneo y alginato de sodio.....	57
2.1.5 Fabricación de geles de plasma sanguíneo y alginato .....	57
2.1.6 Reología dinámica de los geles obtenidos .....	58
2.1.7 Caracterización mecánica de los geles obtenidos.....	58
2.1.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	59
2.1.9 Evaluación de las películas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	59
2.2 Resultados y discusión de resultados.....	59
2.2.1 Obtención del lote de plasma sanguíneo .....	59
2.2.2 Determinación del potencial $\zeta$ .....	62
2.2.3 Viscometría del plasma sanguíneo y alginato de sodio.....	64
2.2.4 Fabricación de geles de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano.....	69
2.2.5 Reología dinámica de los geles obtenidos .....	70
2.2.6 Caracterización mecánica de los geles obtenidos.....	76
2.2.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	78

2.2.8 Evaluación de las películas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	79
2.3 Conclusión .....	81
<b>3. Generación de microportadores de plasma sanguíneo y alginato de sodio para el crecimiento de fibroblastos en bio-reactor .....</b>	<b>83</b>
3.1 Materiales y métodos .....	83
3.1.1 Obtención de plasma y crioprecipitado de plasma sanguíneo humano .....	83
3.1.2 Reactivos .....	84
3.1.3 Formación de microesferas de alginato .....	84
3.1.4 Generación de microportadores con plasma humano y alginato de sodio .....	86
3.1.5 Adsorción de poli-L-lisina (PLL) sobre los microportadores .....	87
3.1.6 Adsorción de fibrinógeno sobre los microportadores .....	88
3.1.7 Entrecruzamiento del fibrinógeno con trombina .....	88
3.1.8 Evaluación de la adhesión celular .....	89
3.1.9 Evaluación del crecimiento celular en reactor <i>spinner</i> .....	89
3.1.10 Determinación de la citotoxicidad de los microportadores .....	91
3.1.11 Determinación de la densidad de los microportadores .....	92
3.1.12 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	92
3.1.13 Microscopía de fluorescencia y confocal .....	92
3.2 Resultados y análisis de resultados .....	93
3.2.1 Caracterización del plasma sanguíneo y del crioprecipitado .....	93
3.2.2 Formación de micropartículas de alginato y plasma/alginato .....	95
3.2.3 Adsorción de poli-lisina (PLL) .....	104
3.2.4 Adsorción de fibrinógeno .....	107
3.2.5 Citotoxicidad de los microportadores .....	111
3.2.6 Adhesión celular .....	113
3.2.7 Densidad de los microportadores .....	116
3.2.8 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de fuerza atómica (AFM) .....	116
3.2.9 Cinética de crecimiento en reactor <i>spinner</i> .....	119
3.3 Conclusión .....	122
<b>4. Generación de un equivalente dérmico usando fibroblastos cultivados sobre microportadores de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio .....</b>	<b>123</b>
4.1 Materiales y métodos .....	124
4.1.1 Reactivos .....	124
4.1.2 Plasma sanguíneo y crioprecipitado .....	124
4.1.3 Aislamiento de fibroblastos .....	124
4.1.4 Pasaje celular .....	125
4.1.5 Criopreservación de las células obtenidas .....	125
4.1.6 Purificación del alginato de sodio .....	125
4.1.7 Viscometría del crioprecipitado .....	127
4.1.8 Reología dinámica de los geles de crioprecipitado .....	127
4.1.9 Evaluación de la proliferación celular en biorreactor .....	128
4.1.10 Encapsulación de células humanas en geles de plasma/alginato y crioprecipitado/alginato .....	129
4.1.11 Atrapamiento de fibroblastos humanos en geles de crioprecipitado .....	130
4.1.12 Comportamiento morfológico .....	131
4.2 Resultados y discusión .....	132
4.2.1 Aislamiento de fibroblastos, pasaje celular y criopreservación .....	132

---

4.2.2	Purificación del alginato de sodio.....	133
4.2.3	Viscometría del crioprecipitado .....	136
4.2.4	Reología dinámica del crioprecipitado .....	137
4.2.5	Evaluación de la proliferación en biorreactor .....	140
4.2.6	Encapsulación de fibroblastos en geles de plasma/alginate y crioprecipitado/alginate .....	143
4.2.7	Atrapamiento de fibroblastos en geles de crioprecipitado .....	149
4.3	Conclusión .....	154
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>157</b>
5.1	Conclusiones.....	157
5.2	Recomendaciones.....	159

## Lista de figuras

Figura 1-1:	Microfotografía óptica de piel en la que se observa la epidermis y la dermis unidas por la membrana basal.....	9
Figura 1-2:	Elementos básicos en Ingeniería de Tejidos. ....	13
Figura 1-3:	Estructura del Fibrinógeno. Fuente: [51].....	23
Figura 1-4:	Cascada de Coagulación. Fuente: [54].....	24
Figura 1-5:	Modelo de doble Capa. Fuente: [98].....	37
Figura 2-1:	Potencial $\zeta$ para mezclas de alginato de sodio y plasma sanguíneo humano en dilución 1:16 ajustados a una conductividad eléctrica de 20 mS con NaCl.....	63
Figura 2-2:	Curva de flujo para el plasma sanguíneo humano entre una velocidad de corte de 0.1 s <sup>-1</sup> y 150 s <sup>-1</sup> a 37 °C . (●: Rampa de ascenso; ○:rampa de descenso). ....	65
Figura 2-3:	Curvas de Flujo para diferentes concentraciones de alginato: □ 0.2%, ○ 0.4%, ◇ 0.8%, Δ1.6% para velocidades de deformación entre 0.1 s <sup>-1</sup> y 150 s <sup>-1</sup> para: a) soluciones de alginato de sodio; b) mezclas de plasma sanguíneo con alginato de sodio. ....	66
Figura 2-4:	Determinación de la Región Viscoelástica Lineal (VLR) para la mezcla plasma sanguíneo/alginato de sodio al 0.8% .....	71
Figura 2-5:	Determinación de la Región viscoelástica lineal (VLR) para la mezcla plasma sanguíneo/alginato de sodio al 1.6%. ....	71
Figura 2-6:	<i>Frequency sweep</i> para películas de alginato de calcio/plasma para: a) concentraciones de 0.8% en alginato y b) concentraciones de 1.6% en alginato para concentraciones de calcio: ◆,◇ 1% w/v; ▲, Δ 2% w/v; ■, □ 3% (w/v). Módulo de almacenamiento $G'$ : símbolos llenos y módulo de pérdida $G''$ : símbolos abiertos.....	72
Figura 2-7:	Módulo Complejo ( $G^*$ ), datos experimentales y datos ajustados según el modelo matemático $G^* \omega = 2\pi s \alpha * \cos(\pi 2\alpha) \omega \alpha$ .....	76
Figura 2-8:	Resistencia mecánica vs deformación para una película de plasma sanguíneo humano-alginato de calcio al 1.6% formada con cloruro de calcio al 3% p/v. ....	78
Figura 2-9:	DSC a una muestra de plasma sanguíneo humano (verde), alginato de calcio al 1.6% p/v (azul) y la mezcla plasma sanguíneo humano/alginato de sodio al 1.6% p/v (rojo). ....	79
Figura 2-10:	Fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para: A) 0.8% de alginato de calcio y 3% de cloruro de calcio; B) 1.6% de alginato de calcio y 3% de cloruro de calcio; C) Alginato de sodio al 1.6% entrecruzado con cloruro de calcio al 3%; D) Plasma sanguíneo entrecruzado con cloruro de calcio. ....	80
Figura 3-1:	Montaje experimental para la generación de microportadores. ....	85
Figura 3-2:	Características de la Boquilla Air Atom 1/8 J (Spraying Systems). ....	86

Figura 3-3:	Tinción con Azul de Toluidina. Izquierda: Micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1.6% p/v descargada sobre una solución de cloruro de calcio 0.27 M (aumento 4X). Derecha: Micropartículas obtenidas con plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1,6% p/v descargada sobre una solución de cloruro de calcio 0.27 M. (aumento 4X). 96
Figura 3-4:	Diámetro promedio para las micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1.6% p/v a una altura de 20 cm a diferentes presiones: -1: 5 psig; 0: 7 psig; +1: 9 psig y y flujos: 0:125,6 ml/min y +1: 367,56 ml/min..... 98
Figura 3-5:	Diámetro promedio para las micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1.6% p/v a una altura de 30 cm a diferentes presiones: -1: 5 psig; 0: 7 psig; +1: 9 psig y y flujos: 0:125,6 ml/min y +1: 367,56 ml/min..... 98
Figura 3-6:	Histograma para las microesferas obtenidas con alginato de sodio al 1.6 % p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de alginato de sodio 125.6±7.22 ml/h, altura 30 cm. Diámetro promedio: 163.57µm, desviación estándar: 91.13 µm, % partículas entre 150 µm y 500µm 46.2%. .... 99
Figura 3-7:	Histograma para las microesferas obtenidas con la mezcla plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1.6% p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de la mezcla 125.6±7.22 ml/h, altura 30 cm. Diámetro promedio: 52.47 µm, desviación estándar: 46.4 µm, % partículas entre 150 µm y 500µm 12.20 %.....101
Figura 3-8:	Histograma para las microesferas obtenidas con la mezcla plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1.6% p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de la mezcla 125.6 ± 7.22 ml/h y altura 30 cm; tamizados usando tamices con tamaño de malla 150-500 µm. Diámetro promedio: 219.04 µm, desviación estándar: 99.84 µm, % partículas entre 150 µm y 500µm: 100 %. ....102
Figura 3-9:	Área ofrecida por los microportadores Vs concentración de microportadores (micr/ml).....103
Figura 3-10:	a) Relación entre el volumen empacado por los microportadores y la concentración de los microportadores; b) Fotografía del volumen empacado para: izquierda (20,000 microportadores/ml), centro (70,000 microportadores/ml), derecha (120,000 microportadores/ml).....104
Figura 3-11:	Concentración de Proteína a través del tiempo en ensayos de adsorción de Poli-l-lisina sobre microportadores de plasma/alginato. ○: Pozos con microportadores, ●: Pozos sin microportadores. Ensayo realizado para 35,000 microportadores/ml.....106
Figura 3-12:	Concentración de Proteína a través del tiempo en ensayos de adsorción de Fibrinógeno sobre microportadores de plasma/alginato recubiertos de Poli-l-lisina. ○: Pozos sin microportadores, ●: Pozos con microportadores.....108
Figura 3-13:	Diagrama de Flujo del proceso de generación de microportadores .....110
Figura 3-14:	Porcentaje de Citotoxicidad de los microportadores frente al control para diversas concentraciones de microportadores/ml .....112
Figura 3-15:	Cinética de adhesión celular para fibroblastos 3T3 sobre microportadores. 114
Figura 3-16:	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para microportadores: a) Estabilizados en solución salina, b) Con PLL adsorbida en la superficie, c) con

---

fibrinógeno entrecruzado con trombina adsorbido en la superficie, d) detalle de la fibrina en la superficie de los microportadores.....	118
Figura 3-17: Microscopía de fuerza Atómica (AFM) de la superficie de los microportadores:a) estabilizados en solución salina, b) cargada con PLL, c) cargada con fibrinógeno. 117	
Figura 3-18: Cinética de crecimiento de Fibroblastos 3T3. Izquierda, en reactor Spinner: ○: Concentración de 10,000 microportadores/ml, ●: Concentración de 20,000 microportadores/ml; Derecha, en caja de microtécnica.....	119
Figura 3-19: Microscopia Confocal de fibroblastos de la línea 3T3 sobre microportadores en el día 3 de cultivo en reactor Spinner.....	121
Figura 3-20: Microscopía de Fluorescencia de fibroblastos de la línea 3T3 sobre microportadores en el día 3 de cultivo en reactor Spinner.....	121
Figura 4-1: Biorreactor de 100 ml de capacidad con boquilla lateral ubicado sobre una plancha de agitación dentro de la incubadora con un volumen de reacción de 30 ml. 129	
Figura 4-2: Derecha: prepucio de niño obtenido a partir de la circuncisión; Izquierda: fibroblastos humanos aislados a partir de prepucio de un niño (P-4; 20X). ....	133
Figura 4-3: Etapas de purificación del alginato: a) disolución de alginato de sodio en agua; b) formación de esferas de alginato de bario; c) precipitación de alginato de sodio en alcohol; d) alginato de sodio secado mediante liofilización.....	135
Figura 4-4: Curva de flujo para el crioprecipitado de plasma sanguíneo humano entre una velocidad de deformación de 0.1 s <sup>-1</sup> y 150 s <sup>-1</sup> a 37 °C. (●: Rampa de ascenso; ○:rampa de descenso). ....	136
Figura 4-5: Determinación de la región viscoelásticaLineal (VLR) para geles de crioprecipitado en 2 relaciones volumétricas 1:10 y 1:20 (volumen de crioprecipitado a volumen de cloruro de calcio al 3% p/v).....	138
Figura 4-6: <i>Frequency sweep</i> para los geles de crioprecipitado a diversos tiempos de gelificación: 0 min, 10 min, 20 min y 30 min. ....	139
Figura 4-7: Cinética de crecimiento de fibroblastos humanos en reactor <i>spinner</i> . Izquierda: reactor <i>spinner</i> con una concentración inicial de microportadores de 20,000 microportadores/ml. Derecha: en caja de microtécnica. ....	141
Figura 4-8: Microscopía electrónica de barrido (SEM) para microportadores. Izquierda: microportadores sin fibroblastos; Derecha: microportadores con fibroblastos adheridos. 142	
Figura 4-9: Comparación del crecimiento celular en geles de plasma/alginato. Izquierda: sin ácido tranexámico, Derecha: con ácido tranexámico al 0.5%.....	144
Figura 4-10: Tinción con hematoxilina/Eosina para fibroblastos humanos atrapadas en geles de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio al 1.6% p/v. Días: 2 (A), 7(B), 11(C) y 15(D). Aumento: 20 X.....	146
Figura 4-11: Comparación del crecimiento celular en geles de crioprecipitado/alginato. Izquierda: sin ácido tranexámico, Derecha: con ácido tranexámico al 0.5%.....	147

---

Figura 4-12: Tinción con hematoxilina/Eosina para fibroblastos humanos atrapadas en geles de crioprecipitado de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio al 1.6% p/v. Días: 2, 7, 11 y 15. Aumento 20 X.....	148
Figura 4-13: Crecimiento celular en geles de Crioprecipitado polimerizado con cloruro de calcio, relación volumétrica 10:1, suplementado con tranexam® al 0.5%.....	150
Figura 4-14: Tinción con Hematoxilina y Eosina para el equivalente dérmico formado a partir de la coagulación de crioprecipitado de plasma sanguíneo. Días: 2, 7, 11 y 15; Aumento 20 X. 152	
Figura 4-15: Tinción para el equivalente dérmico formado a partir de la coagulación de crioprecipitado de plasma sanguíneo en el día 15. Izquierda: tinción con hematoxilina/eosina. Derecha: tinción con tricrómico de Mason. Aumento 40 X.....	153

## Lista de tablas

Tabla 1-1: Comparación de distintos equivalentes dérmicos y epidérmicos disponibles en el mercado .....	14
Tabla 2-1: Caracterización del stock de plasma, Laboratorio Clínico unidad de servicios de la Universidad Nacional de Colombia. ....	61
Tabla 2-2: Determinación del ión de fondo para los ensayos de potencial $\zeta$ para diluciones 1:16 de plasma sanguíneo humano.....	62
Tabla 2-3: Ajuste de Ostwald de Waele para el plasma sanguíneo humano, alginato de sodio y mezclas de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano. ....	68
Tabla 2-4: Ajuste matemático para los ensayos de <i>frequency sweep</i> . ....	74
Tabla 2-5: Caracterización mecánica de una película de alginato/plasma. ....	77
Tabla 3-1: Caracterización de la mezcla de Plasma Sanguíneo y Crioprecipitado de plasma sanguíneo.....	94
Tabla 3-2: Resultados del análisis de las micro-partículas obtenidas a partir de la descarga de solución de alginato de sodio al 1.6% p/v sobre solución de cloruro de calcio 0.27 M. ....	97





# Introducción

Los equivalentes cutáneos constituyen una alternativa novedosa, eficaz y tecnológicamente factible para el tratamiento de múltiples lesiones consideradas como problemas de salud pública. Dentro de dichas lesiones se pueden mencionar: quemaduras extensas, malformaciones, úlceras de miembros inferiores, entre otras, las cuales son demasiado complejas para ser abordadas con las terapias quirúrgicas desarrolladas hasta el momento. Países desarrollados cuentan a la fecha con equivalentes cutáneos, comercialmente disponibles, y usados en el tratamiento de lesiones de la piel; sin embargo, en países en vías de desarrollo, como Colombia, ha sido limitado su uso por razones como falta de representación directa o indirecta de los laboratorios que los producen, dificultad para el transporte e importación de los equivalentes, altos costos, falta de cobertura en los sistemas asistenciales, entre otros, ante lo cual los profesionales de la salud no incluyen rutinariamente estos tratamientos para los pacientes colombianos. Sumado a lo anterior, la mayoría de los pacientes que requieren este tipo de procedimientos son de los estratos 1 y 2 [1] y por tanto no podrían salir del país a recibir el tratamiento adecuado ni tendrían recursos para importarlos.

La tecnología hasta ahora desarrollada y aplicada en Colombia para casos donde se han perdido tejidos u órganos es la cirugía reconstructiva, los trasplantes y los apósitos. En algunos casos se ha podido tener acceso a materiales de implantes, piel cadavérica, piel autóloga y huesos sintéticos con costos muy elevados, lo que significa que solamente es posible el acceso a estos medios para personas económicamente solventes. En Colombia el número de donantes de órganos es de sólo 12 por millón de habitantes, según estadísticas del Banco de Tejidos de la Secretaría Distrital de Salud para el año 2008 [2].

Uno de los tejidos que presenta una alta demanda en el país es la piel, por lo cual ha sido ampliamente investigado en el mundo, por su aplicabilidad y las implicaciones que tiene dentro de los indicadores de salud pública, ya que la falta de piel afecta considerablemente la calidad de vida. La pérdida de piel es debida primordialmente a quemaduras (químicas,

físicas, por fuego) y úlceras (venosas, arteriales, diabéticas, infecciosas, inflamatorias, de presión y tumorales). En Estados Unidos las úlceras venosas comprenden el 65 a 70% de las úlceras de miembros inferiores, las cuales presentan altos índices de morbilidad dentro de la población general, con una alta incidencia y prevalencia que afecta al 1-3% de la población en países desarrollados, esto genera además un incremento en la carga productiva de los sectores empresariales. Por citar un ejemplo, se cuantificaron 600,000 individuos en el año 1995, generando una inversión aproximada de 350 millones de dólares en métodos convencionales no quirúrgicos para manejo de estas úlceras [3]. Estos datos son probablemente más altos en la actualidad, dado el incremento general de la población de mayor edad, entre quienes el problema es más frecuente. Los datos son similares en Europa [4].

Los equivalentes comercializados en los países desarrollados presentan costos excesivos (cerca de US\$ 30/cm<sup>2</sup>), que sumado a los requerimientos y costos de importación, manejo adecuado de una cadena de frío para su transporte hacen que esta tecnología esté cada vez más lejos de la población colombiana. Un estimativo de los costos totales de estos tratamientos para un paciente norteamericano en 1993 llegó a ser de US\$ 43,405 para una superficie corporal del 15.9% [5]. Sumado a lo anterior, los materiales y equivalentes producidos y comercializados en la actualidad no tienen aún el potencial de reparación requerido para la regeneración [6], lo cual abre una posibilidad de desarrollo de nuevos materiales y nuevas alternativas de proceso.

En Suramérica las causas más usuales corresponden a accidentes domésticos, industriales o laborales y los agentes más frecuentes son líquidos calientes, seguidos de llama directa y electricidad [7]. En Colombia la información recolectada muestra que en Medellín, en el Hospital Universitario San Vicente de Paul, se presentaron cerca de 333 pacientes quemados en el año 2004, de los cuales la mayoría ingresaron con quemaduras causadas por líquidos calientes seguidos por quemaduras por derivados del petróleo, llama, electricidad, aceite o manteca, pólvora, gas, alcohol industrial y en menor porcentaje ácidos [8]. En el Hospital Universitario de Cartagena, entre octubre de 1994 y octubre de 1996 se registraron 338 pacientes, también con quemaduras, cuyos agentes etiológicos fueron: líquidos en ebullición 60%, hidrocarburos 11.5%, fuego directo 8.9%, electricidad 8.6%, objetos calientes 4.1%, productos químicos 2%, otros 2% y no registrado 2.7% [1]. En Bogotá en los últimos 10 años se ha incrementado el número de pacientes con pérdida

de piel, así por ejemplo en el Hospital Simón Bolívar pasó de 450 a 1085, en el Hospital de la Misericordia de 128 a 250, con un agravante y es que dentro de los pacientes se tienen niños, inclusive de meses de nacidos. Adicionalmente, los requerimientos por parte del Hospital Simón Bolívar al Banco de Tejidos han pasado de 5,000 cm<sup>2</sup> cada 6 meses a 10,000 cm<sup>2</sup> mensuales, cifra que no alcanza a cubrir esta Institución (Comunicación personal con la Dra Linda Guerrero de la Fundación del Quemado). Las cifras anteriores solamente se refieren a la población de quemados, sin tener en cuenta afecciones como úlceras de presión, úlceras en pie de diabético o malformaciones, entre otras.

El desarrollo de un equivalente dérmico conlleva procedimientos *in vitro* e implica el crecimiento de fibroblastos sobre materiales biocompatibles, que garanticen y promuevan la proliferación celular y faciliten la formación de la matriz extracelular, mediante una degradación controlada del material. Muchos materiales poliméricos, tanto naturales como sintéticos, se han evaluado a lo largo de los últimos 25 años con excelentes resultados en sus aplicaciones en pacientes y sin que se pueda concluir cuál podría ser el mejor para aplicación en pacientes. El material más ampliamente empleado es el colágeno tipo I obtenido a partir de animales, el cual puede llegar a ser muy costoso y presenta el riesgo de transmisión de virus y priones, por lo cual varios grupos de investigación buscan emplear otro tipo de materiales. Aunque se ha buscado reemplazarlo por materiales sintéticos, se han presentado problemas como rechazo inmune, baja biodegradabilidad, generación de productos tóxicos durante la biodegradación, entre otros. Por esto actualmente la tendencia en este campo es la utilización de materiales biocompatibles que contribuyan con la proliferación y adhesión celular. Uno de los materiales que ofrece altas expectativas es el fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo y en el crioprecipitado de plasma, que permitiría generar en un futuro no muy lejano equivalentes autólogos.

El plasma sanguíneo es un complejo de proteínas, factores de crecimiento, iones y cofactores que se encuentran disueltos o en suspensión en el suero sanguíneo. Uno de los componentes proteicos del plasma es el fibrinógeno, que puede ser activado mediante una serie de reacciones enzimáticas llamada cascada de coagulación que lo transforma en fibrina, la cual es una red de fibrillas que conforman el coágulo. *In vitro* es posible activar la cascada de coagulación, mediante el empleo de trombina y cloruro de calcio, con el objetivo de generar esa red de fibrillas que podrían ser aprovechadas para el crecimiento celular. La Ingeniería Tisular ha aprovechado esta posibilidad y ha usado fibrinógeno como

soporte para el crecimiento de varios tipos celulares, principalmente condrocitos y fibroblastos. La fibrina se puede obtener a partir de fibrinógeno humano purificado o bien aprovechando la presencia del mismo en el plasma sanguíneo. El uso de plasma sanguíneo y de crioprecipitado presenta algunas ventajas con respecto al uso del fibrinógeno purificado, como son: presencia de otras proteínas como fibronectina que favorece la adhesión celular, uso de componentes humanos para la obtención de la matriz, empleo de una materia prima con facilidad de consecución, proceso sencillo para la generación de la matriz sin empleo de sustancias tóxicas para el crecimiento celular, disminución de la posibilidad de una respuesta inmune, más económico que usar fibrinógeno purificado.

Uno de los inconvenientes es la baja resistencia de los geles que dificulta la manipulación de los mismos. Para incrementar la resistencia de los geles se suele mezclar con otros materiales, dentro de los cuales sobresale el alginato. Alginato es un polisacárido obtenido de las algas, el cual puede gelificar en la presencia de iones divalentes como calcio o bario, entre otros. La mezcla garantiza un efecto sinérgico en el material obtenido, ya que mejora la resistencia del gel, y se conserva la actividad biológica que favorece la adhesión y proliferación celular, gracias a la presencia de fibrina.

Adicional al problema económico, la obtención de los equivalentes requiere acompañar la necesidad clínica con la capacidad proliferativa de las células en el laboratorio, pues tradicionalmente se realizan cultivos de células en 2D, empleando frascos de cultivo, en los cuales las células crecen sin agitación en sistemas denominados cultivos estáticos, donde se pueden presentar limitaciones de pH, nutrientes, toxinas, gases y factores de crecimiento que limitan el crecimiento celular [9].

El uso de biorreactores para el desarrollo de tejidos ha mostrado ventajas sobre la proliferación de manera estática de las células [10], dentro de las que se pueden mencionar: el aumento de la proliferación celular, aumento de la concentración celular por unidad de volumen comparado con otros sistemas de cultivo, mejoramiento de la transferencia de oxígeno a las células, realización de un control más estricto sobre el crecimiento celular, disminución en el tiempo de cultivo, aumento en la homogeneidad del cultivo, entre otras [11].

Es por ello que se realizó la mezcla de plasma sanguíneo humano con alginato de sodio, y se estandarizó la síntesis de microportadores sobre los cuales proliferan fibroblastos en biorreactor. Para mejorar la adhesión celular, los microportadores se cargaron con poli-lisina y posteriormente se adsorbió sobre ellos fibrinógeno entrecruzado con trombina. Gracias a la presencia de secuencias de reconocimiento celular presentes en la fibrina, y a la presencia de integrinas en fibroblastos murinos de la línea 3T3 y fibroblastos humanos, se logró la adhesión celular a los microportadores. Finalmente, se evaluó la posibilidad de usar el gel obtenido de plasma sanguíneo/alginato en el atrapamiento de fibroblastos, pero la inestabilidad del gel condujo a la pérdida de viabilidad celular, por lo cual se debió estandarizar otro gel, empleando crioprecipitado de plasma estabilizado con ácido tranexámico. Los resultados obtenidos permiten concluir que el gel de crioprecipitado favorece la proliferación celular, observándose la morfología característica de los fibroblastos.

De esta forma se encontró respuesta a la pregunta de investigación: ¿Es posible generar microportadores, mediante la mezcla de plasma sanguíneo y alginato de sodio, que soporten el cultivo de fibroblastos en suspensión para la generación de un equivalente dérmico?.



# 1. Bases teóricas para la generación de un equivalente dérmico

La piel es una estructura bastante compleja compuesta por varias capas organizadas de tal manera que cumplen diversas funciones dentro del organismo. Su pérdida o lesión por heridas, infecciones o traumas resulta ser un problema de salud en países como Colombia. La regeneración de la zona afectada puede lograrse mediante el empleo de un equivalente dérmico. En este capítulo se analizan los diferentes elementos teóricos necesarios para el desarrollo de un equivalente dérmico.

## 1.1 La piel

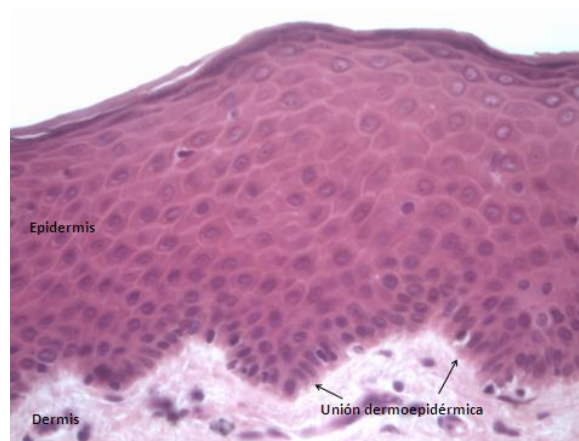
La piel es el órgano más extenso del cuerpo, representa el 15% del peso corporal y cubre aproximadamente 1,7 m<sup>2</sup> en un adulto promedio [7]; constituye la barrera física entre el cuerpo y el ambiente externo; está compuesta por 2 capas: epidermis y dermis [12] [13], entre las cuales se generan complejas relaciones funcionales que mantienen las propiedades normales de la piel. También, la piel posee glándulas, folículos pilosos y receptores sensoriales [14] que contribuyen con el cumplimiento de las funciones protectoras, perceptivas y regulatorias que mantienen la homeostasis del cuerpo [15]. La Figura 1-1 presenta el esquema de la constitución de la piel, en ella se puede apreciar la dermis, la epidermis y la membrana basal.

La epidermis es la capa más externa de la piel y posee un grosor de 0,1-0,2 mm [12], [16]; dentro de sus funciones principales se destacan el control sobre sustancias tóxicas, organismos peligrosos, radiación ultravioleta y el mantenimiento de la homeostasia del organismo a través del control de la transpiración. Está compuesta principalmente por queratinocitos, células especializadas que forman el epitelio escamoso estratificado, y por melanocitos, que son los encargados de darle el color a la piel gracias a la producción de

melanina que protege de la radiación UV. También se pueden encontrar células como las de Langerhans y las células de Merckel, con funciones inmunológicas y de percepción sensorial, respectivamente [13], [17]. La epidermis se caracteriza por tener una gran resistencia mecánica a la cual contribuyen tanto los filamentos de queratina y los desmosomas como el estrato córneo de la epidermis. La epidermis se halla estratificada a partir de la lámina basal sobre la cual se encuentra su estrato germinal. Los queratinocitos de esta capa tienen capacidad mitótica y a partir de la misma, las células van migrando progresivamente hacia la zona apical hasta alcanzar la superficie de la piel convertidos en células descamativas. La migración celular implica la formación de estratos con un grado de maduración de los queratinocitos distinto: estrato basal o germinativo, espinoso, granuloso, lúcido hasta finalmente llegar al estrato superficial o estrato córneo. Durante las últimas etapas de la diferenciación celular, los queratinocitos acumulan lípidos dentro del espacio intercelular formando una barrera impermeable [14], compuesta principalmente por queratina. La diferenciación está programada genéticamente, comenzando entonces en el queratinocito posmitótico y terminando con una célula cornificada anucleada. Este proceso de diferenciación comprende síntesis y modificación de proteínas estructurales (sobre todo queratinas), formación, transformación y degradación de orgánulos celulares, apoptosis, cambios de la morfología celular, alteraciones de la membrana celular y pérdida de agua [18].

Entre la epidermis y la dermis se ubica la membrana basal. La membrana basal tiene un espesor cercano a 80 nm, consta de una lámina lúcida cercana a la epidermis y una lámina densa cercana a la dermis [16]. La lámina lúcida es ocupada por varias macromoléculas, ellas dan a esta capa una apariencia finamente granular o filamentosa [17]. Dichas macromoléculas incluyen heparán sulfato, proteoglicanos, laminina y antígeno penfigoide [17]. La lámina densa incluye una red de moléculas de colágeno tipo IV, una glicoproteína llamada antígeno de epidermólisis bullosa, fibronectina y varios proteoglicanos. Mientras que la lámina lúcida es fuertemente una capa adherente a la membrana epidérmica, la lámina densa limita el paso de macromoléculas desde la dermis hacia la epidermis. La membrana basal se encarga de regular la diferenciación de queratinocitos en el estrato basal [13].

Por último, debajo de la membrana basal se encuentra la dermis, en la cual se hallan diversos tipos celulares inmersos en una matriz extracelular [17]. Los fibroblastos son las células que más abundan en la dermis y son los encargados de producir y mantener la matriz extracelular. La densidad celular de fibroblastos presentes en una muestra de piel aislada de prepucio de infantes es  $33 \pm 0.4 \times 10^6$  fibroblastos /  $\text{cm}^3$  [19]. Una red de fibras nerviosas se extiende a través de la dermis con la función de recibir señales en la piel. Algunas de estas fibras secretan neuropéptidos que ejercen respuesta inmune e inflamatoria en la piel actuando sobre células endoteliales, leucocitos y queratinocitos [14]. La matriz extracelular regula el ambiente en el cual se hallan embebidas las células y está constituida principalmente por proteínas fibrosas, como el colágeno (tipo I) y la elastina. Adicionalmente a las proteínas fibrosas, la matriz extracelular contiene proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas de adhesión que unen los componentes de la matriz entre sí y a las células [17]. El esfuerzo último a tensión (*ultimate tensile strength* UTS), reportado por Ahlfors y Billiar [19], es  $713.0 \pm 55.2$  kPa para una muestra de piel aislada de prepucio de infante, este valor se debe en gran medida a la presencia de la matriz extracelular.



**Figura 1-1:** Microfotografía óptica de piel en la que se observa la epidermis (parte superior) y la dermis (parte inferior) unidas por la membrana basal.

## 1.2 Cicatrización y reconstrucción de la piel

La piel es una excelente barrera contra influencias externas como alteraciones mecánicas, radiación ultravioleta y agentes patógenos microbianos. Además, previene la pérdida de fluidos corporales y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la termorregulación y la defensa inmune [12]. Debido a estas características de barrera que presenta la piel con frecuencia puede sufrir heridas. Una herida es la consecuencia de una agresión, que da como resultado la pérdida de continuidad en los tejidos. Según la profundidad alcanzada en los mismos se clasifican en [20] :

- Superficial: sólo está afectada la epidermis (erosión) y se resuelve sin dejar cicatriz.
- De espesor parcial: afecta la epidermis y la dermis superficial, respetando los anexos cutáneos. Al involucrar la membrana basal y la dermis deja cicatriz.
- De espesor completo: involucra la epidermis, dermis profunda y/o hipodermis. No existen anexos cutáneos remanentes y a veces compromete tejidos más profundos como músculo, tendón, cápsula articular y hueso. Repara siempre con cicatriz. Dentro de éstas se encuentran las heridas quirúrgicas, úlceras arteriales y úlceras de presión.

Si la lesión ocurre solamente en la epidermis o se extiende a la zona superficial de la dermis, el organismo se encarga de reconstruir dicha lesión mediante la regeneración, gracias a la presencia de células madre de queratinocitos presentes en la epidermis o en los anexos cutáneos. Si la lesión compromete la dermis no hay regeneración sino reparación por cicatrización, por lo que en algunos casos suele ser necesario reconstruir la dermis y la epidermis mediante diferentes alternativas como: el uso de piel cadavérica, equivalentes dérmicos, equivalentes dérmicos/epidérmicos, uso de hidrogeles, entre otras [12], [20], [21]. A partir de la experiencia clínica se ha establecido que si la pérdida de la piel es mayor a 4 cm de diámetro la cicatrización no se realizará de manera autónoma y requerirá la intervención quirúrgica [22].

El trasplante de piel autóloga es el procedimiento estrella para el tratamiento de lesiones donde se ha perdido la piel y el organismo no logra cicatrizar de manera autónoma. Sin embargo, en el caso de pérdidas de piel con una extensión considerable, este procedimiento deja de ser viable y se debe recurrir a otros tratamientos, tales como el uso de piel cadavérica o el uso de equivalentes dérmicos, epidérmicos, epidérmicos/dérmicos, uso de apósitos, entre otros.

La cicatrización es el proceso normal de cierre de la herida. La reparación de una herida es una integración de procesos interactivos y dinámicos, cuya secuencia se superpone en el tiempo e involucra movimiento, replicación y restauración celular [13]. Generalmente el proceso de cicatrización se divide en tres fases: Inflamatoria, Proliferativa y de Remodelación tisular [13], [20], [23], [24], [25]:

- **Inflamatoria:** Producida la lesión se presenta disrupción de vasos sanguíneos con la consiguiente extravasación de plasma, células sanguíneas y otros factores hacia el intersticio. El proceso se inicia con la activación de los elementos formes de la sangre y llega a la formación del coágulo o tapón hemostático, en el cual intervienen la cascada de coagulación y el fenómeno de agregación plaquetaria. La red de fibrina se convierte en la matriz provisional para el cierre de la herida. Las plaquetas atrapadas dentro de la red de fibrina inician la degranulación y la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que atraen a neutrófilos y monocitos al lugar de la herida. Los neutrófilos dirigen su respuesta hacia bacterias introducidas en la herida, las células isquémicas y necróticas y a su vez mueren en el proceso. Los monocitos aparecen enseguida y son activados entonces para formar los macrófagos, los cuales reabsorben el material necrótico, fagocitan materiales extraños y liberan un número de factores de crecimiento que facilitan la regeneración del tejido.
- **Proliferativa:** Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de la matriz dérmica; llegan al sitio de la herida desde músculo, tendón y fascia entre las 48 y 72 horas posteriores a la lesión. Gracias a la producción de diversas enzimas y factores los fibroblastos van migrando y depositando una nueva matriz provisional de fibronectina y ácido hialurónico (Fibroplasia). Posteriormente se inicia la angiogénesis y la migración de los queratinocitos hasta completar la

reparación de la membrana basal y la epidermis (reepitelización). Los fibroblastos sintetizan colágeno tipo I, III y VI y las moléculas de adhesión comienzan a establecer uniones célula-célula y uniones con la matriz extracelular, esto ocasiona la tensión de la herida y la contracción de la misma.

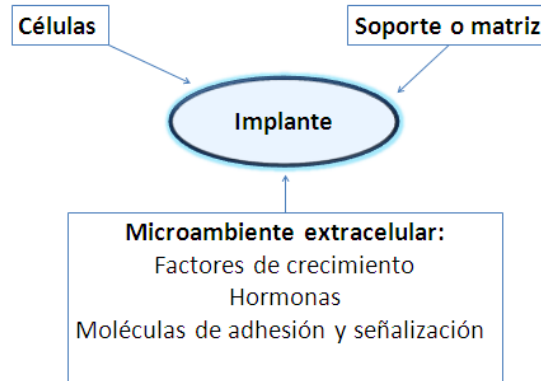
- Remodelación Tisular: La fibronectina y el ácido hialurónico van desapareciendo por la acción de las enzimas proteasas y hialuronidasas, respectivamente. El colágeno tipo III es reemplazado por el de tipo I, con un fenotipo más estable y similar al que tenía la dermis originalmente. La actividad celular disminuye y el tejido conjuntivo cicatrizal se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos, sin folículos pilosos y sin glándulas sudoríparas ni sebáceas. De acuerdo con el tipo de lesión la dermis recupera o no la composición previa a la lesión y la reparación de la herida se considera finalizada.

### **1.3 Características generales de los equivalentes de tejidos**

La Ingeniería de Tejidos o Ingeniería Tisular se puede definir como el área científica interdisciplinar cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, soportes (*scaffolds*) y la manipulación del entorno extracelular para la creación de sustitutos biológicos para la implantación en el cuerpo [26] que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido [27], [28], como se puede ver en la Figura 1-2:.

Los elementos claves de la Ingeniería de Tejidos, además del conocimiento previo de la fisiología *in vivo*, son: selección células apropiadas (autólogas o alogénicas) que generen el tejido deseado, una matriz extracelular que pueda soportar la proliferación de las células y un ambiente controlado que favorezca la proliferación y diferenciación celular de las estructuras del tejido [9], [26] lo que permitirá la reproducción de dichas condiciones y constituye la fisiología *in vitro* [25]. La Ingeniería Tisular ha combinado el uso de materiales sintéticos y biológicos con el cultivo de células *in vitro* para generar tejidos funcionales. El

punto clave está en la expansión de las células ya que se requieren cantidades altas de células, sumado a que se necesita un microambiente químico y mecánico que preserven el fenotipo normal y la funcionalidad [21], en lo cual ha venido ganando aceptación el uso de biorreactores.



**Figura 1-2:** Elementos básicos en Ingeniería de Tejidos. La interrelación entre las células, el soporte y el microambiente extracelular conducen a la generación de un implante; la interrelación de estos elementos es fundamental para la Ingeniería Tisular.

Esta nueva área del conocimiento debe resolver grandes desafíos y garantizar ciertas características a la hora de generar un equivalente cutáneo, los más importantes son: [3]

- Ausencia de antigenicidad.
- Compatibilidad tisular.
- Ausencia de toxicidad local o sistémica.
- Impermeabilidad a microorganismos exógenos.
- Transmisión de vapor de agua similar a la piel normal.
- Adherencia rápida y sostenida a la superficie afectada.
- Elasticidad que permita el movimiento del tejido.
- Resistencia a esfuerzos normales y cortantes.
- Esfuerzo a tensión que resista la fragmentación.
- Inhibición de crecimiento de microorganismos patógenos en la zona afectada.
- Biodegradabilidad, bajo costo, mínima molestia del paciente.
- Color y apariencia adecuados.

14 Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

- Reducción en el tiempo de cicatrización.

A lo largo de los últimos años se han realizado ingentes esfuerzos para desarrollar equivalentes que cumplan con todas estas características; sin embargo, no se cuenta con un desarrollo que reúna todas las exigencias mencionadas. Los equivalentes desarrollados se pueden agrupar en dos grandes grupos: acelulares y celulares, dependiendo de la presencia o ausencia de células; también se pueden clasificar en dérmicos (si mimetizan sólo la dermis), epidérmicos (si mimetizan sólo la epidermis) y completos (si mimetizan la dermis y la epidermis), como se puede ver en la Tabla 1-1.

**Tabla 1-1:** Comparación de distintos equivalentes dérmicos y epidérmicos disponibles en el mercado.

Producto comercial	Compañía	Características	Referencias
<b>Equivalentes Epidérmicos</b>			
Epicel®	Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA, USA	Lámina de poliuretano sobre la cual se cultivan queratinocitos autólogos obtenidos a partir de una biopsia del paciente.	[6] [21]
Epidex™	Modex Therapeutiques, Lausanne, Suiza	Queratinocitos obtenidos a partir de células presentes en el folículo piloso, cultivados sobre una membrana de silicona.	[12]
Myskin™	Celltran Ltd, Sheffield, Inglaterra	Queratinocitos autólogos cultivados sobre fibroblastos murinos irradiados y luego	[12]

		depositados sobre un hoja de silicona.	
Recell®, CellSpray	Clinical Cell Culture Ltd, Perth, Australia	Fibroblastos, queratinocitos y melanocitos autólogos aislados mediante tripsinización, separación celular y filtración que son dispersados mediante spray sobre la herida.	[21] [29]
LaserSkin	Fidia Advanced Biopolymers,	Cultivo de queratinocitos autólogos sobre membrana semi-sintética microporosa derivada del ácido hialurónico	[23], [26]
BioSeed®-S	BioTissue Technologie, Freiburg, Alemania	Gel a base de fibrina alogénica, en el cual se suspenden queratinocitos humanos autólogos	[26], [30]
<b>Equivalentes Dérmicos</b>			
Alloderm ®	LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, USA	Alogénico, obtenido a partir de dermis humana liofilizada	[15] [21]
Dermagraft ®	Advanced BioHealing Inc, New York, USA	El soporte esta fabricado con ácido poliglicólico y poliláctico con fibroblastos alogénicos	[21] [22]
Integra ®	Integra NeuroSciences Corp, Plainsboro, NJ, USA	Consta de una lámina externa de silocona y una interna de colágeno bovino y condroitín-6-sulfato	[5] [12] [23] [22]

16 Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

Matriderm®	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck, Alemania	Dermis bovina liofilizada no entrecruzada cubierta con $\alpha$ -elastina hidrolizada	[21]
Transcyte	Advanced Tissue Sciences	Compuesto por fibroblastos alogénicos cultivados sobre una malla de nylon® recubierta con gelatina	[15], [23]
<b>Equivalentes Completos: Dérmicos/epidérmicos</b>			
Apligraf®	Organogenesis Inc, Canton, Massachusetts, USA	El soporte está fabricado con colágeno bovino (tipo I) y fibroblastos y queratinocitos alogénicos	[21] [12]
Orcel®	Ortec International Inc, New York, USA	El soporte está fabricado con colágeno bovino (tipo I) y fibroblastos y queratinocitos alogénicos	[21]
Poliactive	HC Implants BV, Leiden, Países Bajos	Matriz biodegradable compuesta de óxido de etileno y tereftalato de polibutileno	[31]

A pesar del amplio abanico de productos ofrecidos para el tratamiento de lesiones en la piel, ninguno de ellos pueden reemplazar todas las estructuras y funciones de la piel nativa [15]. Algunos de estos productos usan componentes xenogénicos, otros son acelulares y hacen el proceso de regeneración más demorado y finalmente su comercialización en el país para todos los pacientes es difícil. Por esta razón, el presente proyecto de investigación busca el desarrollo de un equivalente que permita ofrecer una solución a los pacientes del país que requieran una solución rápida para la pérdida de piel.

Aunque se pudiera concluir que la presencia de células autólogas es más favorable para la reparación de la herida, se ha demostrado que los injertos que contienen células alogénicas cubren la herida y suplen factores de crecimiento que facilitan la reparación de la misma, pero las células no persisten en el paciente y se cree que dichas células son reemplazadas por las del propio paciente dentro de 1 a 6 semanas luego de implantado el equivalente [15].

El uso de soportes acelulares puede proveer un avance en el tratamiento de la herida y puede contribuir en la reparación al proveer un espacio temporal para la remodelación y liberar factores necesarios en dicho proceso [25]. Adicional al desarrollo de equivalentes de tejidos, también se han desarrollado apósitos como [23]: biobrane® (filamentos de nylon con péptidos de colágeno porcino tipo I recubierta de una lámina de silicona porosa), Opsite®, Tegaderm®, Omiderm® (membranas a base de poliuretano), allevyn® (capa de espuma de poliuretano unida a una película semipermeable de poliuretano), Aquacel® ( apósito compuesto de fibras de carboximetilcelulosa sódica), geles de Intrasite® (hidrogel amorfo y transparente, formado por cadenas poliméricas entrelazadas de carboximetilcelulosa) y Duoderm® ( gel de carboximetilcelulosa sódica y pectina en un vehículo de agua y propilenglicol), Duoderm CGF® (apósito estéril con matriz elastomérica compuesta por gelatina, pectina, carboximetilcelulosa y poliisobutileno con una película externa compuesta por espuma de poliuretano), Sorbsan® (alginato biodegradable) y Quitosana® (apósito a base de quitosán).

## **1.4 El soporte tridimensional**

### **1.4.1 Necesidad del soporte tridimensional**

El concepto de la utilización de un andamio tridimensional para incrementar la velocidad de cicatrización nació como resultado del estudio durante muchos años del comportamiento de los injertos de tejidos, los cuales mostraban la urgencia de llenar un espacio que era ocupado inicialmente por una estructura tisular organizada y que ahora se perdía parcialmente. El llenado espontáneo de ese espacio en general se hacía por la aproximación de los bordes como consecuencia de la proliferación fibrilar a partir de la hiperfunción de los fibroblastos, cambiando la morfología y la estética del sitio afectado. La

colocación de material de relleno autólogo mostraba mejores resultados, pero con el inconveniente de tener un sitio quirúrgico adicional que en muchas ocasiones no era suficiente. Se requería entonces el llenado de un espacio con células y matriz activa que no fuera reconocido como extraño por el lecho cicatrizal y que se incorporara rápidamente en la dinámica proliferativa tisular normal. Por eso se pensó en imitar la estructura tridimensional de los tejidos, colocando un soporte que diera posibilidad de crecimiento y proliferación a las células propias del tejido, y que junto con su matriz pudiera rápidamente incorporarse en el proceso reparativo. La proliferación de fibroblastos, por ser células anclaje-dependientes, requiere el uso de superficies sobre las cuales se presente la adhesión y expansión celular. Aparte de servir como soporte, la matriz debe dirigir el crecimiento celular tanto de los tejidos adyacentes (una vez implantado) o de las células sembradas en él (durante el crecimiento *in vitro*), garantizar la diferenciación celular y en algunos casos favorecer la migración celular [25]. Aparte de lo anterior, el material debe tener propiedades mecánicas estables similares a la piel nativa, promover la regeneración dérmica y epidérmica, prevenir la infección bacteriana, degradarse a una velocidad similar a la cual se repara el tejido, adherirse al sitio de la herida, servir de barrera protectora que prevenga la deshidratación, y especialmente, mantener la comunicación entre la epidermis y la dermis [6].

#### **1.4.2 Características de los materiales empleados**

Un material es considerado seguro para su uso *in vivo* si es biocompatible, además considerando que servirá de soporte debe ser bioestable y biodegradable [32]. Sin embargo, aparte de la biodegradabilidad y biocompatibilidad, otro aspecto fundamental que debe ofrecer un material para que sea apto para la Ingeniería Tisular es la capacidad de generar una amplia superficie sobre la cual las células se adhieran, permanezcan viables y puedan proliferar. La adhesión celular es crítica para la supervivencia de las células porque este fenómeno precede a la proliferación, migración y diferenciación celular [33]. Una vez adheridas las células al soporte proliferan sobre y dentro del mismo, secretando su propia matriz extracelular, generando la organización propia del tejido, mientras el soporte es degradado lentamente [34]. La selección del material debe ser tal

que la velocidad de degradación del material empleado en su fabricación sea igual a la velocidad de síntesis de la matriz extracelular.

La generación de la matriz extracelular dentro del soporte se ve facilitada por la porosidad e interconectividad de los poros de dicho soporte, que favorezcan la difusividad de nutrientes y oxígeno y eviten la acumulación de subproductos del metabolismo celular en el interior del mismo. Además, la porosidad contribuye con “espacio vacío” que puede ser ocupado por las células y la matriz recién secretada. Una porosidad del 95-97% contribuye con la estabilidad estructural, provee suficiente área superficial y permite a las células adherirse, además de poseer el espacio libre para una adecuada difusión de nutrientes y migración celular. Sin embargo, una porosidad tan alta puede conducir a la disminución de la resistencia del material, por lo cual un balance entre estas propiedades es requerido. El tamaño de poro es un parámetro fundamental que se debe tener en cuenta en la generación de la matriz; Seal et al. [6] encontraron que el intervalo de tamaño de poro de los soportes para piel debe estar entre 20 y 125  $\mu\text{m}$  con el fin de limitar la contracción de la herida y la formación de cicatriz.

### **1.4.3 Generalidades de los materiales evaluados**

Aunque son muchos los materiales que se han evaluado para la generación del soporte temporal de las células [22], [31], [35], [36], la experiencia con estos materiales ha llevado a preferir los materiales biocompatibles y biodegradables porque una vez que se implantan el equivalente en el organismo dichos materiales se puede absorber y ser reemplazados progresivamente por el neo-tejido del paciente [28], gracias a esto no se requiere removerlos y se realiza solamente un acto quirúrgico en el paciente.

Típicamente, los biomateriales han sido agrupados en 3 grupos: cerámicos (hidroxiapatita y fosfato tri-cálcico), polímeros sintéticos (poliestireno, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros) y polímeros naturales (proteínas -colágenos, gelatina, albúmina y fibrinógeno-, polisacáridos -quitosan, ácido hialurónico, alginato, celulosa y dextrano-) [26], [27]. Los materiales cerámicos tienen el inconveniente de tener una tasa de bioabsorción impredecible, mientras que los materiales poliméricos poseen gran cantidad de grupos químicos disponibles, bajo peso y ductibilidad, flexibilidad y tasa

de biodegradación controlable. A su vez, los soportes poliméricos sintéticos ofrecen unas mejores propiedades mecánicas y una menor variabilidad entre lotes, mientras que los soportes naturales proveen un mejor ambiente para la adhesión y señalización celular, que se traduce en una excelente regulación de las estructuras y funciones [37], además de proveer una baja toxicidad y menor respuesta inflamatoria crónica. A la fecha, polímeros naturales como ácido hialurónico, quitosan, alginato, colágenos y fibrina son los materiales más importantes para la fabricación de soportes [37].

De todos los materiales evaluados, el más ampliamente usado para la generación de equivalentes dérmicos es el colágeno tipo I [15], [26], que se puede contrastar con la Tabla 1-1. En cuanto al origen del colágeno, puede ser obtenido a partir de piel cadavérica, tendón o piel bovina o porcina [22], sin embargo, existe la posibilidad de obtenerlo vía recombinante expresando genes humanos en levaduras [38] cuya comercialización la realiza la empresa Fibrogen ([www.fibrogen.com](http://www.fibrogen.com)) con costos cercanos a 1,500 US\$/ gramo, que es exageradamente alto para el desarrollo de tejidos en Colombia. Una de las preocupaciones más importantes, por el uso de colágeno xenogénico, es el riesgo por la transmisión de virus y priones [39], por lo cual la FDA (Food and Drug Administration) establece que el colágeno xenogénico debe tener un bajo riesgo de transmisión de dichos elementos para evitar la encefalitis espongiiforme [22].

Sobre el colágeno las células son capaces de proliferar *in vitro* e *in vivo* y adaptarse al organismo en el cual se implantan [31], [36]; desafortunadamente el alto costo para obtener y mantener organismos vivos en condiciones ambientales controladas, sumado al hecho de generarse un constructo xenogénico con la posibilidad de transmitir virus y priones provenientes de animales hacen que este material busque ser reemplazado por otros. Hacia el futuro se prevé que los materiales que se utilicen para éstos constructos deben ser seguros sin que exista riesgo alguno para los pacientes, por lo cual se propone que en los próximos años no se usen derivados de animales para la fabricación de los soportes que serán utilizados en pacientes [22], [40]. A partir de estas observaciones, la fibrina emerge como uno de los materiales con mayores posibilidades.

### 1.4.4 Fibrinógeno

La sangre puede ser agrupada en dos grandes grupos: componente celular y plasma sanguíneo [41]. El componente celular está compuesto principalmente de eritrocitos o glóbulos rojos, leucocitos o glóbulos blancos y trombocitos o plaquetas. El plasma sanguíneo es una mezcla de varios metabolitos, proteínas y lipoproteínas suspendidos en una solución salina compleja; estos componentes pueden estar presentes hasta un 8 o 9% en peso del plasma, siendo el resto agua [42]. La composición del plasma sanguíneo es básicamente proteínas (7%), agua (90-91%) y una variedad de sales (cloruro de sodio en concentración fisiológica, buffers como bicarbonato, metales como calcio, cobre, hierro) y otros compuestos de bajo peso molecular (carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, hormonas, ácidos grasos, lípidos y triglicéridos, ácidos biliares, urea, amoníaco, entre otros) cuya concentración no supera el 1%; las proteínas del plasma se pueden dividir en tres fracciones principalmente: albúmina (cerca del 42% p/v), globulinas (56%) y fibrinógeno (1%); otras proteínas (fibronectina, lipoproteínas, etc) representan menos del 1% del total de proteínas contenidas en el plasma [43]; [41]; [44].

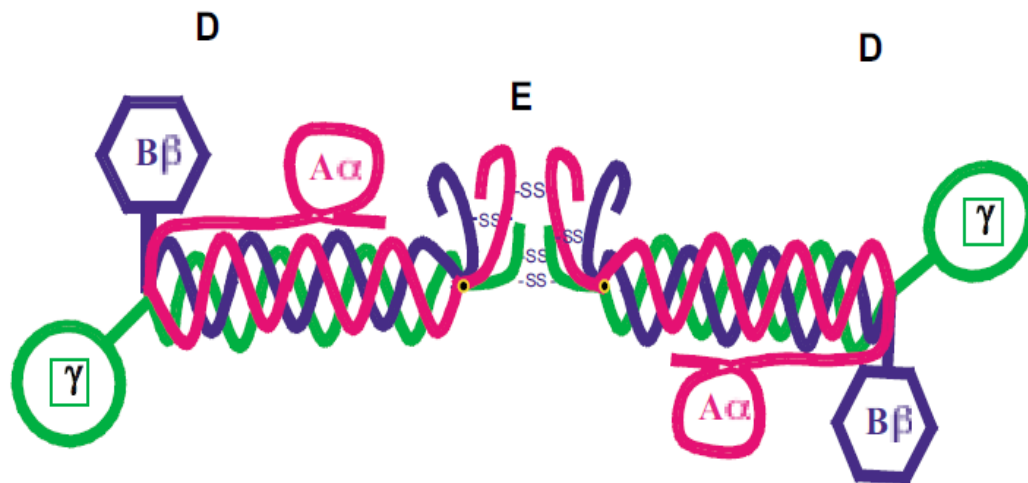
En cuanto al peso molecular de las moléculas presentes en el plasma, los más pequeños de los solutos son los iones de sales inorgánicas disueltas y disociadas con un peso molecular de unos pocos Daltons (Da) de peso molecular; las moléculas metabólicas (glucosa, úrea y aminoácidos) tienen peso molecular del orden de cientos de Da y corresponden al 1% del plasma en peso; las proteínas del plasma son una gran variedad que tiene rangos de peso molecular que varía desde diez mil hasta millones de Da y constituyen cerca del 7% del plasma en peso [42].

- Estructura del Fibrinógeno

Debido a su origen, el fibrinógeno se ha convertido en un material con amplia aplicación en el campo de la Ingeniería de Tejidos. El fibrinógeno es una glicoproteína con estructura globular y fibrosa que corresponde al Factor I de la cascada de coagulación y está formado por dos subconjuntos proteicos consistentes de tres cadenas, denominadas  $(A\alpha)_2$ ,  $(B\beta)_2$  y

( $\gamma$ )<sub>2</sub> unidas mediante puentes disulfuro creando la estructura molecular dimérica [45], corresponde al Factor I de la cascada de coagulación (ver Figura 1-3).

La parte central de la molécula, denominada región E, contiene un nitrógeno terminal en todas las seis cadenas, las cuales se entrelazan y forman  $\alpha$ -hélices unidas por puentes disulfuro, manteniendo el dominio D en el extremo y las cadenas B $\beta$  y  $\gamma$  en los extremos de este dominio [46]. Las cadenas (A $\alpha$ ) consisten de 610 aminoácidos, las (B $\beta$ ) de 461 y las ( $\gamma$ ) de 411 [46]. En consecuencia el fibrinógeno humano consta de 2.964 aminoácidos con un peso molecular de 329,818 kDa; además, posee 4 grupos de carbohidratos, uno en cada cadena B $\beta$  y  $\gamma$ , que contribuye con otros 10 kDa para dar un valor aproximado de 340 kDa [46]. El fibrinógeno es sintetizado principalmente en el hígado en cantidades de 1,7-5 g por día para mantener una concentración normal de fibrinógeno en la sangre de 2,5 – 3,0 mg / ml [46]. El fibrinógeno es un zimógeno que viaja en el torrente sanguíneo y cuando se requiere la coagulación de la sangre se activa a través de la cascada de coagulación, en la cual trombina (Factor IIa) hidroliza los fibrinopéptidos AA y BB, el uno de 13 y el otro de 14 aminoácidos que están en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno; esto induce la polimerización del fibrinógeno de forma vertical, mientras que la polimerización horizontal causa la unión covalente entre dos moléculas de fibrinógeno por el factor XIIIa para formar un coágulo insoluble de fibrina polimerizado [47] [48] [49]. El grado de asociación lateral de dichas fibrillas conduce a la estabilización del gel mediante entrecruzamientos covalentes entre grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina de una cadena y residuos de glutamina de cadena adyacente. Dicha reacción depende de las condiciones en las cuales ocurra la formación de la fibrina, incluyendo pH, fuerza iónica y concentración de trombina y fibrinógeno, con ello se pueden obtener fibras con diámetros de 10 a 200 nm [50]. La conversión de fibrinógeno en fibrina, durante el taponamiento de una lesión se realiza a través de una serie de reacciones bioquímicas conocida como cascada de coagulación.

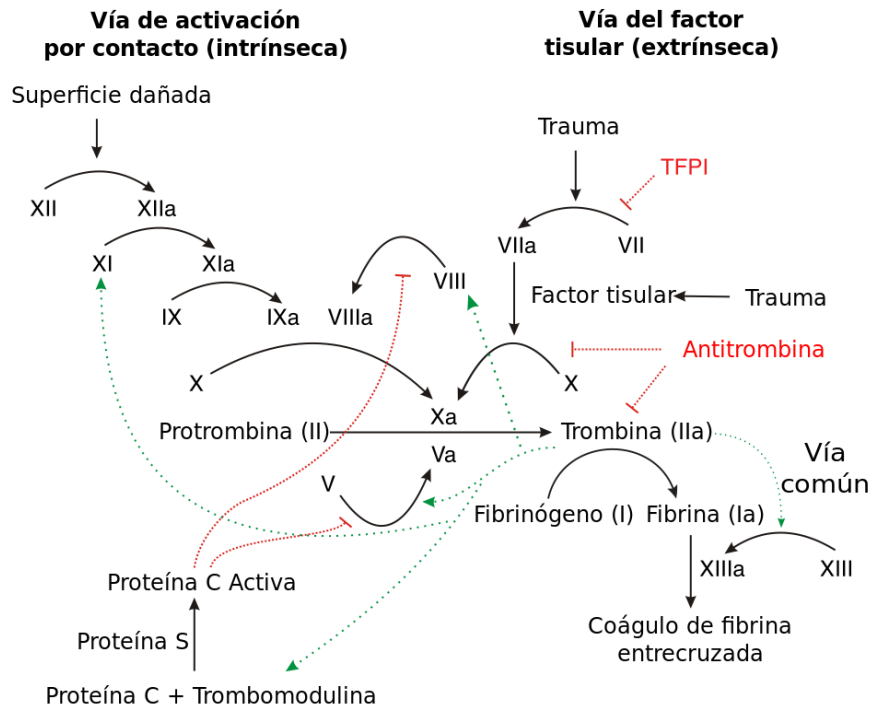


**Figura 1-3:** Estructura del Fibrinógeno. En esta figura se puede apreciar dos subconjuntos proteicos consistentes de tres cadenas, denominadas  $(A\alpha)_2$ ,  $(B\beta)_2$  y  $(\gamma)_2$  unidas mediante puentes disulfuro. Fuente: [51].

- Cascada de coagulación

La hemostasia es un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular [53]. Este proceso se realiza a través de tres mecanismos superpuestos: vasoconstricción, formación del tapón plaquetario y activación de la cascada de coagulación.

La cascada de coagulación es una serie de reacciones que se suceden para transformar el fibrinógeno, proteína soluble del plasma, en fibrina, proteína insoluble [54], [53]. La trombina es la enzima clave de la cascada de coagulación, ya que se encarga de la activación de plaquetas, conversión de fibrinógeno en fibrina y la retroalimentación de la amplificación de la coagulación [55].



**Figura 1-4:** Cascada de Coagulación, en la cual se aprecian las reacciones necesarias para la transformación del fibrinógeno en fibrina. Fuente: [54].

Hasta hace algunos años se consideraban dos vías para la formación del trombo: la vía extrínseca (participan el factor tisular y factor VII) y la vía intrínseca (participan los factores XII, XI, IX, VIII y V), ambas vías convergen para activar el factor X y continuar conjuntamente el proceso de transformación de la protrombina en trombina y a través de la trombina del fibrinógeno en fibrina [56], como se puede apreciar en la Figura 1-4. Esta visión clásica no da mayor importancia a la plaqueta, pero en la visión moderna de la cascada la plaqueta contribuye de manera considerable hasta el extremo de considerar la formación de fibrina como el resultado de dos procesos: coagulación (representados por trombina) y actividad de la plaqueta [56], [57].

La teoría clásica de la coagulación establece que cuando se presenta una herida, las plaquetas se tienden a aglomerar y a adherir al colágeno y a microfibrillas del endotelio de los vasos sanguíneos, para formar el tapón hemostático que sella temporalmente la herida [52]. El factor Xa de la cascada de coagulación puede degradar la molécula de protrombina

(factor II), cuya actividad se ve aumentada cuando se une a los fosfolípidos de la membrana y en presencia del factor Va y calcio (complejo activador de la protrombina). El calcio es el elemento que aglutina los factores sobre la capa de fosfolípidos, lo que permite la interacción entre la enzima (factor Xa) y el sustrato (factor II), facilitado por el cofactor (factor Va). La sucesiva degradación de la molécula del factor II genera, finalmente, un fragmento que es la trombina (factor IIa). La trombina es una serín-proteasa que cataliza específicamente la ruptura de cuatro enlaces peptídicos arginina-glicina de la molécula de fibrinógeno, con la consiguiente liberación de cuatro fibrinopéptidos, un péptido de 18 residuos de cada una de las cadenas  $A\alpha$  y otro de 20 residuos de cada cadena  $B\beta$ . La liberación de estos cuatro fibrinopéptidos conduce a la formación del monómero de fibrina, cuya subunidad estructural es  $(\alpha\beta\gamma)_2$  [45]. El polímero fibroso inicial, producido por la agregación espontánea de los monómeros de fibrina, se estabiliza mediante entrecruzamientos covalentes entre grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina de una cadena y residuos de glutamina de la cadena adyacente. Esta reacción de transamidación está catalizada por una transglutaminasa conocida como factor XIIIa. El factor XIII, zimógeno inactivo, se convierte en su forma activa, factor XIIIa, gracias a la acción de la trombina. Por tanto, la trombina estimula la coagulación sanguínea bien catalizando la conversión del fibrinógeno en fibrina o también por la activación de la enzima que cataliza la primera activación del factor XIII [45], [53].

Según la visión actual, la coagulación se produce en tres etapas interrelacionadas [54], [55]:

- Fase de iniciación: Tiene lugar a nivel de los tejidos con células productoras de factor tisular como fibroblastos o monocitos y conlleva a la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina, suficientes para iniciar el proceso de coagulación. El factor VIIa y el factor tisular son elementos esenciales en el inicio de los procesos de hemostasia. El factor VII circula en la sangre predominantemente como molécula inactiva y sus funciones a las concentraciones fisiológicas son virtualmente nulas en ausencia de su cofactor. El factor tisular (FT) no está en contacto con elementos de la sangre, la célula que lo produce (fibroblasto, miocito, célula mono nuclear, macrófago) se encuentra fuera del sistema vascular hasta que exista pérdida de la integridad del mismo. La interacción

entre el factor tisular y el factor VIIa es el proceso fundamental en la iniciación de la coagulación; tal interacción incrementa la actividad del factor VII. El complejo FVIIa/FT activa a los factores X y IX, y el factor Xa formado es capaz de generar pequeñas cantidades de trombina de manera local. Tradicionalmente se ha considerado que a pesar de que el paso inicial de la coagulación se produce de manera continua, esto no conduce a la formación de coágulos, ya que las reacciones y sus productos se encuentran afuera de la vasculatura y de otros elementos esenciales del sistema; la interacción de unos con otros requiere de una pérdida de integridad de la pared de los vasos.

- Fase de amplificación: se traslada a la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada y acumulan factores y cofactores en su superficie, permitiendo el ensamblaje necesario para que tengan lugar las reacciones enzimáticas. La fase de amplificación es dependiente de la presencia de membranas plaquetarias activadas y de la interacción de éstas con los factores de la coagulación, especialmente con las cantidades limitadas de trombina que se generan en la vecindad de la célula portadora de factor tisular. Las plaquetas se activan y degranulan, al tiempo que se adhieren y agregan formando un tapón en el vaso dañado. Aunque es insuficiente para la formación de un coágulo, la pequeña cantidad de trombina producida por la vía VIIa/FT, durante la fase de iniciación, es esencial para amplificar el proceso. La trombina es un ávido reclutador de plaquetas y retroalimenta de manera positiva al sistema al poseer la capacidad de activar a los factores V, VIII y XI. La fase de propagación también se caracteriza por la activación del sistema de retroalimentación negativa a través de los anticoagulantes naturales: VIFT, antitrombina III y proteína C, cuya función es importante en regular los procesos pro-coagulantes. Finalmente el complejo IXa/VIIIa se ensambla en la superficie plaquetaria y genera grandes cantidades de factor X; parte de este complejo se ensambla en la célula portadora de factor tisular y puede difundir a la superficie plaquetaria, dada su resistencia relativa a los efectos de anticoagulantes naturales.

- Fase de propagación: se presenta un cambio de locación de los procesos que lleva a la generación de la trombina, de la célula portadora de factor tisular a la plaqueta activada. La presencia de fosfolípidos en la membrana plaquetaria activada permite el ensamblaje del complejo IXa/VIIIa. Grandes cantidades de trombina se producen durante esta fase resultando en la escisión proteolítica del fibrinógeno y formación de monómeros de fibrina que se polimerizan para consolidar el coágulo inestable inicial de las plaquetas en un coágulo firme de fibrina. La trombina a su vez activa al factor XIII y al inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (IFAT) con efectos positivos adicionales en la estabilidad del coágulo y en la resistencia a los efectos de la plasmina.

En condiciones normales el propósito del coágulo de fibrina es taponar el vaso lesionado y contribuir con la reparación de la zona lesionada. Durante el proceso de cicatrización se debe dar una digestión progresiva de la fibrina, proceso conocido como fibrinólisis. La fibrina finalmente es digerida por plasmina, la cual circula como un zimógeno conocido como plasminógeno, y se activa por las serín-proteasas de la cascada de coagulación. Los productos de degradación de la fibrina (PDF) o del fibrinógeno, o de ambos, en el plasma del paciente indican aumento de la actividad fibrinolítica [53]. El dímero D es un marcador específico de la fibrinólisis, que se utiliza a nivel de laboratorio e implica la degradación por plasmina de la fibrina.

Cuando fibrina es utilizada como soporte para el crecimiento celular, la fibrinólisis termina siendo un problema importante. Así por ejemplo, los geles obtenidos a partir de TisseI® o Tissucol® tienden a contraerse y desintegrarse *in vitro* e *in vivo* después de unos días y se disuelven completamente dentro de 4 semanas [47]. Para evitar lo anterior, en los cultivos *in vitro* se suelen emplear agentes antifibrinolíticos que inhiben la acción de la plasmina, tales como aprotinin (Trasylol™), ácido  $\epsilon$ -aminocaproico y ácido tranexámico (Cyclocapron®). Aprotinin es un inhibidor de serín-proteasas que inhibe a plasmina; en tanto que el ácido tranexámico es un antifibrinolítico que competitivamente inhibe la activación de plasminógeno a plasmina, ya que bloquea la lisina presente en el sitio activo de la plasmina, permitiendo que los constructos generados perduren por más tiempo sin un cambio apreciable en sus propiedades [56], [57], [58], [59], [60]. El ácido  $\epsilon$ -aminocaproico

es un análogo de la lisina que compite inhibiendo la unión entre plasmina y plasminógeno a la fibrina [47], [50], [61].

El uso de ácido tranexámico está reportado como suplemento del medio de cultivo [60], mientras que otros prefieren adicionarlo a los geles durante la formación de los mismos [57], [58], [59] o adicionar el ácido a los geles una vez formados [62].

- Gelificación del fibrinógeno.

Un gel es la suspensión o dispersión coloidal formada cuando una sustancia líquida insoluble se dispersa en una fase sólida [63]. Cuando los geles son capaces de retener en su estructura tridimensional moléculas de agua, reciben el nombre de hidrogeles, los cuales son redes de polímeros hidrofílicos que pueden absorber desde un 10-20% hasta varios miles de veces su propio peso seco en agua, pueden ser químicamente estables o ser disueltos y desintegrados, dependiendo el tipo de aplicación para la cual se requieran [64].

Dicha estructura y microambiente generados son bastante similares al ambiente natural de los tejidos vivos, por lo cual los hidrogeles son útiles para una variedad de aplicaciones biomédicas; porque permiten incorporar algunas sustancias que contribuyen fundamentalmente en la regeneración del tejido como los ligandos peptídicos que actúan como receptores de la membrana celular y que estimulan la adhesión, proliferación y crecimiento celular [65], [66]; por otro lado, los hidrogeles facilitan la difusión de nutrientes y desechos en la matriz extracelular, pueden ser gelificados a temperatura corporal *in situ*. Dentro de las desventajas que presentan se pueden mencionar la dificultad de manipulación, baja resistencia mecánica y dificultad para la esterilización. Inicialmente se emplearon para encapsular células y recientemente se han vuelto interesantes para la generación de matrices para la reparación y regeneración de una amplia variedad de tejidos y órganos [64]; también, durante la cicatrización los hidrogeles proveen una cobertura húmeda que protege la herida de la infección [6]. Dentro de los polímeros que

se han evaluado por su capacidad para gelificar sobresalen: colágeno, quitosano, fibrinógeno, polietilenglicol y polipropilén fumarato [6], [35], [64].

En general, el proceso de gelificación depende de cuatro variables que son: temperatura, concentración, fuerza iónica y pH; sin embargo, en sistemas biológicos en los cuales la gelificación se produce por la acción de enzimas el estudio se ha extendido también a la concentración de la enzima. En el caso del fibrinógeno, la gelificación depende fundamentalmente de la concentración de fibrinógeno, trombina y calcio, pH y fuerza iónica que pueden favorecer la unión lateral de las moléculas de fibrinógeno [47], [50], con lo cual se pueden generar dos tipos de geles: finos y gruesos. Los geles finos consisten de un alto número de fibras delgadas y unidas compuestas de protofibrillas que generan un gel transparente y rígido con pequeños poros; en contraste, los geles gruesos están compuestos por fibras gruesas formadas por la unión lateral de agregados de protofibrillas que conducen a la formación de un gel turbio con un tamaño de poro mayor [47], [48]. Se ha demostrado que un aumento en la fuerza iónica produce fibrina de estructura más compacta de mayor turbidez y rigidez, de porosidad marcadamente disminuida que la fibrina obtenida a menor fuerza iónica [51].

La gelificación del fibrinógeno ha sido estudiada por varios grupos de investigación. Zhao et al. [67] evaluaron el efecto de la concentración de trombina (0.5 UT/ml-10 UT/ml) sobre la velocidad de gelificación y encontraron que existe una relación inversa entre la concentración de trombina y el tiempo de gelificación, es decir, en la medida en que aumenta la concentración de trombina disminuye el tiempo de coagulación debido al aumento de la enzima entrecruzante de la fibrina; también encontraron que estructuras más fibrosas y con fibras más delgadas se obtienen cuando la concentración de trombina es alta y a una mayor concentración de trombina se consigue un mayor entrecruzamiento del gel, lo que conlleva a un aumento en la capacidad de resistir la deshidratación. Por otro lado, Rowe [61] mezcló células de músculo liso de aorta de rata en concentración  $1 \times 10^6$  células/ml, las cuales se suspendieron en fibrinógeno bovino con concentración 2 mg/ml y diversas concentraciones de trombina 1.0, 0.1, 0.01 y 0.001 UT/ mg fibrinógeno, suplementada con ácido  $\epsilon$ -amino-caproico (un inhibidor de plasmina), las condiciones de gelificación fueron de 3 h y 37 °C. Los resultados muestran que la mejor concentración de trombina es 0.001 UT/mg fibrinógeno, donde se presenta el valor más alto del esfuerzo

último a tensión (38.6 kPa); sin embargo, la compactación del gel fue demasiado alta y en el día 7 de cultivo, el volumen era cercano al 5% del volumen original.

La obtención de un equivalente autólogo a partir de fibrina puede requerir la concentración o aislamiento de trombina humana. En esta vía, Haisch et al [68] presentan una alternativa para aislar la trombina del propio paciente mediante cromatografía de intercambio iónico y diálisis, y concluyen que a partir de 200 ml de plasma sanguíneo es posible conseguir trombina con actividad de 51 NIH/ml a 414 NIH/ml (58.65 UT/ml a 476.1 UT/ml, usando un factor de conversión de 1.15, factor recomendado por *National Institute for Health* (NIH)).

En cuanto al comportamiento reológico Eyrich et al [47] realizaron reología dinámica con miras a optimizar el gel, y encontraron que las mejores condiciones de gelificación son: 50 mg de fibrinógeno/ml, 20 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.0; si la concentración es mayor que 25 mg de fibrinógeno/ml el gel tiene apariencia transparente y es estable en el cultivo de condrocitos durante el tiempo del ensayo (3 semanas); si la concentración de calcio es menor a 20 mM resultan ser opacos.

- Uso de fibrinógeno en Ingeniería de Tejidos.

La aplicación de fibrina en Ingeniería de Tejidos se puede considerar en varios campos: como material para el soporte celular (sola o mezclada con otros materiales) y como sistema de liberación de factores de crecimiento u otros agentes terapéuticos [47]. De hecho, el uso de fibrinógeno en aplicaciones biomédicas no es algo reciente, Laboratorios Baxter tiene en el mercado dos productos Tissucol® y Tisseel® que son fibrinógeno humano purificado que se emplea como sellante en cirugía [69], [70], en el cual la concentración de fibrinógeno es 50 mg/ml y la de trombina es 100 U/ml con un sistema de 2 jeringas [71]. La presencia en fibrina de la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) en las posiciones A $\alpha$  95-97 (RGD-1) y A $\alpha$  572-574 (RGD-2) [72], la cual presenta gran afinidad por los receptores de integrina presentes en varios tipos de células, como fibroblastos, permite que haya adhesión celular sobre su superficie.

El fibrinógeno ofrece algunas propiedades que son importantes en los materiales empleados en Ingeniería de Tejidos tales como una favorable interacción con células en procesos como la distribución, adhesión y señalización plaquetaria, proliferación de fibroblastos y células endoteliales, cicatrización y respuesta inflamatoria; además, es capaz de unirse a proteínas como fibronectina (facilitando su incorporación a la matriz extracelular), factores de crecimiento para fibroblastos (FDF-2,  $\beta$ -FGF) y endotelio vascular (VEDF) que estimulan la angiogénesis y la interleucina-1 $\beta$  que interviene en inflamación [51], [73]. Otra ventaja del uso de fibrina es que mantiene la totipotencialidad de las células epidérmicas, lo que es un requisito para la regeneración permanente [57], además fibrina es capaz de inducir cambios en el fenotipo de fibroblastos humanos en senescencia, lo cual los lleva a seguir proliferando [74]. Además, los constructos de fibrina mantienen la actividad física y biológica de las proteínas durante la aplicación sin inducir respuesta inmune [57]; también la fabricación de dichos geles puede ser manipulada de tal forma que las redes de fibrina pueden ser orientadas de manera que permitan alinear las células durante su crecimiento [34], [50], [75]. Algunos estudios han evidenciado que dentro de los 3 días de aplicación del gel de fibrina se presenta una granulación del tejido con un gran número de células, las cuales son reemplazadas con fibras de colágeno en 1 a 2 semanas después [73]. Adicionalmente se ha demostrado [76] mediante el uso de células estromales mesenquimales cultivadas en geles de fibrina, la expresión de actividad vasculogénica, miogénica, neurogénica, condrogénica y osteogénica, la cual puede ser potenciada mediante el empleo de factores de crecimiento apropiados, lo cual amplía el abanico de aplicaciones de la fibrina en los próximos años en la generación de tejidos. Recientemente, Vavken et al. [77] muestran que es posible obtener una mayor expresión de colágeno en soportes fabricados con bajas concentraciones de fibrina (1-3 mg/ml), esto resulta ser ventajoso porque soluciones de fibrinógeno en concentración cercana a la fisiológica presentarían mejores resultados que una de mayor concentración.

La fuente de fibrinógeno es el plasma sanguíneo humano. Algunos grupos de investigación usan el fibrinógeno comercial distribuido por Laboratorios Baxter, bajo el nombre comercial de Tissucol® o Tisseel®, mientras que otros grupos usan plasma proveniente de plasma de Banco de Sangre, aprovechando la presencia del fibrinógeno para obtener equivalentes autólogos. Llames et al. [57] muestran que el uso de plasma resulta más adecuado que el fibrinógeno purificado en cuanto a costos y tiempo y además, aporta citoquinas, factores

de adhesión y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) que no contiene el fibrinógeno purificado; por otro lado, la capacidad de usar la sangre de los mismos pacientes reduce el riesgo de transmisión de patógenos incluidos los virus. Mazlyzam et al. [39] muestran que con 2 ml de plasma sanguíneo se puede generar 9.6 cm<sup>2</sup> de equivalente dérmico, lo que permite estimar que con una unidad de plasma sanguíneo de 250 ml se alcanzaría a cubrir un área cercana a 1 000 cm<sup>2</sup>, que podría ser el área de una quemadura mediana.

Una de las desventajas de los geles de fibrina es la baja resistencia mecánica, se reporta un esfuerzo último a tensión (UTS: *ultimate tensil stress*) de 133 ± 8.0 kPa, el cual es del mismo orden de magnitud que el reportado en el mismo estudio para los geles de colágeno [19]. Para mejorar la resistencia mecánica se suele hacer el reforzamiento mediante mezclas con otros materiales biocompatibles y biodegradables [34]. Bak *et al.* [75] evaluaron el efecto reológico de adicionar urea y alginato a un medio que contiene fibronectina y fibrinógeno, obtenido a partir de plasma humano mediante precipitación con PEG, con miras a obtener fibras estables mediante extrusión, de tal manera que se mantenga la actividad biológica y las propiedades estructurales. También está reportada la fabricación de soportes de polilactida (PLLA) y fibrina (obtenida a partir de plasma humano), usando la técnica de separación de fases inducida térmicamente y luego polimerización sobre la superficie porosa obteniendo un tamaño de poro del orden de 150 a 350 μm con una porosidad del 93% y logrando que la degradación de dichos geles fuera de 20 días frente a los 3 días que fue el tiempo que tardaron los geles de fibrina sola, usados como testigos [78]. Igualmente se ha mezclado fibrina con ácido poli-glicólico (PGA) para generar esponjas, mediante liofilización, sobre las cuales cultivaron fibroblastos murinos de la línea L929 con miras a obtener un equivalente cutáneo, y encontraron que en los ensayos donde se colocó PGA la proliferación celular y el intercambio de nutrientes fue mejor que en el ensayo control donde no se colocó PGA; esto debido a una menor contracción del gel durante el crecimiento celular cuando hay PGA que cuando no está presente [34]. Otras mezclas de fibrina con polímeros se reportan como una alternativa tecnológica y sobresalen las mezclas con alginato [79], [80], [81], [82], alginato-ácido gulurónico y gelatina [83], k-carragenina-quitosan [84], poliglactina [85],

agarosa [86] y Pluronic® F127 [87], alginato y quitosan [88]. Para evitar la inestabilidad se adicionan los agentes antifibrinolíticos, como se mencionó atrás.

Como se puede ver existe una tendencia actual a mezclar fibrina con otros materiales, principalmente polisacáridos, donde se pueda tener un efecto sinérgico entre la resistencia mecánica que ofrecen dichos materiales y la adhesión celular que ofrece la fibrina.

- Uso de fibrina/fibrinógeno en la generación de equivalentes de piel

El uso de fibrina en la generación de equivalentes de piel se puede clasificar en 3 aplicaciones: formación de equivalente dérmico, equivalente epidérmico y equivalente completo (dérmico y epidérmico). Como una alternativa tecnológica que no implique la purificación del fibrinógeno, varios reportes proponen cultivar fibroblastos y queratinocitos sin necesidad de purificar el fibrinógeno empleando plasma sanguíneo directamente [89], [58], [57], [67], lo que es una ventaja a nivel clínico y reduce significativamente los costos, adicionalmente permite la generación de equivalentes autólogos.

La producción de equivalentes epidérmicos se ha reportado desde hace varios años. Horch *et al.* [90] demostraron en un modelo de experimentación animal porcino que los queratinocitos cultivados sobre geles de fibrina son una excelente alternativa para la cicatrización de heridas. Desde entonces, productos como Tissucol® y Tisseel® han estado ofertados para su aplicación en el cultivo de queratinocitos y como sellante de heridas. Kopp *et al.* [91] realizaron el análisis de las aplicaciones clínicas del cultivo de queratinocitos en matrices de fibrinógeno (usando Tisseel®, Laboratorios Baxter), y encontraron que el cultivo y aplicación de queratinocitos autólogos muestran, a nivel clínico, una capacidad para reepitelizar heridas crónicas. Bannasch *et al.* [92] evaluaron el crecimiento de queratinocitos sobre constructos fabricados con una matriz acelular de Alloderm® (LifeCell Corporation) y una matriz celular preparada con fibrina (Tisseel®, Laboratorios Baxter) en un modelo porcino; con esta metodología lograron una excelente integración histológica y una reducción en la contracción de la herida comparado con el grupo control (queratinocitos atrapados en fibrina). Mediante la encapsulación de

queratinocitos humanos en microesferas de fibrina se encontró un incremento en la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF\_BB) y el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [93].

La formación de equivalentes completos (dérmicos y epidérmicos) en geles de fibrina es más reciente. Llamas *et al.* [57] evaluaron el plasma fresco como soporte para la proliferación de queratinocitos y fibroblastos y encontraron que el plasma fresco resulta adecuado para el crecimiento y proliferación de estas dos líneas celulares; también, evaluaron los equivalentes dérmicos completos autólogos en pacientes con quemaduras hasta por 2 años y encontraron la ausencia de respuesta inmunológica y la integración total del constructo con los tejidos adyacentes en los pacientes. En un trabajo similar, Arvelo *et al.* [58] obtuvieron equivalentes completos empleando plasma fresco usando fibroblastos y queratinocitos y concluyeron que en geles de fibrina los fibroblastos son capaces de sintetizar múltiples factores de crecimiento, similares a los que son producidos y secretados por ellos *in vivo*; igualmente, los geles pueden servir como reservorio de otras sustancias como los factores de crecimiento y antibióticos que favorecen y permiten la correcta cicatrización. Meana *et al.* [89] evaluaron el uso de crioprecipitados de plasma sanguíneo para la formación de geles de fibrina y determinaron la expresión de proteínas membranales como colágeno tipo IV, laminina y queratina durante el crecimiento de fibroblastos y queratinocitos. Zhao *et al.* [67] evaluaron el crecimiento de fibroblastos humanos atrapados en geles de fibrinógeno humano, purificado a partir de plasma sanguíneo, y encontraron una excelente citocompatibilidad. Mazlyzam *et al.* [94] cultivaron fibroblastos y queratinocitos en geles de fibrina fabricados a partir de plasma sanguíneo, sin purificar el fibrinógeno, y mediante pruebas inmunohistoquímicas demostraron que las células expresaron colágeno y queratina en la dermis y epidermis, respectivamente. Weinstein-Oppenheimer *et al.* [95] realizando el cultivo de fibroblastos y queratinocitos de conejo en soportes de gelatina, quitosan, ácido hialurónico y fibrina, encontraron una buena tolerancia por parte de los conejos en lesiones menores al 35% del área corporal.

Varios grupos de investigación, a nivel nacional, han usado fibrina para la generación de equivalentes de piel. Iriarte [59] empleando plasma fresco generó la matriz para el crecimiento de fibroblastos procedentes de biopsias de cirugía y mostró que es posible

reemplazar el suero fetal bovino del medio de cultivo y cambiarlo por plasma fresco; Arango *et al.* [96] reportan la producción de equivalentes de piel usando plasma sanguíneo humano; Franco y Restrepo [97] realizaron el cultivo de fibroblastos y queratinocitos en geles de fibrina autóloga, y encontraron al implantar los equivalentes que se obtiene una buena cicatrización en defectos de fisura palatina.

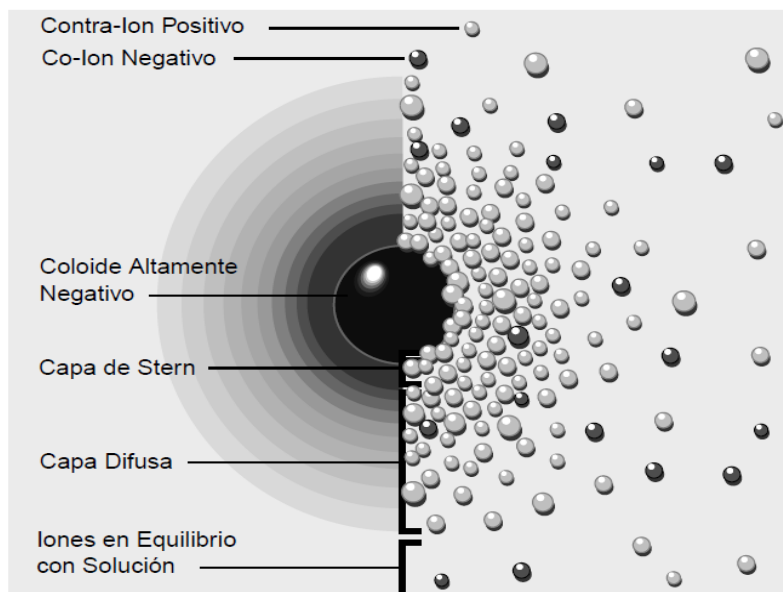
En la actualidad, bajo el nombre comercial de BioSeed-S (Bio Tissue Technologie, Freiburg, Alemania) se comercializan equivalentes epidérmicos y se tienen bajo investigación AcuDress, Alloxx y Cyzact, los cuales están basados en fibrina [26].

## 1.5 Teoría de la doble capa

La teoría de la doble capa eléctrica más conocida como teoría DLVO explica el comportamiento de sistemas coloidales como los geles. Un coloide que puede tener tanto carga positiva como negativa (para este caso se supondrá negativa) atraerá cargas opuestas a la carga que tenga en la superficie (para este caso positivas) y generará una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa formada por los iones de carga opuesta (que reciben el nombre de contra-iones) es conocida como la capa de Stern. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una capa difusa de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. En forma similar, aunque opuesta, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando al coloide. A cualquier distancia de la superficie la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos

se asemejan. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa forman la doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución. La Figura 1-5 muestra el esquema de la doble capa [98].

El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide son un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a la cual estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta ( $\zeta$ ). La alteración de la atmósfera electrónica que rodee la partícula coloidal mediante cambios en la fuerza iónica, pH u otros compuestos activos generará que la partícula pueda coalescer o permanecer en suspensión. La formación de coágulos permite la asociación y formación de estructuras mas organizadas conocidas como geles. Por tanto, la interacción entre las partículas que forman un gel se puede determinar con el potencial  $\zeta$ , entre más alto sea significa que las partículas se encuentran estabilizadas por efecto de las cargas eléctricas de las mismas y no presentarán coagulación; si el potencial  $\zeta$  se acerca a cero indicará que dichas partículas van a coagular y por tanto podrían formar un gel [98].



**Figura 1-5:** Modelo de doble Capa. Un coloide cargado negativamente atrae cargas positivas y genera una capa llamada Capa de Stern; otros iones positivos son todavía atraídos por el coloide negativo, pero algunos son rechazados por la Capa de Stern. Fuente: [98]

## 1.6 Alginato de sodio

Alginato es un polímero natural del tipo polisacárido soluble en agua, obtenido a partir de algas o de microorganismos recombinantes como *Azotobacter vinelandii* [99]. Es un polianión compuesto de 2 unidades monoméricas repetitivas:  $\beta$ -D-manuronato (unidades M) y  $\alpha$ -L-guluronato (unidades G) unidas mediante enlaces  $\beta(1-4)$  [35], [65], [66], [100], [101]. Las propiedades físicas y mecánicas de alginato dependen de la longitud y proporción de bloques de guluronato presentes en la cadena; alginato en solución acuosa forma un hidrocoloide, el cual gelifica ionotrópicamente por la adición de iones divalentes como calcio [102] o bario y es nuevamente solubilizado el gel cuando esos cationes son removidos o secuestrados. Se ha demostrado que la unión del calcio se hace al bloque G [66], generando una estructura repetitiva en la cual la cadena de alginato superior se une a la inferior en los bloques G a través de puentes con el calcio, dando origen a una estructura similar a la de una “caja de huevos” [103]. Alginato ocupa una posición importante dentro de los distintos biopolímeros disponibles para la producción de soportes

inmunoaislantes que previenen la destrucción del injerto por respuesta inmune y favorecen la difusión de nutrientes, oxígeno, factores secretados y productos catabólicos porque cumple con las necesidades de biocompatibilidad e integridad/estabilidad por largo tiempo, no interfiere con la función celular de las células inmovilizadas y finalmente la encapsulación se puede realizar en condiciones ambientales suaves como temperatura corporal, pH fisiológico y soluciones isotónicas [104], [105]. El entrecruzamiento del alginato es instantáneo, tan pronto entra en contacto con los iones divalentes, por lo cual la formación de gotas o micro-gotas que se descargan sobre la solución entrecruzante, ha permitido el atrapamiento de células o proteínas en estructuras esféricas. Para la generación de películas, se suele servir el alginato de sodio y se coloca una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 3.0  $\mu\text{m}$  sobre la cual se adiciona la solución de cloruro de calcio, de tal manera que la solución se difunda y se realice el entrecruzamiento lentamente [32]; también se pueden adicionar glucono- $\delta$ -lactona, el cual actúa como quelante del calcio que es liberado lentamente y de esta forma induce la gelificación [106], [107], [108].

La resistencia del gel puede ser manipulada por la variación en la composición y concentración de los bloques del alginato, por alteración del método de entrecruzamiento y mediante ajuste de la densidad de entrecruzamiento o tamaño de la red; como solamente los bloques G participan en el intercambio iónico, la resistencia del gel depende de la relación de monómeros M:G y la longitud de los bloques G [66]. Los residuos G están en una conformación alternada 1C4 y secuencia pareada-G, haciendo una hebra cuya estructura es plegada que toma la forma de caja de huevos, formando cavidades para acomodar cationes divalentes en un tipo de enlace quelante [109].

En el campo de Ingeniería Tisular, alginato se ha empleado para la microencapsulación de células, las cuales son capaces de secretar productos terapéuticos que son inmovilizadas e inmunoprotegidas dentro del material biocompatible, principalmente islotes de Langerhans [110], [111], condrocitos [112], [113] y como soporte para la generación de equivalentes de córnea [114]. Adicionalmente, alginato exhibe propiedades hemostáticas [88], las cuales han sido aprovechadas para la generación de suturas para heridas [23], [113] lo que ha dado lugar a aplicaciones comerciales como Kaltostat® (Convatec), Fibracol

plus (apósito a base de colágeno y alginato, Johnson & Johnson), Algicell™ (Derma Sciences) AlgiSite™ (Smith & Nephew), Comfeel Plus™ (Coloplast), Kaltostat™ (ConvaTec), Sorbsan™ (UDL Laboratories) y Tegagen™ (3M Healthcare) [115].

En cuanto a la encapsulación de fibroblastos, Hunt *et al.* [116] demostraron que es posible encapsular fibroblastos murinos en geles de alginato de calcio de baja viscosidad, aunque las células permanecen mitóticamente inhibidas, las cuales proliferan normalmente una vez son liberadas del gel. En esta vía Pokrywczynska *et al.* [117] concluyen que alginato no es un material apropiado para la encapsulación de células con alta velocidad de crecimiento, como fibroblastos, ya que las células proliferan de manera descontrolada sin que haya integración con el soporte. Una ventaja que presentaría alginato en la encapsulación de fibroblastos es que no se contrae por la encapsulación de fibroblastos [102], como ocurre con otros materiales como el colágeno; adicionalmente, el uso de geles permite que existan condiciones más similares a las que se pueden tener en los tejidos, lo que favorece que las células tengan el mismo fenotipo que se podría esperar en el tejido nativo, lo cual no se tendría cuando se cultivan en superficies bi-dimensionales [102].

La literatura resulta bastante contradictoria en cuanto al efecto de la composición del alginato de sodio (relación G:M) en la respuesta inmune, ya que se ha reportado que una alta composición en unidades monoméricas G disminuye la respuesta inmune, mientras que otros autores muestran que es mejor un alginato con bajo contenido de unidades monoméricas G [118]. La conclusión a la cual se ha llegado en la actualidad es que la presencia de contaminantes en el alginato tiene un mayor impacto sobre la respuesta inmune que la composición del alginato; dichos componentes contaminantes suelen aparecer en mayor proporción en alginato con alto contenido de M al cual se unen polifenoles, endotoxinas y proteínas [110], [115], [119]. El uso de alginato de sodio purificado conlleva a que los estudios en modelos de experimentación animal no manifiesten respuesta inmune, tal como lo reportan Sayyar *et al.* [81].

Una de las desventajas del uso de alginato de sodio en cultivos celulares es la ausencia de proteínas de reconocimiento celular que limitan la adhesión celular a la superficie del polímero, al no unirse a las integrinas de las células de mamíferos [35], [117]; otra desventaja, es su limitada e incontrolable degradación *in vivo* porque los mamíferos son incapaces de llevar a cabo una degradación enzimática considerable y la degradación en

condiciones fisiológicas puede ocurrir lentamente de manera incontrolable [100], [120]. Esta degradación se debe fundamentalmente a la desorción del catión (calcio o bario) en el medio de cultivo, lo que conlleva a la desestabilización del gel. Adicionalmente, debido a su naturaleza hidrofílica la adsorción sobre la superficie de alginato de las proteínas de la matriz extracelular no se ve favorecida, por lo cual se hace necesario mezclarlo con proteínas de la matriz extracelular o secuencias de péptidos que sean capaces de unir los receptores celulares a las cadenas poliméricas [66] o elementos presentes en la matriz extracelular de las células [104], [113].

Esta vía se ha convertido en una posibilidad tecnológica para obtener alginato con capacidad para interactuar con las células. Mediante la introducción química de péptidos usando carbodiimida, acoplado los péptidos a los grupos carboxílicos del alginato [115], se ha introducido la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) la que presenta gran afinidad por los receptores de integrina presentes en varios tipos de células, como fibroblastos. En la actualidad, la Empresa Novamatrix ([www.novamatrix.biz](http://www.novamatrix.biz)) produce y comercializa alginato modificado que posee secuencias de aminoácidos RGD bajo el nombre comercial de Novatach.

## 1.7 Adsorción de proteínas

La adsorción de proteínas sobre superficies poliméricas tiene una amplia difusión en el campo de la Ingeniería Tisular [121], [122]. El mecanismo de adsorción de las proteínas sobre partículas poliméricas ocurre en tres pasos [121], [123]:

- proceso de difusión de la proteína desde el seno de la solución hasta la superficie, depende del coeficiente de difusión de la proteína.
- proceso de adsorción suave, en el cual la proteína puede ser desorbida o intercambiada por otra proteína, depende de la interacción entre proteína y la superficie
- proceso de adsorción fuerte, en el cual la proteína no es desorbida o intercambiada por otra proteína. En esta etapa se puede dar un cambio conformacional irreversible

debido a un cambio orientacional en la superficie o un desdoblamiento o desacoplamiento, lo cual causa finalmente desnaturalización.

Son varios los factores que afectan la adsorción de proteínas sobre partículas poliméricas entre ellas se tienen [121]:

- por parte de las partículas poliméricas: tamaño, rigidez, contenido sólido, estabilidad e hidrofobicidad.
- por parte de las proteínas: punto isoeléctrico, solubilidad, peso molecular y estructura tridimensional.
- por parte del medio: pH, fuerza iónica y viscosidad.

Una de las aplicaciones de la adsorción de proteínas sobre biopolímeros es la generación de microesferas de alginato-polilisina (PLL)-alginato (APA) las cuales se usan para la encapsulación de células en Ingeniería Tisular. Este método fue propuesto por Lim y Sun [124], principalmente islotes de Lanhgerhas en microesferas formadas por alginato-polilisina-alginato (APA) en las que se mantienen. Esta técnica consiste en el atrapamiento o microencapsulación de células y tejidos en esferas de alginato que son transformadas en esferas rígidas por la gelificación en presencia de un ión divalente, preferentemente calcio; después de la gelificación, las esferas son provistas con una membrana al colocarlas en una solución de PLL [111], ya que las esferas de alginato están cargadas negativamente y son recubiertas con un poliacrilato (PLL), con el ánimo de estabilizar y controlar el peso molecular de corte de la membrana de la microcápsula [110], [125]. Finalmente, se colocan en una solución de alginato, para lograr que las cargas positivas de la PLL puedan unirse al alginato y de esta manera evitar la respuesta inmune del paciente [125].

Mediante estudios de ATR-FTIR se encontró que PLL en la superficie de alginato puede existir con 3 estructuras distintas [110]: hoja  $\beta$ , espiral al azar y hélice  $\alpha$ . La configuración hélice  $\alpha$  indica que la mayoría, sino todas, las cargas positivas han sido neutralizadas; en contraste, si la configuración es espiral al azar una importante porción de las cargas positivas no han sido neutralizadas y por tanto, las proteínas del sistema inmune y las células pueden unirse a dichas cargas. Por último, la configuración hélice  $\alpha$  se presenta

cuando hay una fuerte interacción entre el alginato y PLL. La adsorción de la PLL se hace a los sitios G del alginato de calcio [118], llegando a convertirse en un complejo de alginato-polilisina [110].

Aunque se han propuesto varias técnicas para medir o cuantificar la adsorción de proteínas sobre partículas poliméricas, el equilibrio de adsorción es rápido y muy dinámico y los adsorbentes están en continuo movimiento, por lo cual Kim y Yoon [121] prefieren el método de separación de fases y posterior cuantificación de la proteína residual remanente.

## **1.8 Comportamiento mecánico de los materiales**

Las propiedades bioquímicas y físicas del microambiente extracelular han sido reconocidas como factores interdependientes, que influyen en la función celular y la morfogénesis del tejido en múltiples vías; de esta manera el material empleado como soporte debe tener unas propiedades físicas y bioquímicas que permitan proveer un ambiente apropiado para la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celular. La determinación de las propiedades mecánicas de los tejidos tiene como punto de referencia la matriz extracelular y/o los propios tejidos. Dentro de los ensayos mecánicos que suelen ser realizados a los bio-materiales se encuentran: ensayo de tensión, de compresión y el análisis dinámico. En los ensayos de tensión uniaxiales se suelen fabricar probetas en forma de “hueso de perro” que son puestas entre dos abrazaderas y se someten a tensión con una velocidad constante; a partir de los resultados de esfuerzo/deformación se puede obtener el módulo de Young, definido como la relación entre el esfuerzo y la deformación, y el esfuerzo último a tensión (UTS), determinado como el esfuerzo máximo que soporta la probeta antes de fallar. En los ensayos de compresión las probetas son sometidas a una carga que las comprime mientras se registra la distancia recorrida, a partir de los resultados obtenidos se puede determinar el módulo compresión, el cual se define como la relación entre el esfuerzo de compresión y la deformación ocasionada. La determinación del Módulo de Young y de compresión permite caracterizar la elasticidad de un material. El análisis mecánico de tipo dinámico consiste en la generación de un esfuerzo sinusoidal,

que se aplica al material para determinar la deformación y la velocidad de deformación. El estudio de un material desde esta perspectiva de esfuerzos y deformaciones constituye la evaluación del comportamiento reológico [44].

El comportamiento de muchos materiales no puede ser definido completamente como sólido, ya que corresponde a regiones de transición entre sólido y líquido, y es justamente esta región la que interesa en el diseño de un gel. Este tipo de materiales presenta características viscoelásticas e implica la existencia de viscosidad (comportamiento líquido) y elasticidad (comportamiento sólido) [126]. Si se tiene un cubo sólido que es fijado a la superficie sobre la cual reposa y se aplica una fuerza en la parte superior del cubo, ocasionando una deformación del mismo, dicha deformación se define como la relación entre el desplazamiento horizontal sobre la altura del cubo y se representa por  $\chi$ ; la fuerza se transforma en esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) dividiéndola entre el área de la cara superior del cubo. Si el sólido se comporta como un sólido ideal, que obedece la ley de Hooke, se modelará de acuerdo a la ecuación (1-1):

$$\sigma = K\chi \quad (1-1)$$

donde K representa el módulo de corte y es constante; si el material no obedece la Ley de Hooke, el comportamiento dejará de ser lineal.

Para los fluidos, la característica fundamental es su continua deformación cuando se somete a un esfuerzo constante ( $\sigma$ ) y lo que usualmente se representa es la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) definida como la razón de cambio de la deformación con respecto al tiempo. De esta manera la ecuación que representa los fluidos ideales o que obedecen la Ley de Newton es la ecuación 1-2:

$$\sigma = \eta\dot{\gamma} \quad (1-2)$$

donde  $\eta$  representa la viscosidad del fluido.

El estado gel no puede ser catalogado dentro de uno de los conceptos anteriores, porque presenta características de sólido y líquido, por lo cual se cataloga como viscoelástico. Un

material se define como viscoelástico cuando al aplicar un esfuerzo sobre dicho material, una vez se retira dicho esfuerzo, parte de la deformación es recuperada instantáneamente y otra parte la recupera a través del tiempo [127]. Este comportamiento es típico de los materiales poliméricos.

El comportamiento reológico de este tipo de materiales está definido por la ecuación 1-3.

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\gamma} \quad (1-3)$$

Donde G es el módulo del material.

La caracterización de estos materiales se suele hacer mediante ensayos en los cuales los materiales son sometidos a pequeñas deformaciones, siendo los más comunes relajación de esfuerzos, creep y oscilaciones sinusoidales [127], [66]. En el método de las oscilaciones sinusoidales la muestra es deformada con un comportamiento sinusoidal a través del tiempo. Dentro de unos pocos ciclos de oscilación, el esfuerzo también oscila sinusoidalmente a la misma frecuencia, pero en general, con un ángulo de fase  $\delta$  con respecto a la onda de la deformación, lo anterior se puede expresar en términos matemáticos de la siguiente forma:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (1-4)$$

$$\sigma = \sigma_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (1-5)$$

Los datos son analizados descomponiendo la onda de esfuerzo en 2 ondas de la misma frecuencia, una en fase con la onda de deformación y otra con un desfase de  $90^\circ$  con esta onda, por tanto se tiene:

$$\sigma = \sigma' + \sigma'' = \sigma'_0 \text{sen}(\omega t) + \sigma''_0 \cos(\omega t) \quad (1-6)$$

Por tanto, a partir de conceptos trigonométricos se llega a la expresión:

$$\tan \delta = \frac{\sigma''_0}{\sigma'_0} \quad (1-7)$$

Esta descomposición sugiere que se pueden definir dos módulos:

$$G' = \frac{\sigma'_0}{\gamma_0}, \text{ módulo elástico o de almacenamiento} \quad (1-8)$$

$$G'' = \frac{\sigma''_0}{\gamma_0}, \text{ módulo viscoso o de pérdida} \quad (1-9)$$

En base a los dos módulos se puede escribir:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (1-10)$$

Lo anterior puede ser escrito en términos de números complejos:

$$\sigma = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (1-11)$$

El módulo complejo ( $G^*$ ) está dado por:

$$G^* = G' + i G'' = \sigma_0 / \gamma_0 \quad (1-12)$$

A partir de los dos módulos, se puede establecer el punto de gel, el cual hace relación a la condición en la cual la respuesta elástica y la respuesta viscosa del material son iguales ( $G' = G''$ ), dicho punto separa dos regiones en una de las cuales gobiernan las fuerzas viscosas y en la otra gobiernan las fuerzas elásticas.

## 1.9 Microportadores

Los microportadores son microesferas obtenidas usando diversos materiales, principalmente poliméricos o proteicos, sobre los cuales las células se adhieren y proliferan hasta cubrir toda la superficie; su uso ha sido ampliamente extendido en la producción de anticuerpos monoclonales y vacunas [128]. El tamaño de los microportadores oscila entre 90  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$  de diámetro y para la fabricación se suelen emplear materiales como

polímeros (dextrano, poliestireno, poliacrilamida, poliacroleína, polimetilmetacrilato [129], vidrio (solo o cubierto con plásticos o poliestireno), gelatina (sola o cubierta con dextrano) o colágeno (solo o cubierto con poliestireno) [130]; el área superficial ofrecida oscila entre 380 cm<sup>2</sup>/g y 440 cm<sup>2</sup>/g, con una densidad entre 1.02 g/ml y 1.10 g/ml [131]. Mediante el uso de microportadores se puede incrementar la relación área superficial de cultivo a volumen de medio de cultivo hasta 90.000 cm<sup>2</sup>/l, dependiendo del tamaño y densidad de las esferas [130]. La técnica de cultivo con microportadores facilita la transferencia de oxígeno y el mantenimiento del entorno físico, biológico y químico; además, el sistema puede ser ajustado y monitoreado en el valor deseado de pH, oxígeno disuelto, niveles de agitación, esfuerzo cortante y composición nutricional [131]; un estimativo permite comparar los cultivos estáticos con los cultivos en suspensión con microportadores: 1 gramo de microportadores fácilmente provee un área superficial comparable a 15 frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> [131]. En cuanto a la proliferación de fibroblastos y/o queratinocitos reportan que la producción de microportadores con queratinocitos presenta varias ventajas entre ellas se tienen: eliminación de la tripsina para la obtención de las láminas de células, menor tiempo de producción, las láminas con células son frágiles y tienen altos costos de producción [132].

Mediante el empleo de microportadores, es posible aumentar la concentración celular desde 2 x 10<sup>6</sup> células/ml hasta 2 x 10<sup>8</sup> células/ml, porque se generan expectativas frente a su uso por la posibilidad de obtener altas concentraciones celulares en dispositivos relativamente pequeños.

### **1.9.1 Microportadores para el cultivo de fibroblastos y queratinocitos**

El uso de microportadores para la proliferación de células cuyo fin último constituya la conformación de un equivalente de tejido es un campo poco explorado por la literatura. Uno de los primeros reportes corresponde a Lafrance y Armstrong [133], quienes emplearon microsferas (diámetro: 73-140µm) de PLGA sobre las cuales crecieron fibroblastos y queratinocitos; dentro de las ventajas encontradas en esta metodología se

pueden mencionar: facilidad para manipular las esferas comparada con hojas de células, posibilidad de aplicación de las esferas directamente en la herida y la posibilidad de que las esferas liberen factores bioactivos en la medida en que se degraden. En este mismo reporte, evalúan la aplicación directa de las esferas en zonas afectadas de modelos porcinos y encuentran que la cicatrización es más rápida y natural frente a otros métodos, además establecen que con 2 g de microportadores podrían cubrir un área cercana a 2 m<sup>2</sup> que es la superficie total del cuerpo. Una de las desventajas de este material es la disminución de la capacidad de controlar la pérdida de fluidos de la superficie de la herida, y de proveer una barrera a la infección.

También se ha cultivado fibroblastos humanos sobre microportadores de cytopol (Biolot), de diámetro 200-300 μm, los que fueron tratados con 0.1 mg/ml de colágeno a 37 °C durante 20 minutos; tardan cerca de 3 días en cubrir la superficie disponible en el microportador y luego son colocados en un gel de colágeno donde empiezan a migrar dentro de las 24 horas siguientes; determinan que el tiempo óptimo para usar los geles de colágeno como equivalentes de tejido conectivo dentro de 3 o 4 días después de embeberlos ya que empiezan a morir al cabo de 3 o 4 semanas [134]. Otro reporte, usa microportadores, con diámetro de 100-200 μm, empleando quitosano sobre los cuales proliferaron fibroblastos murinos y humanos sin que se mostrara citotoxicidad el material [135].

En cuanto al uso de microportadores para el cultivo de queratinocitos, se ha reportado la proliferación de queratinocitos sobre microportadores de polietileno y sílica y su posterior aplicación en úlceras de pacientes diabéticos en una proporción de 75 microportadores/cm<sup>2</sup> y encontraron que el área de la herida se reduce considerablemente en un periodo de 30 días frente a un control que consistió en células aplicadas sin microportadores [136]. Adicionalmente, se reportan ventajas de la proliferación de queratinocitos sobre microportadores entre las cuales se tienen: eliminación de la tripsina para la obtención de las láminas de células, menor tiempo de producción, las láminas con células son frágiles y tienen altos costos de producción [132]

Una aplicación interesante de microportadores de citodex-3 cubiertos de gelatina es para la medición de migración y angiogénesis, mediante microscopía, usando células

endoteliales; los microportadores cargados son colocados en geles de fibrina y mediante microscopía se mide la migración celular y la angiogénesis [137]. Recientemente se ha reportado la fabricación de microportadores usando fibrinógeno entrecruzado con 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimide (EDC), en los cuales se pueden adherir fibroblastos y no se halla toxicidad de los mismos hacia las células [138].

### 1.9.2 Métodos de producción

La producción de microportadores se realiza fundamentalmente a partir de la emulsión de aceite en agua. En este método se genera una dispersión hidrofílica (protéica principalmente) en aceite, mediante agitación se obtienen los tamaños deseados y se induce la gelificación. Bajo esta metodología, Wang *et al.* [139] fabricaron microportadores con gelano, usando el método de emulsión de agua en aceite (W/O) con posterior oxidación, empleando per-yodato de sodio; adicionalmente, para incrementar la adhesión celular, se realizó el recubrimiento con gelatina y glutaraldehído; el tamaño de estos microportadores es de 450 a 600  $\mu\text{m}$ . De manera similar, Gorodetsky *et al.* [140] fabricaron micropartículas de fibrinógeno desnaturalizado por calor con el método de emulsión de agua en aceite (W/O), con lo cual logran adhesión celular superior al 95% de diversos tipos de células. Empleando un método similar, Rajangam *et al.* [138] fabricaron mediante emulsificación en aceite de soya microportadores a partir de fibrinógeno bovino, posteriormente los lavaron con acetona y entrecruzaron con 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimide (EDC). También Wissemann y Jacobson [141] desarrollaron microportadores empleando gelatina mediante este mismo método, usando glutaraldehído como agente entrecruzante, para el cultivo de fibroblastos de ratón (L-929) y obtienen microportadores con un diámetro entre 150 y 440  $\mu\text{m}$  sobre los cuales las células proliferan.

Otra alternativa para generar los microportadores es mediante el uso de alginato de sodio, el que se descarga sobre una solución de cloruro de calcio para lograr una gelificación instantánea y de esta forma obtener micro-esferas. En esta vía, Kwon y Peng [142] prepararon microportadores usando alginato de sodio y propilen glicol alginato (PGA) y mediante goteo en soluciones de cloruro de calcio formaron las microesferas en un rango

de tamaño (150-300  $\mu\text{m}$ ); luego suspenden los microportadores en una solución de gelatina, se retiran de la solución de gelatina y mediante el uso de una solución de hidróxido de sodio se permite la reacción de transacilación, se neutraliza el hidróxido de sodio, se lavan los microportadores y finalmente para incrementar la resistencia mecánica se entrecruzan con glutaraldehído al 4% por 30 minutos. El diámetro finalmente obtenido es  $94 \pm 27.5 \mu\text{m}$ . Similarmente, Grohn *et al.* [143] prepararon microportadores usando alginato de sodio, el cual fue depositado sobre una solución de cloruro de bario. Para garantizar la adhesión celular, las microesferas fueron recubiertas con colágeno. Los microportadores obtenidos fueron evaluados en la adhesión de células de hígado (CCL-13) y fibroblastos murinos (L929), mostrando una buena adhesión celular y proliferación celular.

## 1.10 Uso de biorreactores para el cultivo de fibroblastos

La mayoría de los cultivos de células en Ingeniería de Tejidos se realizan en 2D, empleando frascos de cultivo en los que las células crecen sin agitación; estos cultivos, denominados estáticos, presentan limitaciones que conducen a la generación de gradientes de pH, nutrientes, toxinas, gases y factores de crecimiento [9]. La alternativa a los cultivos estáticos la presentan los cultivos dinámicos, en los cuales la agitación incrementa la homogeneidad del sistema y constituyen propiamente los biorreactores [9]. Los biorreactores son definidos como equipos en los cuales se desarrollan procesos biológicos o bioquímicos en un ambiente cerrado y con condiciones controladas de pH, temperatura, adición de nutrientes y remoción de residuos [11]; [144]; [145]; [9]; [10]. El biorreactor permite generar y mantener un ambiente controlado de cultivo que garantiza el crecimiento directo del tejido porque permite el desarrollo de procesos de manufactura automatizados, estandarizados, trazables, costo-efectivos y seguros en Ingeniería de Tejidos con aplicaciones clínicas [25], [146]. Se han empleado diversos tipos de biorreactores dependiendo de las características del tejido a desarrollar: *spinner*, tanque agitado y perfusión.

El desarrollo de tejidos y órganos durante la embriogénesis, la remodelación y el crecimiento en etapas post-natales requieren de la aplicación de fuerzas físicas: hidrodinámicas, hidrostáticas, mecánicas y eléctricas [146]. Los biorreactores tienen un

papel importante, porque proveen un ambiente controlado para el desarrollo de constructos 3D donde se puede controlar el pH, temperatura, concentración de gases disueltos, flujo de medio, esfuerzos cortantes y esfuerzos hidrodinámicos [9]; también es posible controlar el potencial redox. Sumado a lo anterior, se ha mostrado que los biorreactores son importantes al permitir la aplicación de esfuerzos mecánicos sobre los cultivos celulares que favorece el aumento en la diferenciación celular y en la deposición de la matriz extracelular [11].

Uno de los inconvenientes que se puede presentar en los cultivos en 3D es la determinación adecuada del espesor del soporte sobre el cual deben crecer las células por las limitaciones difusionales. In vivo, se ha establecido que un tejido cuyo espesor sea de 100  $\mu\text{m}$  no presenta limitaciones en los nutrientes que se transfieren por capilaridad; este valor se considera que es limitante y por tal motivo el diseño de biorreactores debe considerar que el transporte de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento debe ser homogéneo en esta escala [9]. Uno de los nutrientes que más demanda tiene es el oxígeno y se considera que la demanda de oxígeno es 25–250  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$  basados en una celularidad promedio de 500 millones de células/ $\text{cm}^3$  [9].

Uno de los primeros productos que emplearon biorreactores en la proliferación celular dentro de la Ingeniería Tissular fue Dermagraft®, el cual usa botellas *roller* y un sistema robotizado que realiza el cambio de medio; aunque el sistema fue novedoso, dificultades en el control del proceso hicieron que varios lotes fueran defectuosos [11], [26]. Recientemente la NASA evaluó el uso de un biorreactor rotatorio donde investigó la proliferación y diferenciación de células madre en células epidérmicas sobre microportadores, y encontraron la formación de estructuras epidérmicas en 3D [26].

El desarrollo de tejidos empleando biorreactores, es un campo estratégico que debe crecer en los próximos años a nivel mundial; Johnson *et al.* [40] presentan con base en encuestas a veinticuatro expertos internacionales en el campo de la Ingeniería de Tejidos, las líneas de investigación que deben impulsarse en los próximos años con miras alcanzar un mayor impacto en dicho campo. Dentro de los elementos que aparecen relevantes a nivel ingenieril están: el escalamiento de los productos obtenidos mediante ingeniería de tejidos

para atender las necesidades finales de los pacientes, la automatización de procesos, el diseño y puesta en marcha de nuevos biorreactores, la obtención de productos completamente libres de componentes animales, reducción de costos en la producción, cocultivo de dos o más tipos de células o tejidos, diseño y evaluación de nuevos materiales biodegradables con una degradación controlada, caracterización del efecto de la transferencia de masa y esfuerzos mecánicos sobre el desarrollo del tejido, entre otros. Hacia el futuro se ve la necesidad de integrar productos obtenidos usando ingeniería de tejidos en la rutina clínica, lo cual depende del desarrollo innovador de sistemas de biorreactores, de tal manera que a partir de una biopsia del propio paciente, un biorreactor permita aislar, expandir y cultivar las células hasta alcanzar el equivalente completamente autólogo dentro del ambiente clínico [11]; [147]. La generación de un tejido 3D *ex vivo* no solo requiere el desarrollo de nuevos modelos biológicos sino también de desafíos tecnológicos que permitan transferir los nutrientes a cultivos celulares con alta concentración celular [11].

Lafrance y Armstrong [133] afirman que el uso de un sistema de cultivo con biorreactor empleando microportadores es cerca de 120 veces más eficiente con respecto a las células producidas por unidad de volumen al aumentar la relación área/volumen; otra ventaja que presenta este sistema es el cultivo de diferentes tipos de células por separado en las condiciones apropiadas cada una de ellas. En cuanto al cultivo de células humanas, Oh et al [148] realizaron el cultivo de células madres embriónicas humanas (hESC) sobre microportadores de celulosa microgranular, recubiertos de matrigel, y encontraron un tiempo de duplicación de 21 horas frente a uno de 33 horas para el cultivo estático en cajas de cultivo, con lo que se demuestra que gracias a la agitación existe una mejor transferencia de oxígeno en el biorreactor. Palmiero *et al.* [149] reportan, después de 4 días de cultivo en reactor spinner, la formación de colágeno tipo I para el cultivo de fibroblastos bovinos al ser cultivados en microportadores de gelatina, comparados con el cultivo en 2D sobre frascos de cultivo. Sommar *et al.* [150] realizan el cultivo de fibroblastos humanos sobre microportadores de gelatina, los cuales son atrapados en geles de plasma rico en plaquetas y mediante el empleo de medios inductores logran la formación de cartílago y hueso *in vitro*.

52      Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor  
de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma  
sanguíneo humano y alginato de sodio

---

## **HIPÓTESIS**

Mediante la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio, es posible generar microportadores que puedan soportar el crecimiento de fibroblastos en biorreactor, lo cual permita acelerar la generación de equivalentes dérmicos con respecto a cultivos estáticos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Obtener un equivalente dérmico a partir del cultivo en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con alginato de sodio y plasma sanguíneo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Establecer las condiciones para la gelificación de mezclas de plasma sanguíneo y alginato de sodio.
- Estandarizar un proceso de producción de microportadores a partir de mezclas de plasma sanguíneo y alginato de sodio.
- Evaluar el crecimiento de fibroblastos humanos sobre los microportadores fabricados usando biorreactor.
- Obtener un equivalente dérmico y evaluar sus propiedades a nivel *in vitro*.

54      Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor  
de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma  
sanguíneo humano y alginato de sodio

---

## **2. Obtención de un soporte usando mezclas de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio para Ingeniería de Tejidos**

Para la obtención de microportadores y del soporte para la proliferación celular se evaluó la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio. La gelificación se induce mediante la puesta en contacto con una solución de cloruro de calcio, obteniendo formas esféricas (microportadores) o láminas (soportes).

En el presente capítulo se presenta la caracterización de un gel obtenido a partir de la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio, entrecruzado con cloruro de calcio. Dentro del presente capítulo se encontrará la caracterización del plasma sanguíneo, ensayos de viscosimetría de plasma sanguíneo y alginato de sodio, el comportamiento de mezclas de plasma sanguíneo y alginato de sodio mediante determinación del potencial  $\xi$  y viscosimetría, la caracterización reológica de las películas de alginato de calcio y plasma sanguíneo, la caracterización mecánica y microscopía electrónica de barrido (SEM) de las películas obtenidas.

### **2.1 Materiales y métodos**

#### **2.1.1 Reactivos**

Alginato de sodio de viscosidad media (Ref: A2033, 61% de ácido manurónico, 39% ácido gulurónico; relación M/G 1,56; MW: 80.000-120.000) fue comprado a Sigma-Aldrich Co (San Louis, MO, Estados Unidos); cloruro de calcio (Ref: 433381) y cloruro de sodio (Ref: 479687) fueron comprados a Carlo Erba (Strada Rivoltana, Italia).

### **2.1.2 Obtención de plasma sanguíneo**

Plasma sanguíneo humano fue seleccionado como la fuente de fibrinógeno para la generación de los geles. Este plasma fue donado por el Hemocentro de la Secretaría Distrital de Salud en Bogotá (Colombia). Se escogió plasma del tipo O+, para la realización de todos los ensayos previstos en el presente trabajo investigativo, por ser el de mayor frecuencia en la población colombiana según los históricos de la Secretaría de Salud Distrital. Para dar validez a todos los ensayos, se realizó la mezcla de cerca de 30 unidades de plasma (volumen aproximado de 200 ml por unidad) en condiciones estériles en cabina de flujo laminar, previa descongelación del mismo y atemperado a 37 °C usando baño termostático (Cole Parmer modelo 1255-02). Para eliminar fibrinógeno precipitado durante el almacenamiento, una vez homogenizada la mezcla, se centrifugó a 7100 X g por 20 minutos en centrífuga a temperatura ambiente en frascos estériles de 500 ml (Nalgene, Rochester, USA); el sobrenadante se sometió a filtración usando un cartucho de filtración Millipore (Merck Millipore, Massachusetts, USA) con un tamaño de poro de 8 µm para la eliminación de material lipémico. Una vez separados estos componentes, el plasma se almacenó en recipientes ámbar de vidrio de marca Schott (Mainz, Alemania) de 500 ml de capacidad que se mantuvieron congelados a -30 °C, los cuales se descongelaron cuando se requirió plasma acorde al diseño experimental.

### **2.1.3 Determinación del potencial $\zeta$**

Inicialmente se determinó el ión de fondo que debía emplearse para ajustar todas las mezclas a un valor determinado de fuerza iónica, medida indirectamente a través de la conductividad eléctrica. Para esto se evaluó el efecto de diversos cationes e iones sobre el potencial  $\zeta$  del plasma, lo que permitió establecer el electrolito de fondo; en todos los ensayos se ajustó la conductividad a un valor de 20 mS/cm en conductímetro Oaklon 510. Los cationes evaluados fueron sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) y los aniones fueron nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y cloruro (Cl<sup>-</sup>). Con el ión de fondo seleccionado (cloruro de sodio), se procedió a evaluar la interacción entre plasma y alginato de sodio. Se prepararon mezclas de alginato/plasma garantizando los siguientes porcentajes de alginato de sodio: 0.2%, 0.4%, 0.8% y 1.6%

(%p/v). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Para cada una de estas mezclas se utilizó el plasma sanguíneo mezclado con una solución de alginato de sodio al 3% p/v, adicionando el volumen necesario para ajustar la concentración a evaluar y luego se ajustó la fuerza iónica, con el ión de fondo (cloruro de sodio), a una conductividad de 20 mS/cm. A esta suspensión se le determinó el potencial  $\zeta$ . El equipo empleado fue Zetameter 3+ (Stauton, USA).

### **2.1.4 Viscometría del plasma sanguíneo y alginato de sodio**

Se realizaron ensayos de viscometría al plasma sanguíneo humano, a diversas soluciones de alginato de sodio (0.2%, 0.4%, 0.8% y 1.6% p/v) y también a la mezcla de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano en la misma concentración de alginato de sodio anterior. Estos ensayos se realizaron en un reómetro BOHLIN CVOR-200 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Inglaterra) usando una geometría de cono y plato de 2° y 40 mm de diámetro. Estos ensayos se realizaron con la siguiente rampa de velocidad de deformación entre 0.1 s<sup>-1</sup> y 150 s<sup>-1</sup> durante 100 s, durante 120 s permaneció en 150 s<sup>-1</sup> y por último descendió entre 150 s<sup>-1</sup> y 0.1 s<sup>-1</sup> durante 100 s. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, manteniendo constante la temperatura en 37 °C. La distancia entre el cono y plato (*gap*) fue de 50 μm

### **2.1.5 Fabricación de geles de plasma sanguíneo y alginato**

Una vez definido el porcentaje de alginato de sodio para las mezclas (0.8% p/v y 1.6% p/v), se fabricaron las películas de alginato de sodio y plasma sanguíneo. Se tomó el plasma sanguíneo y se descongeló a 37 °C en un baño termostático (Cole Parmer modelo 1255-02) y se mezcló con la solución de alginato de sodio (3% p/v) en las proporciones necesarias que garanticen una concentración final de alginato de sodio al 0.8% y 1.6% p/v. La mezcla se mantuvo a 37 °C y se distribuyó sobre un soporte metálico (aluminio) de 20 cm de largo, 20 cm de ancho y 1mm de profundidad. Un aerógrafo comercial (Airbrush Ranger, Ref: 1140 008/W-71G 1394) se colocó a una distancia de 20 cm del soporte con la mezcla de plasma/alginato y se asperjó una solución de cloruro de calcio al 1%, 2% o 3% p/v durante 5 minutos, con un flujo de 22 ml por minuto y un flujo de aire de 4 l/min a una presión de 20 psig. Se deja formar la película durante 10 minutos y se despega la

película formada. Para realizar los ensayos de reología dinámica, se troquela la película usando un troquel circular de 25 mm de diámetro interno; para los ensayos de resistencia mecánica, se corta la película con bisturí obteniendo formas rectangulares de 2 cm X 7 cm. Se realizó la determinación de la humedad de los geles obtenidos secándolos a 50 °C en un horno hasta alcanzar peso constante; este ensayo se realizó por triplicado.

### **2.1.6 Reología dinámica de los geles obtenidos**

Para las mezclas de alginato de sodio y plasma sanguíneo (0.8% y 1.6% p/v de alginato) y para las concentraciones de cloruro de calcio (1%, 2%, 3% p/v) se les realizaron ensayos de reología dinámica. Inicialmente, se realizaron ensayos de *amplitude sweep* conducentes a la determinación de la región viscoelástica lineal (VLR) que permitiera determinar la máxima deformación (*strain*) que soportaría el material. Se realizaron ensayos manteniendo la frecuencia constante en 1 Hz, y se varió la deformación entre 0.0001 y 10 (0.01% y 1000%) en un reómetro BOHLIN CVOR-200 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Inglaterra), a una temperatura de 37°C usando el sistema peltier con geometría de platos paralelos de 25 mm de diámetro. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Una vez definida la región viscoelástica lineal (VLR) se realizaron ensayos de *frequency sweep* en los cuales se varió la frecuencia entre 0.1 y 10 Hz manteniendo constante la deformación en 1% y la temperatura en 37 °C; las variables de respuesta que se obtuvieron fueron el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ), la distancia entre platos (*gap*) fue variable debido a que cada gel tuvo un espesor diferente.

### **2.1.7 Caracterización mecánica de los geles obtenidos**

Las películas obtenidas a partir de la mezcla de plasma sanguíneo/alginato de calcio al 1.6 % p/v y entrecruzadas con cloruro de calcio al 3% p/v fueron sometidas a ensayos de tensión hasta fallar en un Texturómetro TA XT plus (TA Instruments, Delaware, Estados

Unidos). Los ensayos se realizaron a una velocidad de 0.5 mm/s por cuadruplicado con una celda de carga de 30 kg. A partir de la curva esfuerzo vs deformación se determinó el Módulo de Young, esfuerzo último a tensión y porcentaje de deformación. El espesor de cada película se determinó usando un calibrador (Mitutoyo, Tokio, Japón).

### **2.1.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Para una película de alginato de sodio al 1.6% p/v, un gel de plasma sanguíneo elaborado en las condiciones reportadas por Meana *et al.* [89] y una película fabricada con la mezcla plasma/alginato de sodio al 1.6% p/v de alginato se realizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo Thermal Analysis model-2100 (TA Instruments, Delaware, Estados Unidos) entre -5 °C y 60 °C con una rampa de calentamiento de 1°C/min.

### **2.1.9 Evaluación de las películas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para visualizar la superficie de las películas obtenidas se fabricaron algunas películas empleando el protocolo establecido. Se congelaron a -70 °C durante 24 horas y se liofilizaron en un equipo Labconco (Freezone 2.5) a una presión de 50 mbar y una temperatura de - 50°C. Se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Fei Quanta 200) bajo una presión de vacío de 0.45 Torr, con un voltaje de 130 kV y una magnificación de 130X.

## **2.2 Resultados y discusión de resultados**

### **2.2.1 Obtención del lote de plasma sanguíneo**

La mezcla de las unidades de plasma que conformaron el stock de trabajo fueron analizadas en el Hemocentro dando resultados no reactivos para anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* (mal de Chagas), antígeno de superficie de la

hepatitis B, anticuerpos anti core hepatitis B, anticuerpos contra el virus linfotrópico I/II y anticuerpos contra *Treponema pallidum* (sífilis).

Una vez se mezclaron las unidades de plasma sanguíneo, se realizó la centrifugación para eliminar el contenido de material lipémico y proteínas insolubles (principalmente fibrina) que pudieran interferir con los ensayos posteriores, ya que el plasma almacenado puede producir coagulación espontánea, que contribuye a la precipitación de componente proteicos [94]. El proceso de purificación del plasma se realizó mediante la centrifugación a 7100 X g durante 20 minutos y la filtración usando cartucho de 8 µm de tamaño de poro. La caracterización de la mezcla de plasma se realizó en Laboratorio Clínico usando los *kits* distribuidos por Wiener Lab Group (Rosario, Argentina), la cual se presenta en la Tabla 2-1.

Todos los valores anteriores están dentro del rango útil para ser usados en pacientes, excepto la glucemia que se encuentra por encima del valor normal (70-110 mg/dl) y es debido a que el plasma donado por la Secretaría se descartó para uso en pacientes precisamente por el alto contenido de azúcar. Para la formación de los geles resultan importantes la concentración de fibrinógeno y el tiempo de trombina, este último relacionado con la concentración de la misma, porque altos tiempos de trombina implican una baja concentración de esta enzima. La concentración de fibrinógeno está dentro del intervalo encontrado en pacientes normales, el cual está comprendido entre 250 mg/dl y 300 mg/dl [46]. El valor de pH ( $7.81 \pm 0.00$ ) es un poco mayor al valor del pH fisiológico (7.4), debido a que como este plasma permanece congelado es posible que parte del dióxido de carbono se solubilice uniéndose a la hemoglobina, y esto ocasione un aumento en el pH.

La densidad del plasma es bastante cercana a la del agua (0.9965 g/ml a 20°C), lo que muestra que el efecto de las sales disueltas y proteínas en suspensión presentes no afecta considerablemente la densidad del plasma; además como se mencionó anteriormente el porcentaje de agua en el plasma es cercano al 90-91%, y la mayoría de las proteínas son globulares lo cual hace que sean estructuras que se repliegan sobre sí mismas, sin que

interactúen mucho con el solvente (agua); esto también se refleja en el comportamiento Newtoniano que presenta el plasma, muy similar al del agua (Tabla 2-3 y Figura 2-2).

**Tabla 2-1:** Caracterización del stock de plasma, Laboratorio Clínico unidad de servicios de la Universidad Nacional de Colombia.

Parámetro	Valor	Base del método	Kit
Fibrinógeno	273.5 ± 2.12 mg/dL	Método Clauss	Fibrinogen
Tiempo trombina	21.55 ± 0.78 s	Medición del tiempo de coagulación del plasma	Thrombin Time
Glucemia Basal	300 ± 12.73 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	Glicemia enzymatic AA
Colesterol Total	132.9 ± 3.39 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	Colestat enzymatic AA
Colesterol HDL	38 ± 1.41 mg/dL	Desarrollo de color	HDL Cholesterol monofase AA plus
Colesterol LDL	78.35 ± 2.33 mg/dL	Desarrollo de color	LDL cholesterol monofase AA
Triglicéridos	83.00 ± 1.41 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	TG Color GPO/PAP AA
Densidad	0.9965 ± 0.00288 g/mL	Picnómetro	
pH	7.81 ± 0.00	pH-metro	

Fuente: Autor.

## 2.2.2 Determinación del potencial $\zeta$

Para la determinación del potencial  $\zeta$  del plasma humano se realizaron diluciones 1/16 con agua tipo HPLC. La conductividad se ajustó a un valor de 20.0 mS/cm, valor obtenido para una solución isotónica de cloruro de sodio (0.9 % p/v). Se evaluaron 2 cationes y 2 aniones: sodio, potasio, cloruro y nitrato, aportados por cloruro de sodio, cloruro de potasio, nitrato de sodio y nitrato de potasio. Los resultados obtenidos tras 20 determinaciones realizadas, con una desviación estándar menor al 5%, aparecen en la Tabla 2-2.

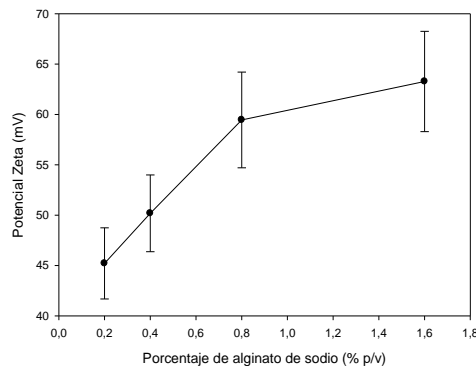
**Tabla 2-2:** Determinación del ión de fondo para los ensayos de potencial  $\zeta$  para diluciones 1:16 de plasma sanguíneo humano.

Electrolito evaluado	Potencial $\zeta$ (mV)
NaCl	42.205 $\pm$ 3.015
KCl	42.29 $\pm$ 4.015
NaNO <sub>3</sub>	43.14 $\pm$ 4.315
KNO <sub>3</sub>	41.27 $\pm$ 3.072

Con estos datos se aplicó el estadístico t-student para dos colas con un valor de significancia de 0.05 y 38 grados de libertad, se compararon los promedios obtenidos por pares entre cloruros y nitratos y entre sodios y potasios; el valor crítico es 1.6859. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) muestran que no existe diferencia significativa entre cloruros, nitratos, sodios y potasios, por lo cual se escogió como ión de fondo el cloruro de sodio para el desarrollo de los ensayos posteriores.

Manteniendo la misma dilución (1/16) se realizaron mezclas de plasma sanguíneo y alginato de sodio, se ajustó la conductividad eléctrica a 20.0 mS/cm y se determinó el potencial  $\zeta$ . Los porcentajes de alginato evaluados fueron 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6% (% p/v);

adicionalmente se determinó el potencial  $\zeta$  para la solución de alginato de sodio al 3% y para plasma sanguíneo humano (ver Figura 2-1). Como se aprecia en la Figura citada, el potencial  $\zeta$  de la mezcla se incrementó en la medida en que aumentó la concentración de alginato de sodio, hasta alcanzar valores máximos cuando el porcentaje de alginato fue 1.6 % p/v. El potencial  $\zeta$  para alginato de sodio al 3% p/v fue 25.3 mV y para plasma sanguíneo humano fue 42.20 mV; sin embargo, los valores obtenidos para las mezclas de alginato/plasma fueron superiores a los componentes sin mezclar. Lo anterior puede explicarse como la interacción electrostática a nivel superficial entre el alginato y el plasma, ya que la estructura química del alginato de sodio está cargada negativamente al abundar grupos hidroxilo (pKa 3.4, [106]) y la superficie de las proteínas del plasma están por encima del punto isoeléctrico de albúmina (P.I 4.85) y fibrinógeno (P.I. 5.5) [151] por lo cual su carga es negativa, lo que genera repulsión electrostática confiriéndole una mayor estabilidad y retardando la precipitación de proteínas en las suspensiones y evitando que se presenten zonas no homogéneas. El pH de la mezcla es 7.53 para la mezcla al 1.6% de alginato y 7.68 para la mezcla al 0.8% de alginato. A través de los ensayos de determinación del potencial  $\zeta$  se obtuvieron potenciales altos que indican que no se presentaría precipitación de las proteínas, ya que si dicho potencial fuese cercano al Punto isoeléctrico (Potencial  $\zeta=0$ ) formarían agregados. Por tanto se escogieron como porcentajes de alginato para ser evaluados por reología 0.8 y 1.6 % p/v por ser los más estables.

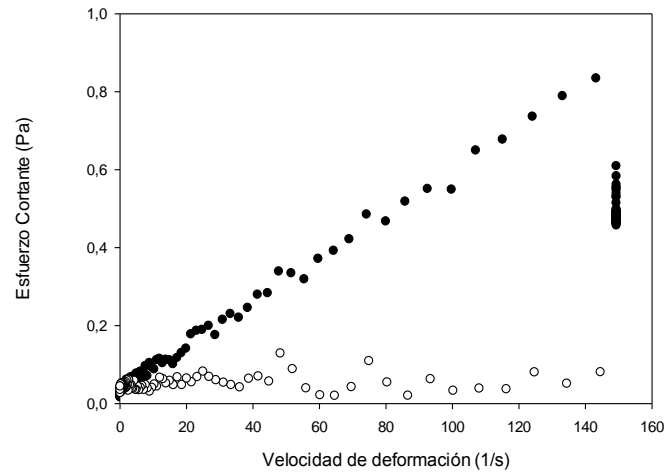


**Figura 2-1:** Potencial  $\zeta$  para mezclas de alginato de sodio y plasma sanguíneo humano en dilución 1:16 ajustados a una conductividad eléctrica de 20 mS con NaCl. El potencial  $\zeta$  de la mezcla se incrementó en la medida en que aumentó la concentración de alginato de sodio, hasta alcanzar valores máximos para un porcentaje de alginato fue 1.6 % p/v. El potencial  $\zeta$  para alginato de sodio al 3% p/v fue 25.3 mV y para plasma sanguíneo humano fue 42.20 mV.

### 2.2.3 Viscometría del plasma sanguíneo y alginato de sodio

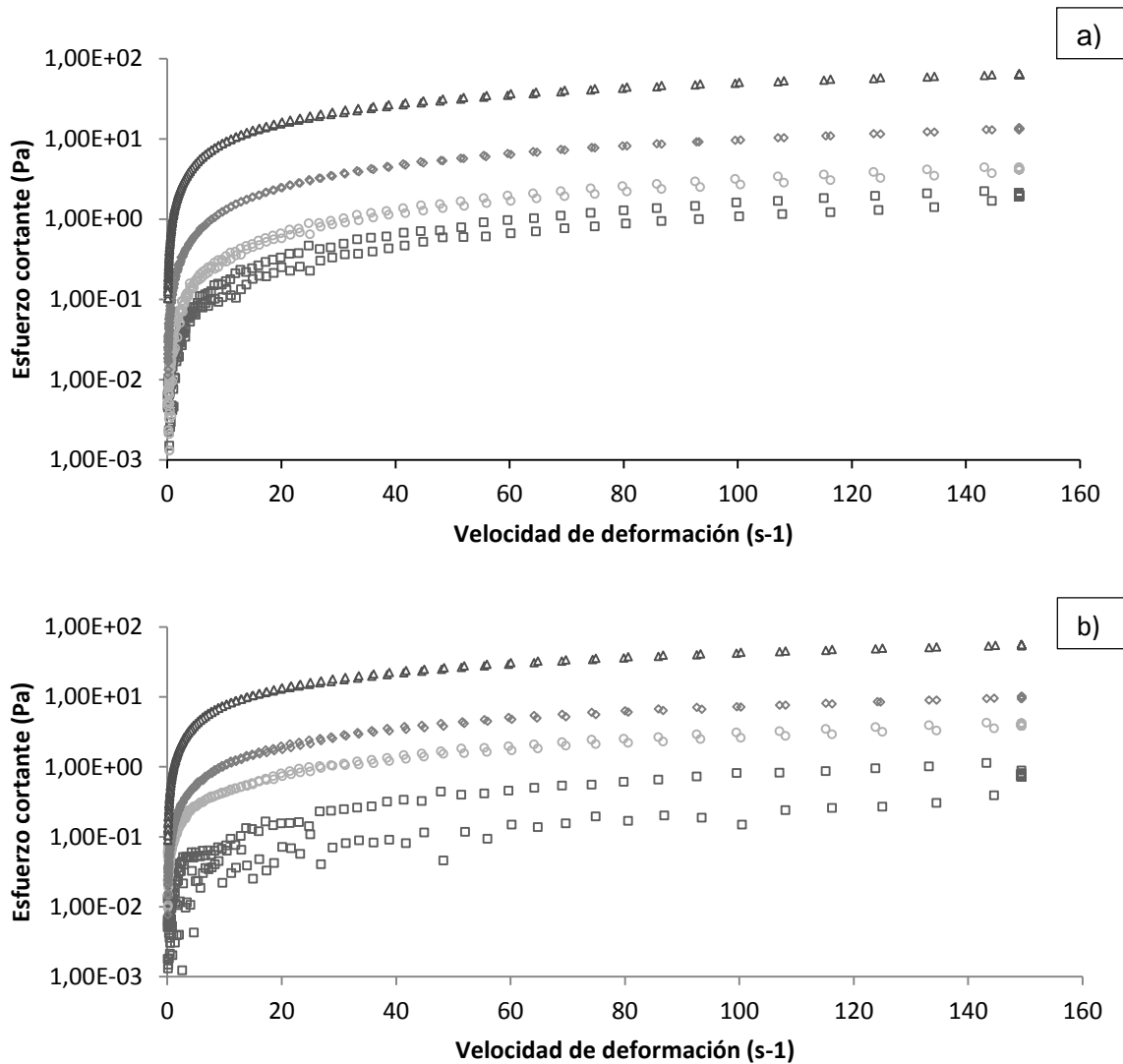
La curva de flujo para el plasma sanguíneo aparece en la Figura 2-2. Como se puede apreciar en esta figura, se presenta histéresis en el material debido a que la trayectoria de ascenso en la rampa de velocidad de deformación no es la misma que en el descenso. Esta histéresis implica que las proteínas presentes en la suspensión se reordenan de una manera distinta cuando han sido sometidas a una alta velocidad de cizalla, y ello conlleva a una disminución en la viscosidad. Un comportamiento similar está reportado en la literatura [42] para el comportamiento reológico de la sangre, ya que los glóbulos rojos se unen ligeramente formando agregados conocidos como *rouleaux*, los cuales hacen que la viscosidad de la sangre sea bastante dependiente de la velocidad de deformación, y es por ello que a bajas velocidades de deformación la sangre presenta una alta viscosidad, la cual cae en la medida en que aumenta la velocidad de deformación (destrucción de los *rouleaux*). Una de las proteínas que más contribuyen con este efecto es el fibrinógeno, el cual está presente en el plasma sanguíneo.

La curva de flujo presentada en la Figura 2-2 muestra un comportamiento lineal durante la rampa de ascenso, lo cual corresponde a un comportamiento Newtoniano con un coeficiente de correlación promedio de  $0.9907 \pm 0.0043$  para los 3 ensayos realizados. La viscosidad para la rampa de ascenso del plasma sanguíneo es de  $6.15 \pm 0.77$  mPa·s. Teniendo en cuenta que el porcentaje de agua presente en el plasma humano es 90-91% [152], [153], es de esperarse que predomine el comportamiento reológico de la misma, por ello la tendencia a ser un fluido Newtoniano, y debido a la presencia de las proteínas (7%) se presenta un incremento en la viscosidad con respecto al comportamiento del agua (viscosidad reportada alrededor de 0.725 mPa·s a 37°C).



**Figura 2-2:** Curva de flujo para el plasma sanguíneo humano entre una velocidad de corte de  $0.1 \text{ s}^{-1}$  y  $150 \text{ s}^{-1}$  a  $37 \text{ °C}$  (●: Rampa de ascenso; ○:rampa de descenso). Se presenta un comportamiento lineal durante la rampa de ascenso (comportamiento Newtoniano) con un coeficiente de correlación promedio de  $0.9907 \pm 0.0043$ ; la viscosidad es  $6.15 \pm 0.77 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .

La Figura 2-3-a muestra el comportamiento reológico de las soluciones de alginato de sodio, el cual corresponde a un fluido pseudoplástico [154], [155]. Acorde a dicha figura, se encuentra que para las concentraciones más bajas (0.2 y 0.4 % p/v) se presenta una mayor histéresis, la cual disminuye en las concentraciones más altas (0.8 y 1.6 % p/v). Esto se puede explicar debido a fuerzas intermoleculares del tipo puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals que hacen que las moléculas del alginato se entrelacen entre sí, aumentando la frecuencia de dichas fuerzas en la medida en que aumenta la concentración de alginato. Por eso se presenta histéresis a bajas concentraciones de alginato porque la frecuencia de dichos enlaces es menor; la histéresis disminuye a mayores concentraciones de alginato, donde las fuerzas intermoleculares conservan la estructura del alginato a pesar de la alta velocidad de cizalla.



**Figura 2-3:** Curvas de Flujo para diferentes concentraciones de alginato:  $\square$  0.2%,  $\circ$  0.4%,  $\diamond$  0.8%,  $\Delta$  1.6% para velocidades de deformación entre  $0.1 \text{ s}^{-1}$  y  $150 \text{ s}^{-1}$  para: a) soluciones de alginato de sodio; b) mezclas de plasma sanguíneo con alginato de sodio. Para bajas concentraciones de alginato (0.2 % p/v y 0.4% p/v) se presenta histéresis en el material, la cual disminuye en la medida en que aumenta la concentración de alginato (0.8% p/v y 1.6% p/v).

La Figura 2-3-b muestra las curvas de flujo para las mezclas de alginato y plasma sanguíneo humano para diversas concentraciones de alginato de sodio. El comportamiento que presentaron estas mezclas es similar al presentado por las soluciones

de alginato: a menor concentración de alginato de sodio se presenta una mayor histéresis, y en la medida en que aumenta la concentración de alginato de sodio disminuye dicho efecto. Lo anterior indica que se presenta asociación entre moléculas de alginato en la medida en que aumenta la concentración de este, y el efecto del plasma sanguíneo no es tan marcado sobre la mezcla como lo es el del alginato.

Con base en los resultados obtenidos, presentados en la Figura 2-3, se realizó el ajuste de los datos usando un modelo de Ostwald-de Waele, acorde a lo planteado por [156] para soluciones de alginato de sodio, según la ecuación 2-1:

$$\sigma = K (d\gamma/dt)^n \quad (2-1)$$

Donde

$\sigma$  es el esfuerzo cortante, Pa

K es el índice de consistencia, Pa s

( $d\gamma/dt$ ) es la velocidad de deformación, ( $s^{-1}$ )

n es el índice de comportamiento del flujo

Los parámetros fueron ajustados al 97% de variabilidad de la respuesta con un intervalo de confianza del 95% y se presentan en Tabla 2-3. A partir del ajuste realizado se puede concluir que a bajas concentraciones de alginato de sodio, hasta 0.8% para alginato solo y hasta 0.4% para la mezcla alginato/plasma sanguíneo humano, el comportamiento es Newtoniano ( $n=1$ ); para alginato al 1.6% y alginato/plasma al 0.8% y 1.6% el comportamiento se vuelve pseudoplástico. Lo anterior, corresponde con lo reportado por Mancini *et al.* [156] quienes presentan un comportamiento pseudoplástico para diversos tipos de alginato de sodio al evaluarlos hasta velocidades de deformación de  $1\ 000\ s^{-1}$ , la cual es muy superior con respecto a la velocidad máxima empleada en este trabajo ( $150\ s^{-1}$ ). De esta manera, se podría esperar que si el ensayo se realizara hasta una velocidad cercana a  $1\ 000\ s^{-1}$  el comportamiento obtenido dejaría de ser Newtoniano y se volvería pseudoplástico, lo cual se alcanza a notar en las concentraciones 1.6% de alginato de sodio y 0.8% y 1.6% para las mezclas con plasma sanguíneo. Este comportamiento pseudoplástico es característico de soluciones de materiales poliméricos, como el alginato de sodio, cuyas

68 Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

moléculas presentan un alto peso molecular y además se extienden y entrelazan en la solución, alcanzando de esta manera una configuración muy estable; si dicha concentración se incrementa, hace que se incremente el valor del índice de consistencia (K) de la solución y disminuya el valor del índice de comportamiento de flujo (n) ya que dicha solución se alejará del comportamiento del solvente (agua) que es un fluido Newtoniano.

**Tabla 2-3:** Ajuste de Ostwald de Waele para el plasma sanguíneo humano, alginato de sodio y mezclas de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano.

Ensayo	K, Pa s	Intervalo de confidencialidad para K	n	Intervalo de confidencialidad para K	r <sup>2</sup>
Plasma sanguíneo	0.0068	0.0063-0.0072	1.000	0.973-1.000	0.9446
Alginato 0.2	0.0161	0.0135-0.0190	1.000	0.932-1.000	0.9015
Alginato 0.4	0.0322	0.0286-0.0362	1.000	0.953-1.000	0.9533
Alginato 0.8	0.1005	0.0934-0.1081	1.000	0.967-1.000	0.9732
Alginato 1.6	1.0020	0.9704-1.0346	0.897	0.884-0.910	0.9949
Alginato-plasma 0.2	0.0084	0.0074-0.0094	1.000	0.988-1.000	0.9703
Alginato-plasma 0.4	0.0301	0.0281-0.0321	1.000	0.988-1.000	0.9941
Alginato-plasma 0.8	0.1208	0.115-0.124	0.925	0.910-0.939	0.9936
Alginato-plasma 1.6	0.9280	0.9000-0.9560	0.884	0.870-0.889	0.9954

Yang *et al.* [155] realizaron ensayos reológicos usando soluciones de alginato de la misma referencia que el empleado en este trabajo (Sigma-Aldrich de viscosidad media), y reportan valores de K de 2.75 y 0.25 Pa s para concentraciones de 1.6% y 0.8% p/v de alginato de sodio evaluados a una temperatura de 25 °C, distinta a la temperatura empleada en este trabajo de 37 °C; lo anterior refleja que a una menor temperatura se presenta una mayor interacción entre las moléculas, y por ello se requiere un mayor esfuerzo para deslizar la solución de alginato. En cuanto a n, en el citado trabajo [155] se reportan valores de 0.70 y 0.85 para concentraciones de 1.6% y 0.8% p/v, respectivamente; los cuales son valores típicos de fluidos pseudoplásticos, y por ello se puede predecir que al aumentar la

temperatura existe tendencia a obtener un comportamiento newtoniano (para la concentración de 0.8% de este trabajo), o acercarse a dicho comportamiento para una concentración de 1.6% donde  $n$  tiende a 1.0.

Por otro lado, se puede ver que las proteínas del plasma no afectan el comportamiento reológico de la mezcla, cuyo comportamiento resulta similar al presentado por las soluciones de alginato a la misma concentración; por ello se puede concluir que al no haber fuerzas de atracción entre las proteínas del plasma y el polisacárido (alginato), como se demostró a través del potencial  $\zeta$ , estas quedan replegadas sobre sí mismas mientras que las moléculas del alginato se extienden en la solución, gobernando el comportamiento reológico de la mezcla.

#### **2.2.4 Fabricación de geles de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano**

La velocidad de entrecruzamiento del alginato de sodio es tan alta que tan pronto entra en contacto con el cloruro de calcio se presenta la gelificación, y por tanto se hace imposible el seguimiento a través del tiempo de este proceso. Esto concuerda con lo reportado por Blandino *et al.* [157] quienes afirman que la gelificación de alginato de calcio es instantánea e irreversible, la cual es gobernada por la velocidad relativa de difusión de iones calcio y moléculas de polímero dentro de la zona de gelificación. Algunos autores para evaluar la cinética de gelificación emplean glucono- $\delta$ -lactona que actúa como quelante del calcio, el cual es liberado en la medida en que disminuye el pH, y de esta forma se puede inducir la gelificación progresivamente [106], [107].

La opción tecnológica implementada en el presente trabajo, consistió en obtener películas delgadas (1 mm de espesor) de la mezcla alginato/plasma sanguíneo, que son entrecruzadas mediante la aspersion de cloruro de calcio logrando de esta manera la formación de una película uniforme. A través de esta metodología es posible obtener películas homogéneas, ya que la solución de calcio se distribuye homogéneamente y se empieza a difundir a través de la mezcla hasta que alcanza toda la película. Blandino *et al.* [157] afirman que el calcio por ser un catión metálico de un tamaño pequeño comparado con las moléculas del polímero es el que se difunde a través de las moléculas de alginato,

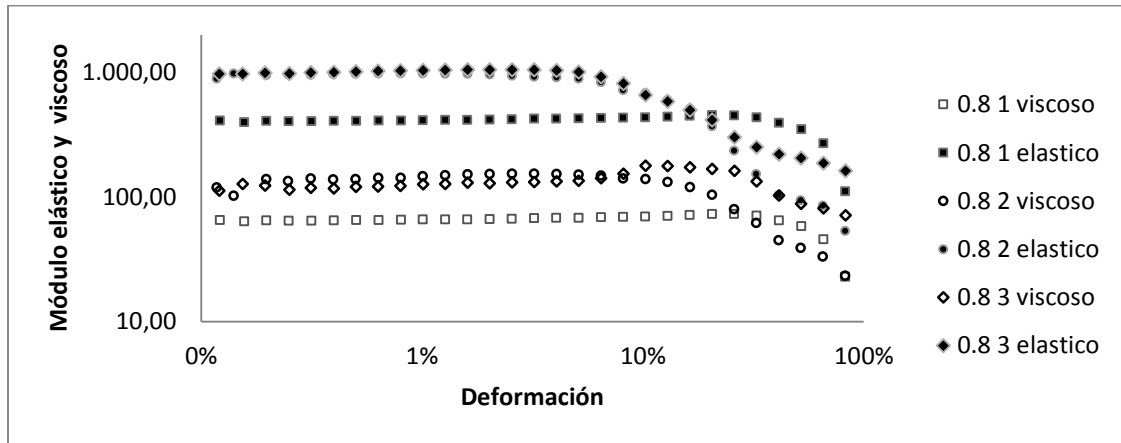
enlazándose a sitios no ocupados en el polímero; una vez la solución catiónica es adicionada sobre el alginato se forma instantáneamente una membrana, la cual crece a lo largo de la dirección de flujo de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hasta que se ubican en el fondo de la película y así finaliza el proceso de gelificación. Este procedimiento es relativamente sencillo y no requiere de implementos sofisticados, además se puede realizar en condiciones estériles en cámara de flujo laminar, la boquilla puede ser esterilizada mediante vapor húmedo (si el material de construcción es acero inoxidable) u óxido de etileno (aluminio). Por último, gracias a que no se requiere cambio de temperatura para que se produzca la gelificación, se pueden adicionar células en suspensión a la mezcla con lo cual generar un equivalente.

### 2.2.5 Reología dinámica de los geles obtenidos

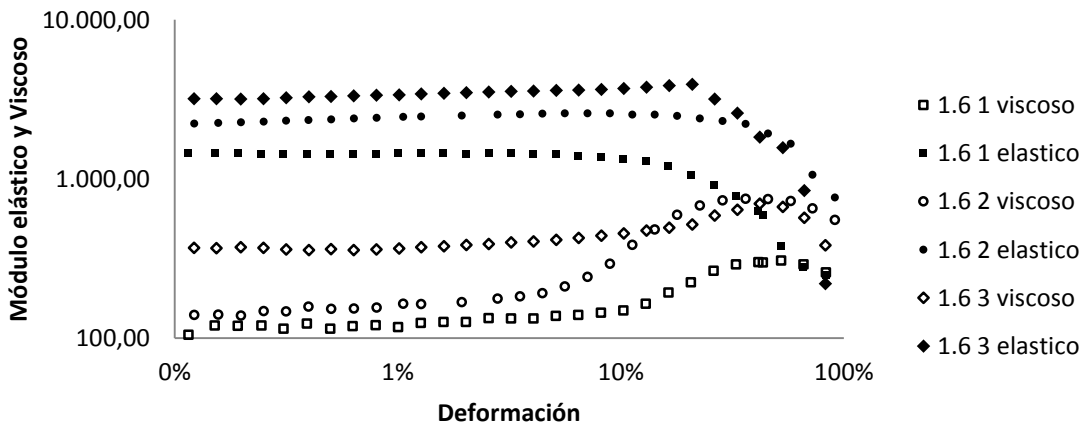
A partir de los resultados obtenidos en Zetametria se determinó que las concentraciones de alginato en la mezcla con plasma sanguíneo a evaluar, mediante reología dinámica, serían 0.8 % y 1.6 %, por ser las más estables; adicionalmente se escogieron 3 concentraciones de cloruro de calcio para realizar la gelificación: 1%, 2%, 3% p/v.

Inicialmente se realizaron ensayos para determinar la región viscoelástica lineal (VLR) mediante ensayos de *amplitude sweep*. La Figura 2-4 y la Figura 2-5 muestran que en todos los ensayos predomina el comportamiento elástico sobre el comportamiento viscoso ( $G' > G''$ ), lo cual implica que efectivamente se presentó la transición de fase de desorden –orden; también se pudo determinar la formación de 2 regiones, una llamada región viscoelástica lineal (VLR: *Viscoelastic linear region*) en la cual  $G'$  y  $G''$  son prácticamente constantes, y una no lineal en la cual  $G'$  y  $G''$  decrece en la medida en que aumenta la deformación. En la Figura 2-4 (para el 0.8% de alginato de sodio) se puede apreciar que la región VLR para los 3 ensayos se tiene hasta una deformación cercana al 10%, y en la Figura 2-5 (para el 1.6% de alginato de sodio) esto también se mantiene para las concentraciones cloruro de calcio al 1% y 3%, sin embargo para el ensayo al 3% se presenta una inestabilidad antes de alcanzar el 10%. Por esta razón se decidió que la deformación que se podría escoger para los ensayos de *frequency sweep* debía ser 1%,

para garantizar que estuviera lejos de cualquier inestabilidad del material. Estos resultados son similares a los obtenidos por Moresi *et al.* [108] quienes evaluaron el comportamiento reológico de alginato de calcio de viscosidad media de Sigma-Chem y reportan un valor crítico para la deformación en 3.3% para concentraciones en peso de 1.50 % y 1.75 % en alginato

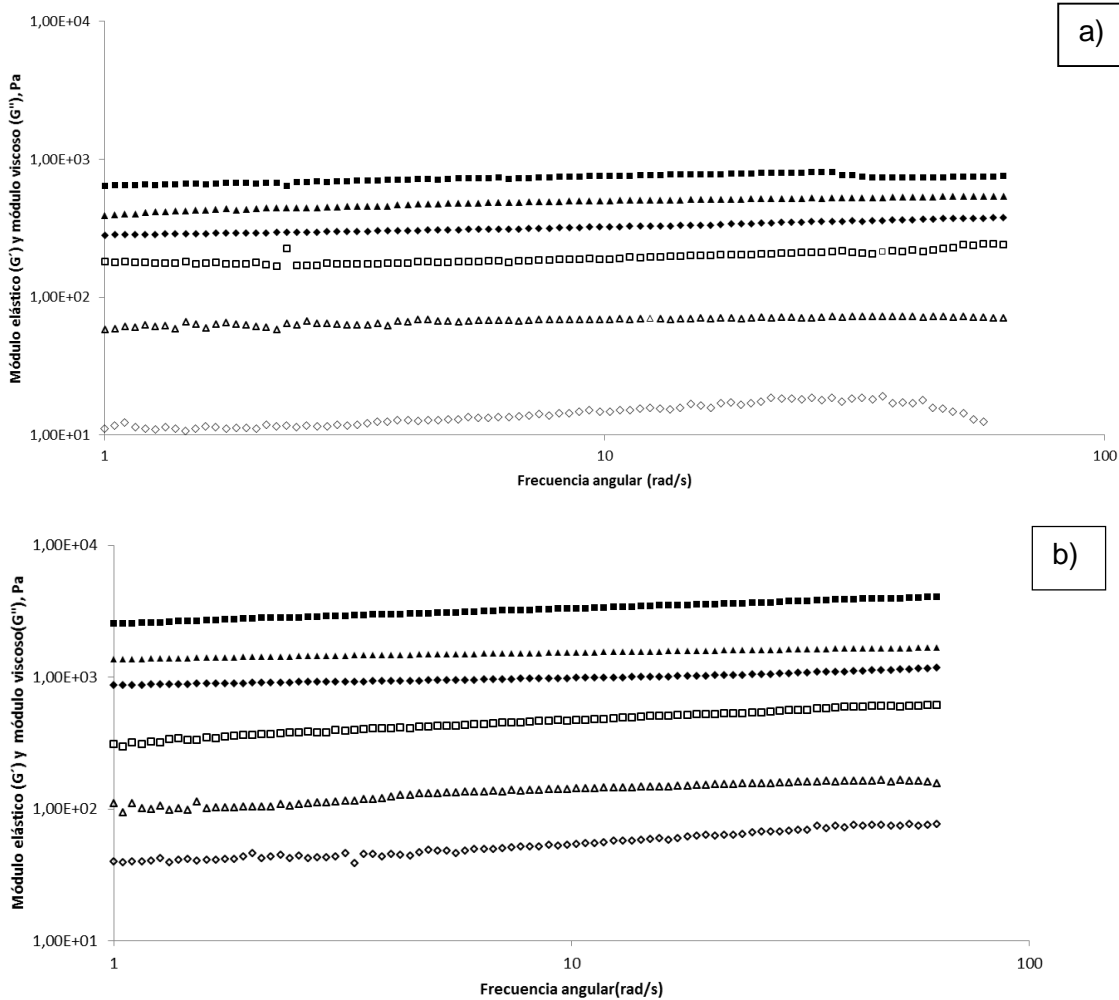


**Figura 2-4:** Determinación de la Región Viscoelástica Lineal (VLR) para la mezcla plasma sanguíneo/alginato de sodio al 0.8%. La región viscoelástica lineal permanece hasta una deformación cercana al 10%.



**Figura 2-5:** Determinación de la Región viscoelástica lineal (VLR) para la mezcla plasma sanguíneo/alginato de sodio al 1.6%. La región viscoelástica lineal permanece hasta una deformación cercana al 10%.

Los resultados obtenidos para los ensayos de *frequency sweep* aparecen en la Figura 2-6 (a y b). Como se puede apreciar en estos ensayos predomina el módulo elástico ( $G'$ ) sobre el módulo viscoso ( $G''$ ), lo cual indica que en todos los ensayos se presentó el cambio de fase al pasar de líquido a sólido. De hecho, existe un orden de magnitud entre  $G'$  y  $G''$  lo cual ratifica lo mencionado anteriormente, y es característico de los alginatos como lo reportan el grupo de Moresi *et al.* [107], [108].



**Figura 2-6:** *Frequency sweep* para películas de alginato de calcio/plasma para: a) concentraciones de 0.8% en alginato y b) concentraciones de 1.6% en alginato para concentraciones de calcio:  $\blacklozenge, \blacklozenge$  1% w/v;  $\blacktriangle, \triangle$  2% w/v;  $\blacksquare, \square$  3% (w/v). Módulo de almacenamiento  $G'$ : símbolos llenos y módulo de pérdida  $G''$ : símbolos abiertos. En todos los ensayos  $G' > G''$ , lo cual indica que existió gelificación.

Un criterio importante en el estudio de la gelificación lo constituye el llamado punto de gel, el cual es el punto de separación entre dos fases: una dominada por el comportamiento viscoso ( $G'' > G'$ ) y la otra dominada por el comportamiento elástico ( $G' > G''$ ) [158], [159]. Moresi et al. [107] describieron la transición de fase del entrecruzamiento cerca del punto de gel o después de la transición sol-gel, como una función del módulo de almacenamiento o módulo viscoso ( $G''$ ) y del módulo de pérdida o elástico ( $G'$ ) en función de la frecuencia, como se muestra a continuación:

$$G'(\omega) = G_{\infty, \alpha} + \sqrt{\frac{2}{\pi}} s_{\alpha}^* \cos\left(\frac{\pi}{2} \alpha\right) \omega^{\alpha} \quad (2-2)$$

$$G''(\omega) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} s_{\alpha}^* \sin\left(\frac{\pi}{2} \alpha\right) \omega^{\alpha} \quad (2-3)$$

donde  $\omega = 2\pi f$  es la frecuencia angular,  $f$  es la frecuencia y  $\alpha$  es el orden de la función de relajación, mientras que  $G_{\infty, \alpha}$  y  $s_{\alpha}^*$  son los módulos de equilibrio y parámetro del material para el valor de  $\alpha$ , respectivamente. Asumiendo que el módulo de equilibrio ( $G_{\infty, \alpha}$ ) es igual a cero (lo cual es cierto para el estado de sol y en el punto de gel) o despreciable (válido en el estado de gel en un limitado rango de frecuencia solamente), la tangente de fase ( $\delta$ ) depende solamente de  $\alpha$  mientras el módulo cortante dinámico complejo ( $G^*$ ) es función de  $\alpha$  y  $S^* \alpha$ :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \tan\left(\frac{\pi}{2} \alpha\right) \quad (2-4)$$

$$G^*(\omega) = \sqrt{(G')^2 + G''^2} = \sqrt{\frac{2}{\pi}} s_{\alpha}^* \omega^{\alpha} \quad (2-5)$$

$$G^* \approx A_{\alpha} \omega^{\alpha} \quad (2-6)$$

Desde el punto de vista de la estructura tridimensional, el término  $\alpha$  hace relación al orden de la función de relajación y el término  $A_{\alpha}$  es una medida de la resistencia del entrecruzamiento de la red polimérica. Mediante la minimización de la suma de cuadrados entre los datos experimentales y los datos ajustados, para el módulo Complejo ( $G^*$ ) se obtuvo un modelo matemático en función de la frecuencia angular  $\omega$ . Los parámetros fueron ajustados dentro de un intervalo de confianza del 95%, con un 97% de variabilidad, como aparece reportado en la Tabla 2-4.

74 Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

**Tabla 2-4:** Ajuste matemático para los ensayos de *frequency sweep*.

Ensayo[%alginato/-%cloruro de calcio]	$A\alpha$ , [Pa rad- $\alpha$ s $\alpha$ ]	Intervalo de confianza para $A\alpha$ ,	$\alpha$	Intervalo de confianza para $\alpha$	$r^2$
0.8-1	279.5	277.95-281.05	0.0607	0.058-0.063	0.9550
0.8-2	386.6	382.42-390.81	0.1646	0.1598-0.1693	0.9404
0.8-3	431.05	427.54-434.58	0.1303	0.940-0.160	0.9955
1.6-1	933.9	929.64-938-16	0.0650	0.063-0.067	0.9766
1.6-2	1405	1400.98-1409.02	0.0488	0.047-0.050	0.9829
1.6-3	2490	2420.47-2561.52	0.1040	0.0974-0.1105	0.9967

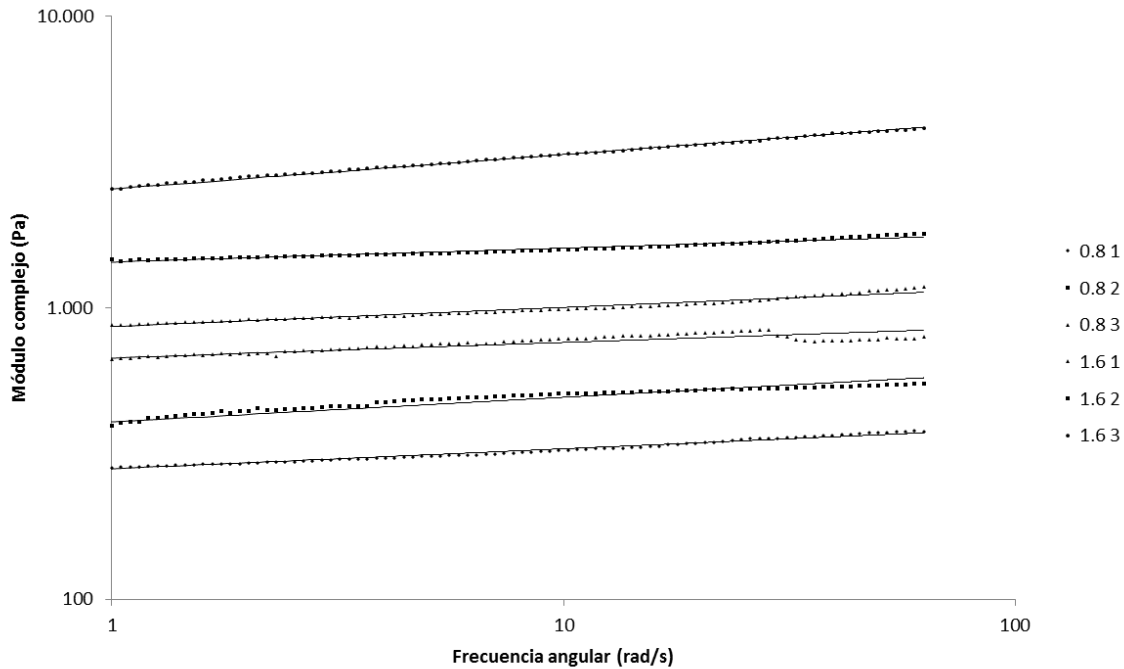
Recientemente, Yang *et al.* [155] realizaron la caracterización de alginato de sodio cuya referencia es la misma del empleado en este trabajo (Sigma-Aldrich Ref: A2033) mediante RMN (resonancia magnética nuclear), y hallaron un porcentaje de ácido gulurónico del 40% y de ácido manurónico del 60%, similar a la presentada en la ficha técnica del alginato. Moresi *et al.* [108] reportaron valores de  $A\alpha$  de  $8380 \pm 190$  Pa rad- $\alpha$  s $\alpha$  y  $10940 \pm 220$  Pa rad- $\alpha$  s $\alpha$  para concentraciones de 1.5% y 1.75%, respectivamente; dichos valores resultan superiores a los obtenidos en el presente trabajo para la concentración de 1.6%, entre

933.9 ± 70.1 y 2490 ± 71.52 Pa rad-α sα (Tabla 2-4). Cabe anotar que esta comparación se puede realizar porque la composición del alginato de calcio empleado por Moresi *et al.* [108] era ácido gulurónico: 35 %; ácido manurónico: 65 %. La diferencia entre el mencionado trabajo y éste se debe a la presencia de las proteínas en el plasma sanguíneo que hacen que la estructura de caja de huevos, reportada por Grant *et al.* [103] para polisacáridos como el alginato, no se forme ya que las proteínas interfieren en la unión entre ácidos gulurónicos ocasionando una menor resistencia en el gel. En cuanto al valor de n, Moresi *et al.* [108] reportan un valor de 0.050 para concentraciones de 1.0% a 1.75% en peso, debido a que emplean la cantidad estequiométrica de calcio para la gelificación, mientras que en el presente trabajo el calcio se halla en exceso por lo cual para los ensayos con alginato al 0.8% y calcio al 2% y 3% el valor de α resulta superior al reportado en el mencionado trabajo; para la concentración de alginato al 1.6% y cloruro de calcio al 3% presenta un valor de α superior a 0.050 lo cual indica exceso en la concentración de calcio. Además, como se puede ver en la Tabla 2-4 la resistencia del gel aumenta en la medida en que aumenta la concentración de cloruro de calcio, al generar más puntos de entrecruzamiento entre las unidades de ácido gulurónico.

La magnitud de G' es mucho mayor que la de G'' (ver Figura 2-6), por lo cual la contribución de G'' a la magnitud de G\* es prácticamente despreciable, y se pueden igualar G' y G\*. Lo anterior, físicamente implica que el comportamiento de las películas es similar al de un sólido y no a un líquido. Lo anterior matemáticamente puede ser escrito como:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} s_{\alpha}^* \cos\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right) \omega^{\alpha} \quad (2-7)$$

La Figura 2-7 presenta el módulo complejo vs la frecuencia angular (ω) para los ajustes realizados y presentados en la Tabla 2-4. Como se puede ver la combinación de alginato de sodio al 1.6% y cloruro de calcio al 3% es la que ofrece un mayor módulo complejo, que además se refleja en una mayor resistencia en ensayos de tensión y compresión, razón por lo cual se evaluó en ensayos de tensión mecánica.



**Figura 2-7:** Módulo Complejo ( $G^*$ ), datos experimentales y datos ajustados según el modelo matemático  $G^*(\omega) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} s_{\alpha}^* \cos\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right) \omega^{\alpha}$ . El ajuste realizado demuestra que el comportamiento viscoso de los geles es prácticamente despreciable al ser comparado con el comportamiento elástico ( $G'' \ll G'$ ).

### 2.2.6 Caracterización mecánica de los geles obtenidos

La caracterización del comportamiento mecánico se realizó para la película obtenida con la mezcla de plasma sanguíneo humano con alginato de sodio al 1.6% entrecruzada con cloruro de calcio al 3%, la cual fue seleccionada por presentar el mayor módulo complejo. La caracterización de 4 películas se presenta en la Tabla 2-5.

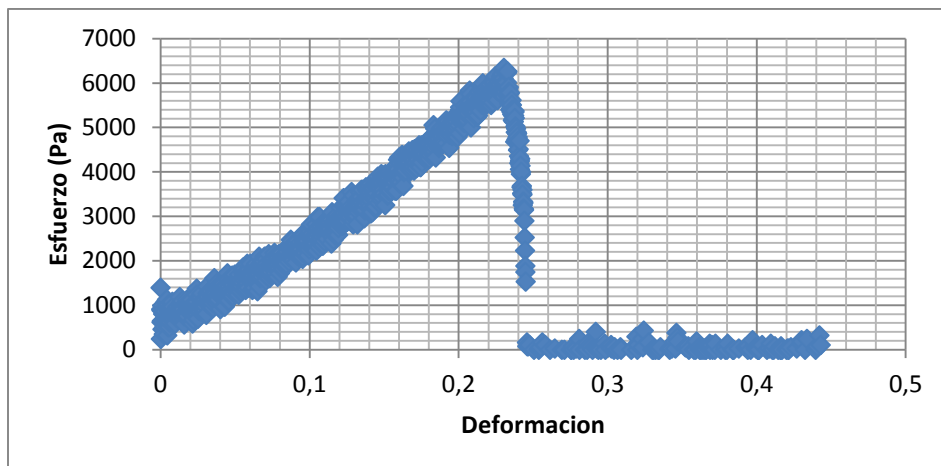
El valor promedio para el esfuerzo último a tensión es  $6.369 \pm 0.243$  kPa, el Módulo de Young es  $22.487 \pm 1.281$  kPa y la deformación máxima es  $0.2425 \pm 0.0096$ . La Figura 2-8 presenta el diagrama de tensión vs deformación para una película de alginato plasma sanguíneo al 1.6% de alginato con calcio al 3% p/v. Para piel, el valor reportado para el

Módulo de Young es 0.1-2.0 MPa y UTS 1-20 MPa, esos valores son considerablemente más altos respecto a los obtenidos para los geles en este trabajo; sin embargo, son del mismo orden de magnitud al Módulo de Young reportado para esponjas de colágeno (0.017-0.029 MPa) y para una matriz poblada de fibroblastos (0.08-0.8 MPa) [160]. Los valores reportados para geles de fibrina es 50.85-133 kPa para UTS [19] [161] y 28.56-26.96 kPa para el Módulo de Young [76]. Como referente, Wang *et al.* [162] reportan un valor de 14.6 kPa para un pegante de fibrina preparado con fibrinógeno y cloruro de calcio el cual es un valor superior al reportado en este trabajo, pero la estructura del fibrinógeno y la alta concentración del mismo contribuyen a dicho valor.

**Tabla 2-5:** Caracterización mecánica de una película de alginato/plasma.

Esfuerzo último a tensión, Pa	Módulo de Young, Pa	Coefficiente de correlación en la región lineal	Deformación máxima
6270.82	20642.7	0.97905	0.25
6343.5	22978.01	0.97537	0.23
6713.84	22734.98	0.98554	0.25
6149.37	23592.17	0.97315	0.24

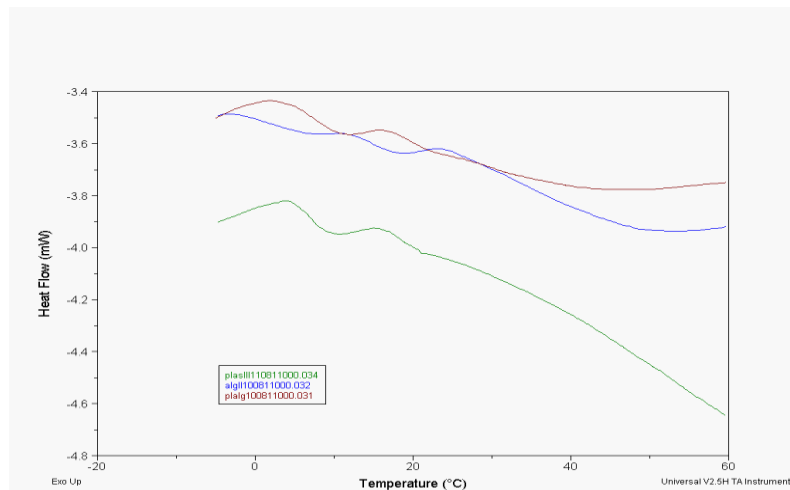
La película obtenida puede ser manipulada por parte del personal médico y resulta un avance en la Ingeniería Tisular al no requerirse la purificación del fibrinógeno para su fabricación. Se puede realizar la encapsulación de fibroblastos y determinar si hay proliferación dentro del gel (capítulo 4 de este trabajo), y también si es posible formar micropartículas mediante la dispersión de la mezcla de plasma/alginato de sodio sobre una solución de cloruro de calcio (capítulo 3 de este trabajo). Por último es posible usar la película obtenida como sutura similar a Sorbsan® (alginato biodegradable) o Fibracol plus (apósito de colágeno con alginato), aprovechando las ventajas mecánicas y como hidrogel que ofrecería alginato, y la presencia de fibrina que favorecería la integración con la herida.



**Figura 2-8:** Resistencia mecánica vs deformación para una película de plasma sanguíneo humano-alginato de calcio al 1.6% formada con cloruro de calcio al 3% p/v.

### 2.2.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

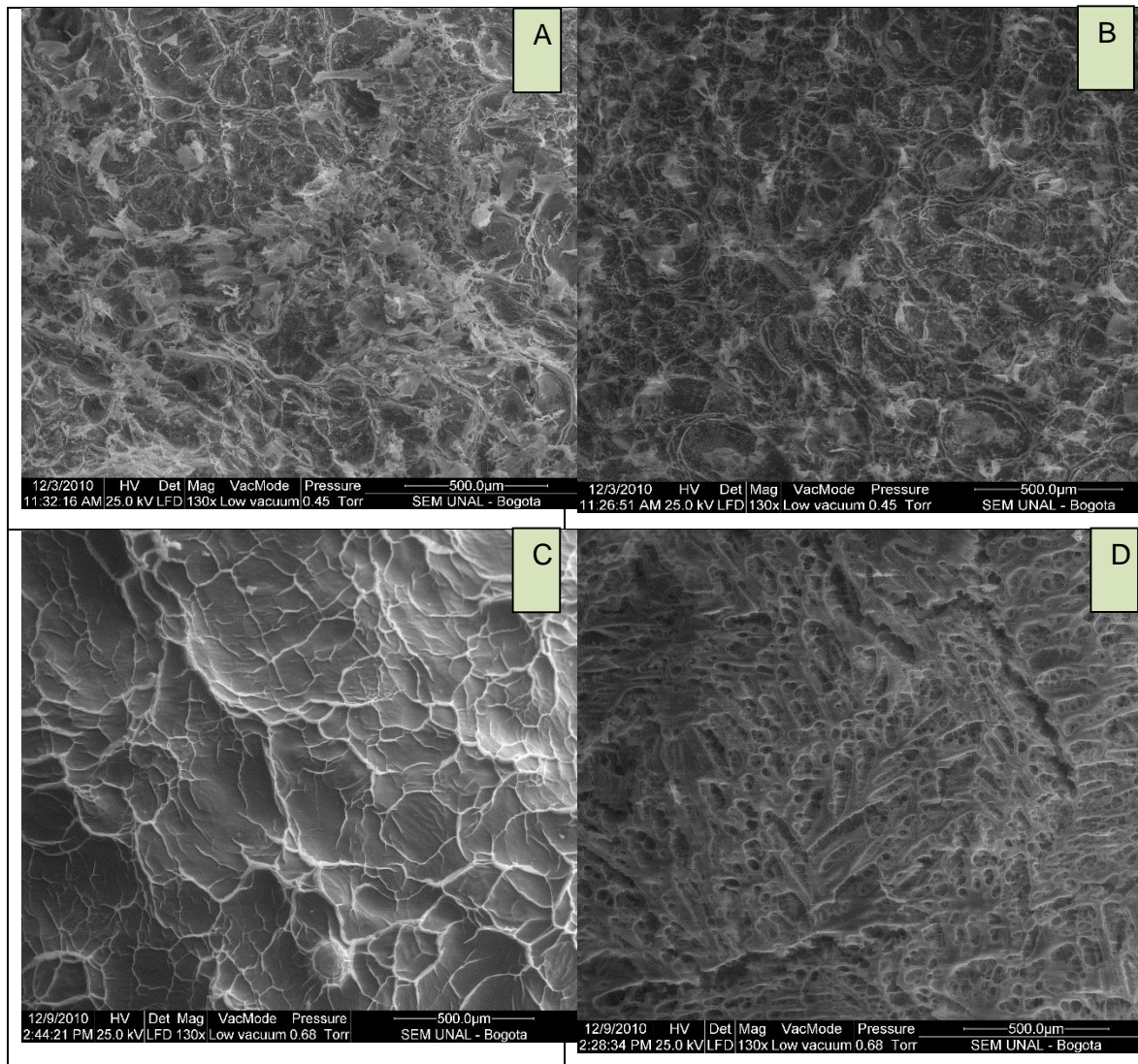
Los resultados obtenidos para la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se presentan en la Figura 2-9. En esta Figura se presentan los termogramas de plasma sanguíneo humano gelificado, alginato de calcio y la mezcla de plasma sanguíneo humano con alginato de calcio gelificado. Como se aprecia en esta Figura el comportamiento del plasma sanguíneo muestra dos transiciones a 5 °C y 18 °C, las cuales no están presentes en el termograma del alginato, pero si están presentes en el termograma de la mezcla. Dada la complejidad del sistema no es posible determinar a qué tipo de transición corresponden los mencionados picos, es posible que la transición a 5 °C corresponda a humedad remanente. Ya que los dos picos están presentes tanto en el plasma gelificado como en la mezcla, se puede suponer que ha existido también gelificación del plasma presente en la mezcla con alginato.



**Figura 2-9:** DSC a una muestra de plasma sanguíneo humano gelificado con cloruro de calcio (verde), alginato de calcio al 1.6% p/v gelificado con cloruro de calcio (azul) y la mezcla plasma sanguíneo humano/alginato de sodio al 1.6% p/v gelificada con cloruro de calcio (rojo). Existen dos transiciones a 5 °C y 18 °C presentes en el plasma sanguíneo humano gelificado y en la mezcla de plasma sanguíneo-alginato de sodio gelificada; esa transición no aparece en el alginato de sodio gelificado.

## 2.2.8 Evaluación de las películas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 2-10 muestra la microscopía electrónica de barrido (SEM) para las mezclas de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano al 0.8% (A) y al 1.6% (B), contrastadas con las de alginato de calcio (C) y plasma sanguíneo humano (D). Como se puede ver la estructura de la mezcla muestra un esqueleto de alginato sobre el cual se anclan las proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Sin embargo, la estructura que presentan las proteínas cuando se realiza la mezcla es distinta a la que presenta el plasma cuando se ha gelificado con el calcio sin alginato presente (C). La estructura de A es bastante porosa, lo cual garantiza un área superficial bastante alta para servir de anclaje para el cultivo de células humanas.



**Figura 2-10:** Fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para: A) 0.8% de alginato de calcio y 3% de cloruro de calcio; B) 1.6% de alginato de calcio y 3% de cloruro de calcio; C) Alginato de sodio al 1.6% entrecruzado con cloruro de calcio al 3%; D) Plasma sanguíneo entrecruzado con cloruro de calcio. La estructura del alginato (C) aparece como esqueleto sobre el cual se anclan las proteínas (A y B); la estructura de la superficie presente en (D) es distinta a la que aparece en (A y B), lo cual puede afectar la adhesión y proliferación celular.

## 2.3 Conclusión

Mezclas de alginato de sodio y plasma sanguíneo humano al 0.2%, 0.4%, 0.8% y al 1.6 % p/v de alginato fueron caracterizadas en su comportamiento reológico (viscometría) y el potencial  $\xi$ . La presencia de alginato incrementó la viscosidad de la mezcla presentando un comportamiento seudoplástico, acorde a lo planteado en la literatura; adicionalmente, las concentraciones al 0.8% y 1.6% resultaron bastante estables debido a un alto potencial  $\xi$  que garantiza que no se precipitan las proteínas/polisacáridos presentes en las mezclas. Para estas dos mezclas, se evaluó la gelificación mediante la aspersion de soluciones de cloruro de calcio al 1%, 2% y 3% p/v. Mediante reología dinámica se determinó la región viscoelástica lineal (VLR) de los geles la cual se tiene hasta el 1% de deformación. Los barridos de frecuencia entre 0.1 Hz y 10 Hz mostraron que en los geles predomina el comportamiento de sólido sobre el líquido ( $G' > G''$ ). Los geles fabricados con una concentración al 1.6% de alginato mostraron un UTS de  $6.369 \pm 0.243$  kPa. La microscopía electrónica de barrido (SEM) muestra una morfología que deja entrever que en la superficie hay proteínas presentes, pero la morfología de dichas proteínas es distinta a la que presenta el plasma sanguíneo gelificado.

82 Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio

---

## **3. Generación de microportadores de plasma sanguíneo y alginato de sodio para el crecimiento de fibroblastos en bio-reactor**

Una vez determinadas las condiciones para la gelificación de la mezcla de plasma sanguíneo y alginato, se procedió a establecer las condiciones para la generación de microportadores, que puedan ser utilizados para el cultivo de fibroblastos, de la línea 3T3 y humanos, usando biorreactores del tipo Spinner. En este capítulo se presenta la estandarización realizada para la generación de microesferas, la adsorción de poli-lisina y de fibrinógeno sobre la superficie de estas esferas, la adhesión de fibroblastos 3T3 a los microportadores y la proliferación celular usando biorreactores.

### **3.1 Materiales y métodos**

#### **3.1.1 Obtención de plasma y crioprecipitado de plasma sanguíneo humano**

Siguiendo lo planteado en el numeral 2.1.2, se realizó la mezcla de 10 unidades de plasma sanguíneo humano del tipo O+ en condiciones estériles en cabina de flujo laminar; adicionalmente, se eliminó el fibrinógeno precipitado mediante la centrifugación a 7,100 X g durante 20 minutos. El sobrenadante se sometió a filtración usando el cartucho de filtración Millipore con tamaño de poro de 8 µm. El plasma sanguíneo se almacenó en recipientes ámbar de vidrio marca Schott (Mainz, Alemania) de 500 ml de capacidad, los cuales se mantuvieron congelados – 30 °C.

El crioprecipitado de plasma sanguíneo fue donado por la Secretaría de Salud Distrital. Se tomaron 20 unidades del tipo O+, las cuales fueron descongeladas y mezcladas en cabina de flujo laminar, se homogenizó y se distribuyó un volumen de 10 ml en tubos cónicos de

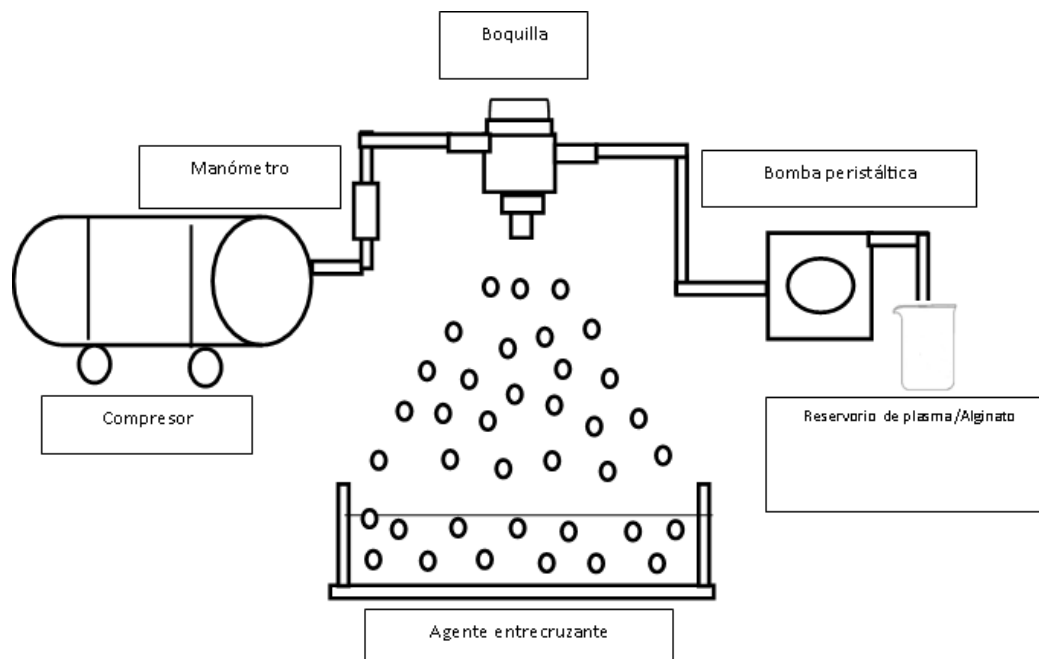
15 ml de capacidad marca Falcon. Se guardaron en nevera a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron en la medida en que se requirió crioprecipitado, acorde al diseño experimental. Tanto la mezcla del plasma sanguíneo como la mezcla del crioprecipitado fueron enviadas al Laboratorio Clínico (Sanitas EPS, Bogotá, Colombia), para la determinación de tiempo de trombina, concentración de fibrinógeno, glucemia basal, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos.

### **3.1.2 Reactivos**

Ácido algínico (Ref: A2033), suero fetal bovino (Ref: F-2442), medio DMEM-F12 (Ref: D-2906) y solución balanceada de Hank's (Ref: H-2387) fueron comprados a Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, USA); cloruro de calcio (Ref: 433381) y cloruro de sodio (Ref: 479687) fueron comprados a Carlo Erba (Strada Rivoltana, Italia); poli-L-lisina hidrobromuro (PLL) en una concentración 0.1% p/v en agua (PM: 21,000 Da) fue comprada a Alamanda Polymers (Huntsville, USA); Anti biótico/anti micótico (anti-anti, Ref: 15240 ) fue usado el comercializado por Gibco (Invitrogen); tranexam® (ácido tranexámico 100 mg/ml) comprado a Laboratorios Ropsohn; trombina (Thrombine test 30 UI/ml) fue empleado el producido por Behringwerke (Marbug, Alemania).

### **3.1.3 Formación de microesferas de alginato**

Para evitar el gasto de plasma sanguíneo en la estandarización del proceso de obtención de microportadores, se utilizó una solución de alginato de sodio al 1.6% p/v para determinar las condiciones para generar las microesferas. Las variables que se evaluaron fueron: presión del aire: 5 psig, 7 psig y 9 psig; flujo del alginato de sodio:  $125.6 \pm 7.22$  ml/h y  $367.56 \pm 1.13$  ml/h y distancia desde la salida de la boquilla a la superficie del baño gelificante: 20 cm y 30 cm, acorde a lo reportado en la literatura [104]. La Figura 3-1 presenta el esquema del montaje experimental empleado.

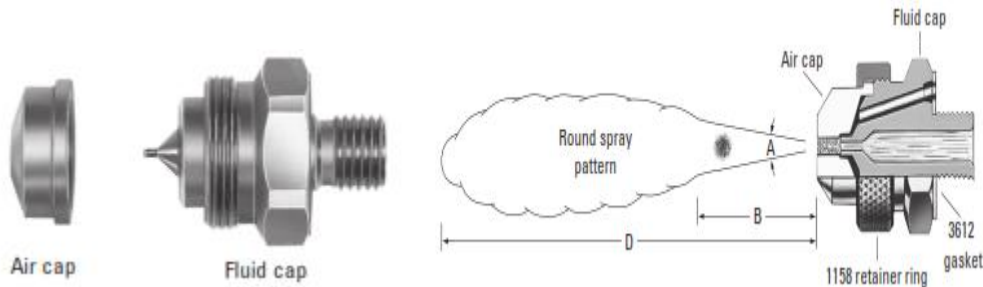


**Figura 3-1:** Montaje experimental para la generación de microportadores. El elemento central es la boquilla en la cual convergen la solución de plasma/alginate y el aire, las micropartículas obtenidas se descargan sobre una solución de alginate de calcio.

La boquilla empleada para la atomización de la solución fue *Air Atom 1/8 J* fabricada en acero inoxidable 303 (*Spraying Systems Co*, [www.spray.com](http://www.spray.com)). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Para cada una de las condiciones a evaluar se descargaron las microesferas durante 1 minuto sobre la solución de cloruro de calcio 0.27 M (3% p/v). Se dejaron gelificar durante 30 minutos en una incubadora Thermo Scientific (Ref: Series 8000, Waltham, USA) a 37 °C, para garantizar que la parte central de las microesferas se pudiera entrecruzar. La Figura 3-2 presenta las características de la boquilla empleada. Para las condiciones de flujo empleadas los valores que caracterizan la boquilla son: A: 13°, B: 30 cm y D: 2.7 m.

Una vez obtenidas las microesferas, se tomó una muestra y se realizó tinción con azul de toluidina al 0.5% en metanol durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua destilada, se colocaron en una lámina portaobjetos y se observaron en un microscopio invertido dotado con cámara digital Nikon Digital Camera DXM 1200 con un aumento 10 X. Se tomaron 5 fotografías a cada uno de los tratamientos evaluados y mediante el empleo del software ImageJ ([www.rsweb.nih.gov/ij](http://www.rsweb.nih.gov/ij)) se determinó el diámetro

de los microportadores. Se realizó el análisis estadístico para determinar el diámetro promedio y la desviación estándar.



**Figura 3-2:** Características de la Boquilla Air Atom 1/8 J (Spraying Systems).

### 3.1.4 Generación de microportadores con plasma humano y alginato de sodio

Con las condiciones establecidas para la generación de microesferas de alginato de sodio (presión del aire 5 psig, distancia entre la boquilla y la solución de cloruro de calcio 20 cm y flujo de la mezcla  $125.6 \pm 7.22$  ml/h), se generaron microportadores usando la mezcla plasma sanguíneo humano/alginato de sodio al 1.6% p/v de alginato. La mezcla se descargó sobre una solución de cloruro de calcio 0.27 M. Se dejaron gelificar los microportadores durante 30 minutos en la mencionada solución a 37 °C en incubadora Thermo Scientific (Ref: Series 8000, Waltham, USA). Se tomó una muestra y se realizó tinción con Azul de toluidina al 0.5% en metanol, durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada, se colocaron en una lámina portaobjetos y se observaron al microscopio. Se tomaron 5 fotografías a los microportadores obtenidos en el microscopio invertido Nikon Digital Camera DXM 1200 con un aumento 10 X y mediante el uso del software ImageJ ([www.rsweb.ni.gov/ij](http://www.rsweb.ni.gov/ij)) se determinó el diámetro promedio y la desviación estándar de los microportadores obtenidos.

Los microportadores fueron tamizados, usando tamices estándar (ajustados a la norma ASTM E 1187) con tamaño de malla 150, 500 y 1000  $\mu\text{m}$ . Se seleccionaron los microportadores cuyo tamaño estuviera entre 150  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ . Se colocaron en solución

de cloruro de calcio al 1% p/v y se dejaron estabilizar durante 12 horas. Se tomaron 5 fotografías a los microportadores obtenidos, y se determinó el diámetro promedio y la desviación estándar, siguiendo la metodología empleada previamente.

Una vez tamizados los microportadores, fueron centrifugados a 1000 X *g* durante 10 minutos en una centrífuga Sorwall a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante. Se re-suspendieron en solución de cloruro de calcio al 1% p/v y se almacenaron en nevera a una temperatura de 8 °C.

Para determinar la concentración de microportadores por unidad de volumen, se construyó una curva de calibración que relaciona el volumen empacado y la concentración de microportadores. Para ello se tomó un volumen de 5 ml de microportadores con concentraciones de 20,000 microportadores/ml, 70,000 microportadores/ml y 120,000 microportadores/ml, y se determinó el volumen empacado por los microportadores correlacionando con el conteo de microportadores por unidad de volumen, para lo cual se realizaron diluciones de la solución de microesferas, se tomaron 20 µl y se colocaron sobre una lámina para microscopio, se contaron los microportadores presentes y se multiplicó por el factor de dilución. La dilución se debe realizar hasta garantizar que las esferas no queden superpuestas en la vista al microscopio. Cada conteo se realizó por triplicado.

### **3.1.5 Adsorción de poli-L-lisina (PLL) sobre los microportadores**

Sobre los microportadores obtenidos en el apartado anterior se realizó la adsorción de PLL. La velocidad de adsorción de PLL sobre los microportadores se determinó mediante la determinación de proteína libre en el sobrenadante usando el protocolo de Bradford (Anexo E), acorde a lo reportado en la literatura [121], [122], [163]. Se preparó una solución de 70,000 microportadores/ml en solución de cloruro de calcio al 1 % p/v. En una caja de microtécnica de 6 pozos se adicionaron a 3 pozos 500 µl de la suspensión de microportadores y a 3 pozos 500 µl de la solución de cloruro de calcio al 1 % p/v. A todos los pozos se les adicionaron 500 µl de la solución de PLL al 0.1 % p/v. Se colocó la caja de microtécnica en un agitador orbital (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 37 °C y 100 r.p.m. Se determinó el contenido de proteína libre cada 10 minutos durante 1 hora, tomando muestras de 50 µl.

### 3.1.6 Adsorción de fibrinógeno sobre los microportadores

Sobre la superficie de los microportadores se realizó la adsorción de PLL y fibrinógeno. Se preparó una suspensión de microportadores cargados con PLL en concentración de 70,000 microportadores/ml. La evaluación de la adsorción de fibrinógeno se realizó en cajas de microtécnica de 6 pozos: en 3 de ellos se colocaron 500  $\mu$ l de la suspensión de microportadores y 500  $\mu$ l de la solución de crioprecipitado (dilución 1:500 de crioprecipitado de plasma en solución salina isotónica), en 2 de ellos la solución 500  $\mu$ l de solución salina isotónica y 500  $\mu$ l de crioprecipitado sin microportadores (dilución 1:500 de Crioprecipitado de plasma en solución salina isotónica), y en 1 de ellos 1000  $\mu$ l de la solución salina. La caja de microtécnica se colocó en un agitador orbital (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 37 °C y 100 r.p.m. Se determinó el contenido de proteína en el medio siguiendo el protocolo de Bradford (Anexo E) cada 30 minutos durante 120 minutos [122], tomando muestras de 50  $\mu$ l.

### 3.1.7 Entrecruzamiento del fibrinógeno con trombina

Los microportadores cargados con poli-l-lisina y fibrinógeno fueron entrecruzados con trombina. La trombina se encontraba liofilizada en presentación de 30 UI/ml y se re-suspendió en 1ml de solución salina isotónica (0.85% p/v). Se preparó una suspensión de microportadores con un volumen empacado de 0.5 (en solución salina isotónica), el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 0.1 UI/ml. Se dejaron incubar durante 30 minutos a 37 °C. Se centrifugaron a 500 X g por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron con solución salina isotónica 2 veces. Se conservaron en solución salina suplementada con ácido tranexámico al 0.5%, como está reportado en la literatura para evitar la fibrinólisis [60], manteniendo un volumen empacado de 0.5. Estos microportadores se denominaron APF (alginato/plasma, polilisina, fibrinógeno).

### 3.1.8 Evaluación de la adhesión celular

Los microportadores cargados con PLL y fibrinógeno y entrecruzados con trombina (APF) fueron evaluados en su capacidad para adherir fibroblastos en su superficie. Se emplearon fibroblastos 3T3 donados por el doctor Francisco Arvelo del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Se cultivaron a partir de células crio-preservedas en nitrógeno líquido. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80% en un frasco T-75, se tripsinizaron (siguiendo el Protocolo establecido en el Anexo B) y se realizó conteo celular usando azul de tripano (Anexo C). Se re-suspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino, 1% de antibiótico- antimicótico y 0.5% de Tranexam<sup>®</sup> de tal manera que se garantizara una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Para evaluar la adhesión celular se modificó la metodología propuesta por Shivakumar et al. [129], Wissemann y Jacobson [141] y Sun et al. [164], en la cual se cuantifican las células no adheridas a los microportadores a través del tiempo. Se preparó una suspensión de 15,000 microportadores APF/ml de solución salina isotónica, la cual se centrifugó a 500 X g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%. Se colocaron 5 ml de la suspensión de microportadores en un pozo de una caja de microtécnica de 6 pozos recubierta con agarosa al 1% p/v, se adicionaron 750  $\mu$ l de la suspensión de fibroblastos de tal manera que la relación de células a microportadores fuera 10:1.

La concentración celular de fibroblastos no adheridos a los microportadores a través del tiempo se determinó por conteo en cámara de Neubauer, previa tinción con azul de Tripano (Anexo C) tomando muestras cada media hora, durante 2 horas.

### 3.1.9 Evaluación del crecimiento celular en reactor *spinner*

La evaluación en reactor *spinner* se realizó con fibroblastos de la línea 3T3. El reactor consiste en un frasco con tapa de marca Schott (Mainz, Alemania) de 100 ml de capacidad, al cual se le acopló una boquilla lateral en vidrio con tapa y se le adaptó un agitador en

vidrio provisto con elementos magnéticos; el agitador se aseguró a la tapa del reactor mediante una conexión con manguera de silicona, tal como se aprecia en la Figura 4-1. Se evaluaron dos concentraciones de microportadores a nivel del reactor *spinner*: 10,000 microportadores/ml y 20,000 microportadores/ml, con la misma concentración inicial de células,  $1 \times 10^5$  células/ml. Para el cultivo en reactor, se tomaron los microportadores APF, suspendidos en solución salina isotónica y 0.5% de tranexam<sup>®</sup> manteniendo un volumen empacado de 0.5. Se tomó el volumen requerido de esta suspensión, tal que garantizara la cantidad de microportadores a evaluar (3 ml y 6 ml), se centrifugó a 500 G X 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron en el mismo volumen pero de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%.

Los fibroblastos se tomaron a partir de una caja de cultivo T-75 en confluencia cercana al 80%, se tripsinizaron (Anexo B) y se realizó conteo celular usando azul de tripano (Anexo C). Se re-suspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado al 10 % con suero fetal bovino, 1 % de antibiótico-antimicótico y 0.5 % de ácido tranexámico de tal manera que se garantizara una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml. Se transfirieron los microportadores (3 ml o 6 ml de microportadores, acorde a la condición a evaluar) y 500  $\mu$ l de la suspensión celular a un pozo de una caja de microtécnica de 6 pozos, recubierta con agarosa al 1% p/v, se dejó durante 12 horas en agitador orbital con una agitación de 50 r.p.m. a 37°C. Sobre la superficie de agarosa la adhesión celular es prácticamente despreciable, como está reportado en la literatura [130]. Transcurrido este tiempo, se tomaron los microportadores y se pasaron al reactor *spinner* (volumen de medio: 30 ml). Se adicionó el resto del medio de cultivo hasta completar 30 ml. Se tomó la muestra inicial de 1 ml de microportadores con células y se determinó la concentración celular de células libres (conteo directo en cámara de Neubauer, según Anexo C) y células adheridas (tripsinización y conteo en cámara de Neubauer, según Anexo B y Anexo C). Para evitar que la agitación despegara las células, el reactor se agitó a 50 r.p.m. durante 5 minutos cada hora y media. Se tomaron muestras cada 12 horas para determinar viabilidad y proliferación celular mediante tripsinización y conteo en Cámara de Neubauer (Anexo B y Anexo C), el cultivo se dejó hasta alcanzar la fase estacionaria. Como control se realizó la siembra de fibroblastos en caja de microtécnica. Se sembraron 10,000 fibroblastos/pozo y

se cultivaron durante 5 días usando medio DIMEM-F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino, 1% de antibiótico/antimicótico y 0.5% de tranexam®; el crecimiento celular se registró usando MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) según el protocolo presentado en el Anexo F.

### **3.1.10 Determinación de la citotoxicidad de los microportadores**

A los microportadores obtenidos se les realizó la determinación de la citotoxicidad modificando el protocolo establecido por Rajangam et al. [138] y Cheng et al. [135]. Se colocaron  $6 \times 10^3$  fibroblastos de la línea 3T3 por pozo en una caja de microtécnica de 24 pozos, con 500  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%, el cultivo se realizó durante 18 horas en incubadora a 37 °C. Se preparó una suspensión de  $1 \times 10^5$  microportadores/ml de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. A los pozos experimentales se les adicionaron  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  microportadores APF/pozo. Se cultivaron las células durante 48 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en incubadora; como blanco del ensayo, se mantuvieron 4 pozos a los cuales solamente se les adicionó el medio de cultivo. Al cabo de las 48 horas se retiró el medio de cultivo y los microportadores, se lavó con solución de Hank`s y se adicionaron 100  $\mu$ l de MTT (concentración 5 mg/ml) y 400  $\mu$ l de medio de cultivo. Se incubó por 3 horas. Al cabo de este tiempo, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de DMSO (dimetil-sulfóxido) para disolver el formazán generado a nivel intracelular. Se dejó solubilizar por 5 minutos y se leyó en espectrofotómetro Spectronic (Modelo: 20 Genesys™) a una longitud de onda de 570 nm. La citotoxicidad se expresa como porcentaje con respecto al control así, acorde a la ecuación 3-1:

$$\% \text{ con respecto al control} = 100 \times (\text{absorbancia de las muestras} / \text{absorbancia del control})$$

(3-1)

### **3.1.11 Determinación de la densidad de los microportadores**

La densidad de los microportadores se determinó mediante centrifugación en gradientes usando soluciones de sacarosa. Se prepararon soluciones de sacarosa de concentraciones: 10%, 20%, 30%, 40%, 50% y 60% p/v en agua destilada; a cada solución se le determinó la densidad usando picnómetro. En un tubo cónico de 50 ml se adicionaron 5 ml de cada una de las soluciones en orden descendente de concentración, teniendo cuidado de no mezclar las distintas capas. Se adicionó 1 ml de la solución de microportadores en solución de cloruro de calcio al 1%p/v en solución salina isotónica. Se centrifugó a 500 X g durante 10 minutos. Se determinó la posición en el tubo en la cual quedaron los microportadores y de esta manera se reportó la densidad.

### **3.1.12 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

Acorde a lo presentado en la literatura [165] para preservar la estructura de los microportadores, ellos fueron fijados usando glutaraldehído al 1% en solución de PBSA y luego sometidos a deshidratación en series de etanol al 50%, 70%, 90% y 100%; posteriormente, se realizó secado en un secador de punto crítico (Modelo: Samdri 795, Tousimins, Rockville, USA). Finalmente, las muestras fueron fijadas sobre un soporte metálico y recubiertas con una capa fina de oro en un metalizador Denton Vacuum (LLC desk IV, Moorestown, USA). Los análisis de las muestras se realizaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV (Peabody, USA) operado a 20 kV. Adicionalmente, se realizó la visualización de la superficie de los microportadores mediante microscopía de fuerza Atómica (AFM) usando el microscopio de fuerza atómica MFP3D-BIO (Asylum Research, Santa Barbara, USA) con una velocidad de barrido de 0.5 Hz.

### **3.1.13 Microscopía de fluorescencia y confocal**

Para la realización de microscopía de fluorescencia se usó el kit CellTrace CFSE (C34554, Invitrogen, Eugen, USA). Las recomendaciones del kit indican que se debe preparar una

solución madre del fluorocromo con una concentración de 5 mM en dimetil-sulfóxido, la cual se debe diluir con un buffer de fosfatos (PBSA) para garantizar una concentración final de 10  $\mu$ M. Una vez finalizado el crecimiento en biorreactor spinner se toma una muestra de 200  $\mu$ l de los microportadores cargados de células, se centrifugan a 500 X g por 2 minutos y se descarga el sobrenadante. Se adicionaron 100  $\mu$ l del fluorocromo, se incubó durante 15 minutos a 37 °C, se centrifugó a 500 X g durante 2 minutos y se realizaron 2 lavados con solución PBSA. Para conservar los microportadores y las células adheridas a ellos, se mantuvieron en solución de paraformaldehído al 1% p/v en PBSA. Luego fueron extendidos sobre una lámina portaobjetos para microscopía de fluorescencia y confocal. Teniendo en cuenta las especificaciones del fluorocromo (excitación 492 nm y emisión 517 nm) se realizó la microscopía confocal y de fluorescencia. La microscopía confocal se realizó en un microscopio Nikon C1 Plus con un láser diodo 17 MW con una longitud de onda de 408 nm; la microscopía de fluorescencia se realizó en un equipo Zeiss IC 35 (Alemania).

## **3.2 Resultados y análisis de resultados**

### **3.2.1 Caracterización del plasma sanguíneo y del crioprecipitado**

La Tabla 3-1 presenta la caracterización del plasma sanguíneo y del crioprecipitado realizada en laboratorio clínico. El contenido de fibrinógeno en plasma sanguíneo se encuentra en el intervalo de 2.5-3.0 mg/ml según lo reportado en la literatura [46], [166], el cual es un valor cercano al determinado experimentalmente en este trabajo (2.23 mg/ml); sin embargo, el contenido de fibrinógeno (4.67 mg/ml) en crioprecipitado es más bajo comparado con lo reportado en la literatura (alrededor de 150-300 mg de fibrinógeno por unidad de aproximadamente 20 ml de crioprecipitado, lo cual indicaría un valor de 7.5 mg/ml-15 mg/ml de fibrinógeno) [166]. El crioprecipitado es una mezcla proteica obtenida a partir de plasma fresco congelado al precipitarlo en condiciones controladas [167] y contiene factores como el factor VIII (20-30%), IX, factor Von Willebrand (40-70%), una pequeña cantidad de factor XIII y fibrinógeno [166].

Por presentar una mayor concentración de fibrinógeno el Crioprecipitado, fue empleado para la adsorción sobre microportadores y para la generación de geles. El contenido de proteína del Crioprecipitado determinado por el método de Bradford fue de  $10.90 \pm 0.16$  mg/ml.

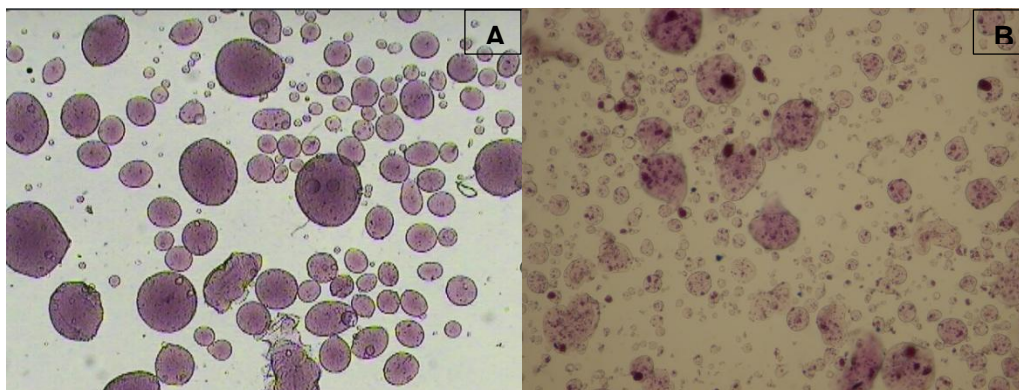
**Tabla 3-1:** Caracterización de la mezcla de Plasma Sanguíneo y Crioprecipitado de plasma sanguíneo.

Parámetro	Valores para el crioprecipitado	Valores para el plasma sanguíneo	Base del método	Kit
Fibrinógeno	466.90 mg/dL	223.50 mg/dL	Método Clauss	Fibrinogen
Tiempo trombina	27.90 s	21.40 s	Medición del tiempo de coagulación del plasma	Thrombin Time
Glucemia Basal	605.50 mg/dL	349.10 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	Glicemia enzymatic AA
Colesterol Total	215 mg/dL	123.80 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	Colestat enzymatic AA
Colesterol HDL	87.50 mg/dL	44.40 mg/dL	Desarrollo de color	HDL Cholesterol monofase AA plus
Colesterol LDL	122.20 mg/dL	74.50 mg/dL	Desarrollo de color	LDL cholesterol monofase AA
Triglicéridos	130 mg/dL	65.40 mg/dL	Determinación de rojo de quinonimina	TG Color GPO/PAP AA

### 3.2.2 Formación de micropartículas de alginato y plasma/alginato

Mediante el uso del montaje presentado en la Figura 3-1, se realizó la descarga de una solución de alginato de sodio al 1.6% p/v sobre una solución 0.27 M de cloruro de calcio. Se decidió realizar la exploración de condiciones para la obtención de microportadores, usando alginato de sodio al 1.6% p/v para evitar el gasto de plasma sanguíneo humano, teniendo en cuenta que las condiciones reológicas de la mezcla están gobernadas por alginato y no por plasma, como se mostró en el capítulo anterior. Con base en las mejores condiciones establecidas para alginato, se realizó la producción de microportadores usando la mezcla de plasma humano y alginato de sodio.

El proceso de gelificación ocurrió tan pronto la gota de alginato entra en contacto con la solución de cloruro de calcio. Las micropartículas formadas presentaron una amplia distribución de tamaños, como se aprecia en la Figura 3-3:A; adicionalmente, la morfología de partículas obtenidas es bastante irregular. La literatura consultada [165], [168] concluye que la esfericidad depende fundamentalmente de la viscosidad de alginato de sodio, la velocidad de descarga y la distancia entre la boquilla y la solución gelificante (cloruro de calcio). Para aumentar la viscosidad de la solución de alginato, se puede aumentar la concentración de la solución de alginato, sin embargo se prefirió dejar una concentración de alginato máxima de 1.6% p/v, para evitar emplear soluciones más viscosas que se vuelven difíciles de manejar con la bomba peristáltica empleada. La velocidad de descarga y la distancia entre la boquilla y la solución de calcio fueron consideradas dentro del diseño experimental de este trabajo. Adicionalmente se realizaron ensayos con la concentración de alginato de sodio al 0.8% p/v, pero no se logró la formación de micropartículas sino que por el contrario se obtuvieron formas bastante irregulares, por lo cual se decidió no evaluar esta concentración y se prefirió la concentración 1.6% p/v.



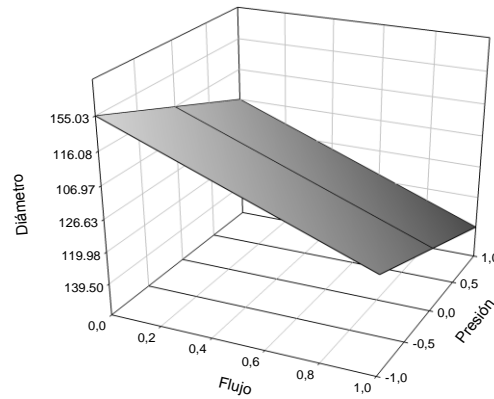
**Figura 3-3:** Tinción con Azul de Toluidina. A: micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1,6% p/v descargada sobre una solución de cloruro de calcio 0,27 M (aumento 4X). B: micropartículas obtenidas con plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1,6% p/v descargada sobre una solución de cloruro de calcio 0,27 M. (aumento 4X). Se aprecia una amplia distribución de tamaños debido a la técnica empleada para su fabricación.

Los resultados obtenidos para la descarga de alginato de sodio sobre cloruro de calcio son presentados en la Tabla 3-2 y de manera gráfica se presentan en la Figura 3-4 y en la Figura 3-5. Como se puede ver a partir de estos resultados, en la medida en que aumenta la presión del aire, y por ende el flujo del aire, el diámetro promedio de las partículas disminuye, lo que es explicado por el tipo de boquilla empleado, ya que al ser una boquilla co-axial el flujo de aire no permite que se formen gotas demasiado grandes, por lo cual se puede disminuir el tamaño de las partículas aumentando la presión del aire. Resultados similares han sido obtenidos por Mazzitelli et al. [104] quienes evaluaron el efecto de la distancia entre la jeringa y el baño gelificante (32 cm-44 cm), flujo de nitrógeno (3,8-5,8 l/min), flujo de la solución de alginato 0,38-0,52 ml/min y concentración de alginato 0,5-3,0 % p/v, concluyen que la coalescencia entre partículas se debe a una alta distancia entre la boquilla y la solución gelificante, la presencia de pequeñas partículas irregulares se debe a un valor alto del flujo de gas, la formación de partículas en forma de lágrima es debida a un bajo nivel de la bomba que alimenta la solución de alginato y la formación de micropartículas fusionadas con forma irregular debido a una baja concentración de alginato.

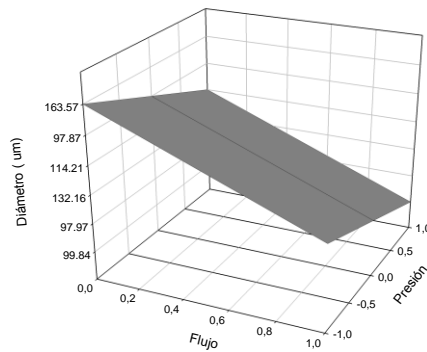
**Tabla 3-2:** Resultados del análisis de las micro-partículas obtenidas a partir de la descarga de solución de alginato de sodio al 1.6% p/v sobre solución de cloruro de calcio 0.27 M.

Presión del aire (psig)	Altura (cm)	Flujo de la solución de alginato de sodio (ml/min)	Número de micropartículas analizadas	Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{m}$ )	% Partículas entre 150 y 500 $\mu\text{m}$	Coefficiente de variación
5	20	125.6 $\pm$ 7.22	905	155.03	80.48	41.5	51.91
7	20	125.6 $\pm$ 7.22	610	116.08	78.18	19.9	67.35
9	20	125.6 $\pm$ 7.22	754	106.97	69.17	17.2	64.66
5	20	367.56 $\pm$ 1.13	2078	126.63	54.46	25.6	43.01
7	20	367.56 $\pm$ 1.13	1154	119.98	78.62	20.2	65.53
9	20	367.56 $\pm$ 1.13	964	139.5	95.95	29.3	68.78
5	30	125.6 $\pm$ 7.22	641	163.57	91.13	46.2	55.713
7	30	125.6 $\pm$ 7.22	2342	97.87	51.9	12.3	53.02
9	30	125.6 $\pm$ 7.22	506	114.21	61.04	24.2	53.44
5	30	367.56 $\pm$ 1.13	781	132.16	82.85	29.5	62.69
7	30	367.56 $\pm$ 1.13	1183	97.97	55.36	14.9	56.51
9	30	367.56 $\pm$ 1.13	919	99.84	52.6	14.6	52.68

El coeficiente de variación es un parámetro definido por Chan et al. [169], como la relación entre la desviación estándar y el diámetro promedio expresado de manera porcentual, el cual constituye una medida normalizada de la dispersión. Los valores del coeficiente de variación para microesferas de alginato de calcio preparadas por atomización se encuentran entre 25 y 52; sin embargo en el presente trabajo algunos de los ensayos presentan valores por encima del máximo reportado; esto se puede deber a un flujo turbulento de aire que ocasiona un proceso caótico y estocástico de producción de microportadores, tal como lo señala Chan et al. [169].



**Figura 3-4:** Diámetro promedio para las micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1.6% p/v a una altura de 20 cm a diferentes presiones: -1: 5 psig; 0: 7 psig; +1: 9 psig y flujos: 0:125,6 ml/min y +1: 367,56 ml/min. En la medida en que aumentan el flujo de la solución de alginato y la presión del aire disminuye el diámetro de las micropartículas.

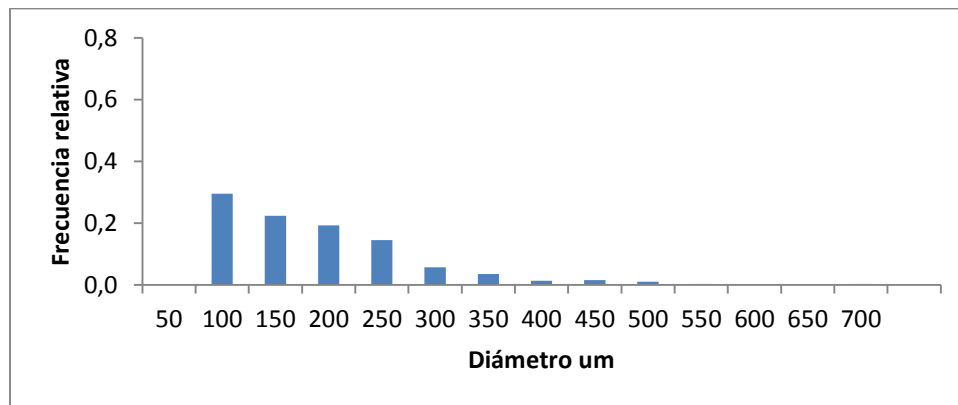


**Figura 3-5:** Diámetro promedio para las micropartículas obtenidas con alginato de sodio al 1.6% p/v a una altura de 30 cm a diferentes presiones: -1: 5 psig; 0: 7 psig; +1: 9 psig y flujos: 0:125,6 ml/min y +1: 367,56 ml/min. En la medida en que aumentan el flujo de la solución de alginato y la presión del aire disminuye el diámetro de las micropartículas.

Adicionalmente, se ha reportado que mediante la atomización de soluciones de alginato de sodio se pueden obtener diámetros de partícula en el intervalo 100-200  $\mu\text{m}$ , sin embargo la uniformidad y la morfología de las mismas no es alta [168]. Lo anterior concuerda con

Chan et al. [169] quienes reportan diámetros entre 50 y 2300  $\mu\text{m}$ , cuando se realiza la atomización de alginato de sodio sobre cloruro de calcio. Lo anterior permite concluir que los diámetros obtenidos se encuentran dentro de lo reportado.

Con base en los resultados obtenidos, al descargar una solución de alginato de sodio al 1.6% p/v en diferentes condiciones de flujo de alginato, presión de aire y altura, las condiciones para obtener un porcentaje más alto de partículas con diámetro entre 150 y 500  $\mu\text{m}$ , acorde a lo presentado en la Tabla 3-2, corresponden a 5 psig, flujo  $125.6 \pm 7.22$  ml/min y altura 30 cm, las cuales son seleccionadas para la generación de microportadores usando la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio. Las condiciones obtenidas corresponden a la menor presión del aire y al menor flujo de la solución de alginato evaluados, de donde se puede concluir que una baja presión (5 psig) y un bajo flujo de alginato de sodio (125.6 ml/h) favorecen la formación de partículas más grandes. Para estas condiciones seleccionadas, el histograma de distribución del diámetro de partícula se presenta en la Figura 3-6.

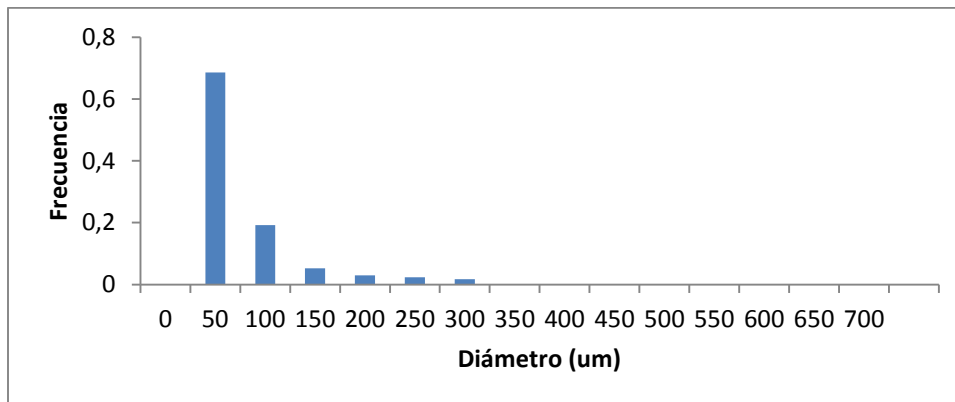


**Figura 3-6:** Histograma para las microesferas obtenidas con alginato de sodio al 1.6 % p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de alginato de sodio  $125.6 \pm 7.22$  ml/h, altura 30 cm. Diámetro promedio:  $163.57 \mu\text{m}$ , desviación estándar:  $91.13 \mu\text{m}$ , % partículas entre 150  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$  46.2%.

Para la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio se realizó la descarga en las condiciones seleccionadas para el alginato de sodio. La gelificación para la mezcla sobre la solución de cloruro de calcio también fue instantánea, lo cual garantiza que exista atrapamiento o encapsulación del plasma dentro del alginato. La imagen de las

micropartículas obtenidas a partir de la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio se presentan en la Figura 3-3:B. En esta Figura se puede observar la heterogeneidad de las partículas obtenidas en las cuales sobresale una amplia distribución de tamaño, la obtención de partículas no esféricas y en algunos casos la fusión de partículas y coalescencia entre ellas. El diámetro promedio obtenido es de  $52.47 \pm 46.04 \mu\text{m}$ ; el porcentaje de partículas cuyo diámetro está comprendido entre  $150 \mu\text{m}$  y  $500 \mu\text{m}$  corresponde a 12.20%. El diámetro promedio resulta menor cuando se descarga la mezcla de plasma sanguíneo y alginato de sodio, comparado al ensayo donde se descargó la solución de alginato de sodio, debido al taponamiento de la boquilla por la precipitación de las proteínas presentes en el plasma sanguíneo, que ocasionó una disminución en el diámetro efectivo de la boquilla, lo anterior conllevó a la formación de esferas de menor tamaño a las obtenidas en el ensayo donde se descargó la solución de alginato de sodio. Una alternativa para evitar el taponamiento de la boquilla es reducir el flujo de la solución de alginato, tal como lo reportan Santos et al. [168] quienes logran un coeficiente de variación menor al 10% al usar un flujo de 2 ml/h, sin embargo un flujo tan pequeño resulta impráctico a la hora de fabricar microportadores. Debido a lo anterior, el coeficiente de variación resulta bastante alto (87.74 %) y por tanto alejado de los valores reportados en la literatura [169].

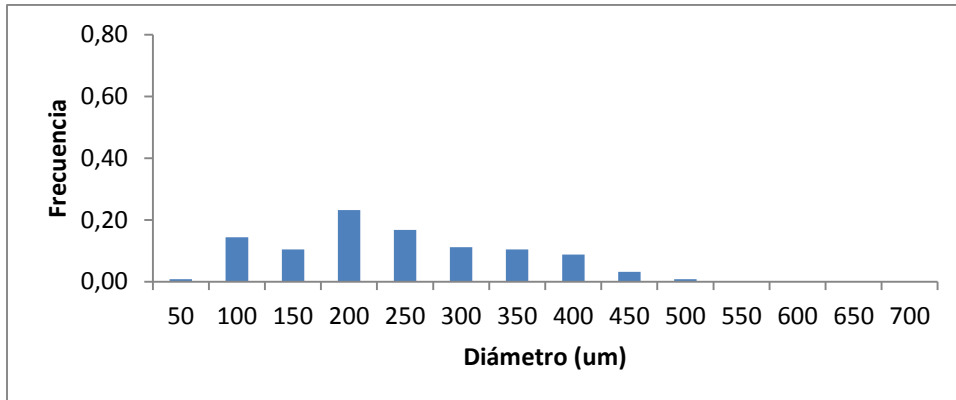
La Figura 3-7 presenta el histograma para las microesferas obtenidas luego de la descarga de la mezcla de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio. Al realizar la comparación con el el histograma obtenido cuando la descarga se realizó para la solución de alginato, se puede apreciar una disminución en la distribución del diámetro con un incremento en la frecuencia de  $50 \mu\text{m}$  que conlleva a la disminución del diámetro promedio. Aunque el ajuste de Ostwald de Waele presentado en la Tabla 2-3 muestra que no existe diferencia significativa en el comportamiento reológico del alginato de sodio y la mezcla de plasma sanguíneo/alginato de sodio al 1.6%, los resultados obtenidos durante la descarga sobre cloruro de calcio sí muestra efecto sobre los resultados obtenidos, por el taponamiento parcial de la boquilla. En cuanto a la morfología, la Figura 3-3 permite visualizar que no existe una diferencia significativa entre los ensayos en los cuales se empleó la solución de alginato de sodio y la mezcla de plasma/alginato.



**Figura 3-7:** Histograma para las microesferas obtenidas con la mezcla plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1.6% p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de la mezcla  $125.6 \pm 7.22$  ml/h, altura 30 cm. Diámetro promedio:  $52.47 \mu\text{m}$ , desviación estándar:  $46.4 \mu\text{m}$ , % partículas entre  $150 \mu\text{m}$  y  $500 \mu\text{m}$  12.20 %.

Debido a la alta dispersión obtenida, se hizo necesario realizar tamizado de las partículas para lograr que las microportadores estuvieran dentro de un rango de  $150 \mu\text{m}$  a  $500 \mu\text{m}$ , acorde a lo reportado en la literatura [130]. El histograma obtenido, luego del tamizado se presenta en la Figura 3-8, con lo cual se obtiene un diámetro promedio de  $219.04 \pm 99.84 \mu\text{m}$ .

Para lograr una mayor esfericidad, reducir el tamaño de las partículas y conseguir una mayor regularidad en las micro-partículas obtenidas, autores como Moghadam et al [170] emplean potenciales eléctricos de hasta 7 KV y alturas hasta de 3 metros. Sin embargo, lo anterior no es posible realizarlo por cuanto la generación de los microportadores se debe realizar mediante la descarga de la solución de alginato en condiciones estériles, las cuales se garantizan al realizar el procedimiento anterior en cabina de flujo laminar.

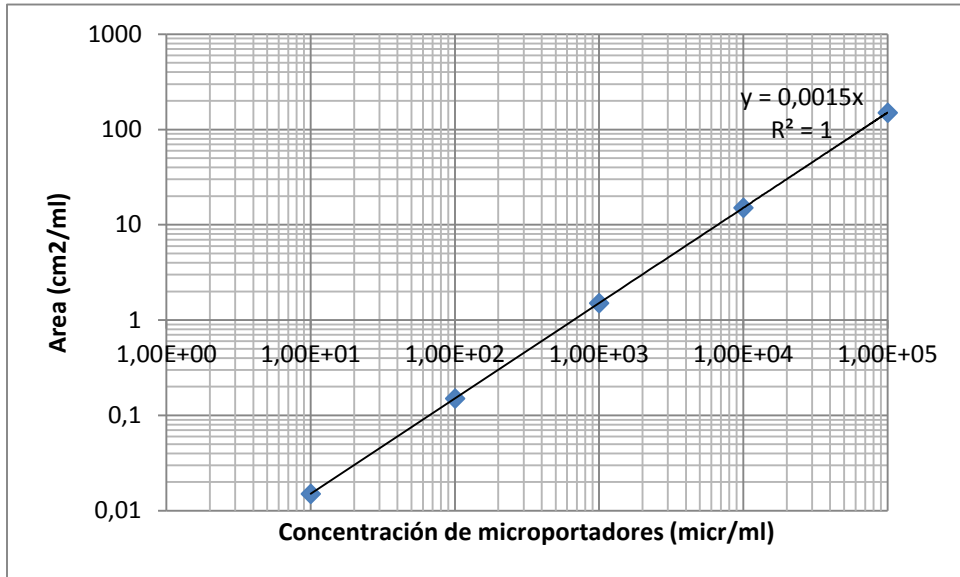


**Figura 3-8:** Histograma para las microesferas obtenidas con la mezcla plasma sanguíneo humano y alginato de sodio al 1.6% p/v con un flujo de aire: 5 psig, flujo de la mezcla  $125.6 \pm 7.22$  ml/h y altura 30 cm; tamizados usando tamices con tamaño de malla 150-500  $\mu\text{m}$ . Diámetro promedio: 219.04  $\mu\text{m}$ , desviación estándar: 99.84  $\mu\text{m}$ , % partículas entre 150  $\mu\text{m}$  y 500 $\mu\text{m}$ : 74.4%.

Uno de los factores que permiten medir la eficiencia de los microportadores es el área ofrecida por ellos. Con base en el diámetro promedio obtenido ( $219.04 \pm 99.84$   $\mu\text{m}$ ) se calculó el área ofrecida para diversas concentraciones de dichos microportadores como aparece en la Figura 3-9. El área máxima que se suele utilizar en trabajos con microportadores es de 90  $\text{cm}^2/\text{ml}$  [130]; para el presente trabajo investigativo, ésta área corresponde a una concentración de  $6 \times 10^4$  microportadores/ml, según la Figura 3-9. Esta concentración de microportadores, se tomó como el límite superior y como inferior se tomó una concentración de  $1 \times 10^4$  microportadores/ml que corresponde a un área de 15  $\text{cm}^2/\text{ml}$ . Los ensayos de adsorción de PLL y fibrinógeno se trabajaron en la concentración intermedia entre los límites definidos, es decir, 35,000 microportadores/ml.

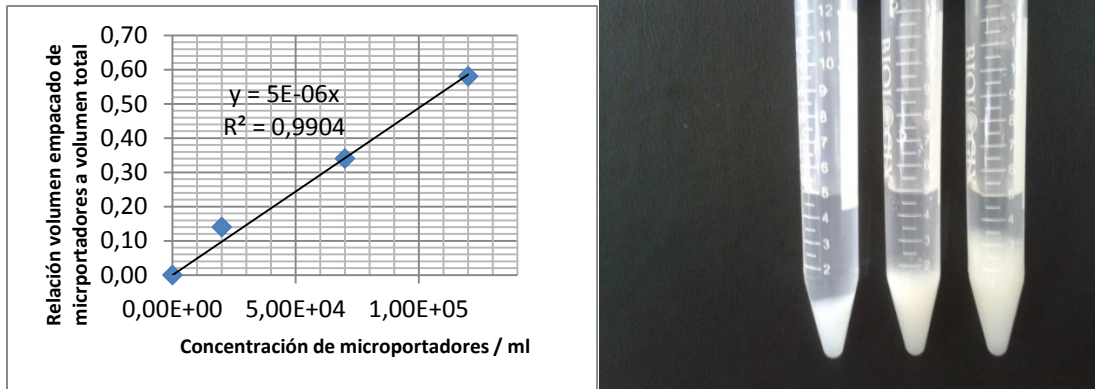
Con fines prácticos y para evitar la realización del conteo de microportadores cada vez que se inicie el cultivo celular, se optó por construir una curva de calibración que relacionara el volumen empacado por los microportadores con la concentración de ellos. La Figura 3-10 presenta los resultados obtenidos. Como se puede ver para una concentración de 10,000 microportadores/ml el volumen empacado es 4.9%, para 35,000 microportadores/ml es 17.15% y para 60,000 microportadores/ml es 29.4%. El parámetro anterior, resulta importante a la hora de realizar el cultivo celular ya que garantiza un volumen libre de

medio de cultivo para que las células presentes en el bio-reactor no se vean limitadas difusionalmente y puedan proliferar sin restricción alguna.



**Figura 3-9:** Área ofrecida por los microportadores Vs concentración de microportadores (micr/ml).

Con base en los resultados obtenidos se determinó que a partir de 100 ml de plasma se pueden obtener 25 ml de volumen empacado de microportadores, lo cual corresponde  $5 \times 10^6$  microportadores, acorde a la Figura 3-10-a. Con base en la mencionada figura, se puede determinar que un volumen de 1 ml de microportadores empacados equivale a  $2 \times 10^5$  microportadores, lo cual es una forma de realizar el conteo indirecto para el montaje en biorreactor.



**Figura 3-10:** a) Relación entre el volumen empacado por los microportadores y la concentración de los microportadores; b) Fotografía del volumen empacado para: izquierda (20,000 microportadores/ml), centro (70,000 microportadores/ml), derecha (120,000 microportadores/ml).

### 3.2.3 Adsorción de poli-L-lisina (PLL)

Se evaluó la adhesión celular sobre la superficie de los microportadores de plasma/alginato y no se halló adhesión celular sobre dicha superficie, debido a la ausencia en la superficie de proteínas con secuencias de reconocimiento sobre las cuales se pueda presentar la bio-adhesión, como se puede corroborar con la microscopía electrónica de barrido presentada en la

Figura 3-17. Adicionalmente, las células presentan una carga negativa y debido al valor de pH del medio de cultivo, el cual permanece entre 7.2-7.4, el cual es superior al punto isoeléctrico de albúmina (P.I. 4.85), fibrinógeno (P.I. 5.5) [151] y el pKa del alginato (pKa 3.4), la superficie de los microportadores también está cargada negativamente, lo cual induce a una repulsión electrostática.

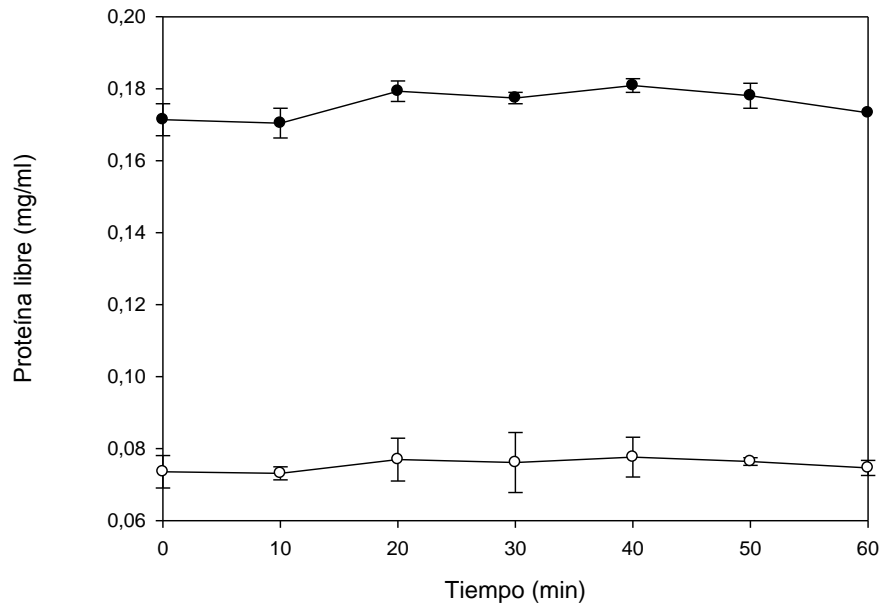
Debido a lo anterior, las micropartículas se cargaron con PLL, el cual es un polication que hace que las partículas se carguen positivamente [163]. Se ha reportado que alginato forma un fuerte complejo con policationes como quitosan, polipéptidos como PLL y polímeros sintéticos como poli-etilenimina, los cuales no se disuelven en presencia de quelantes de calcio y pueden ser usados para estabilizar el gel y reducir su porosidad [171].

De esta manera, el uso de PLL favorece la estabilidad del microportador y lo carga positivamente en su superficie. La Figura 3-11 presenta la cinética de adsorción de PLL sobre los microportadores de plasma/alginato. Como se puede apreciar en esta Figura, no existe cambio en la concentración de proteína entre el tiempo 0 minutos y 60 minutos; sin embargo, sí existió la adsorción sobre la superficie y fue instantánea, por lo cual una vez se realizó el seguimiento de la concentración a través del tiempo no se pudo determinar el cambio en la concentración. La solución de PLL, en dilución similar a la empleada durante el ensayo (1:2) arrojó una concentración de proteína de  $0.2486 \pm 0.0025$  mg/ml mientras que el promedio de la proteína libre para el pozo con microportadores fue de  $0.0479 \pm 0.0042$  mg/ml y para el pozo sin microportadores fue de  $0.1759 \pm 0.0027$  mg/ml, lo cual indica que sí existió adsorción.

La literatura consultada, recomienda un tiempo de adsorción de poli-L-lisina de unos pocos minutos, 3 a 5 minutos [124], sin embargo, Thu et al. [125] concluyen que ese tiempo varía dependiendo de la composición del alginato y del peso molecular de la polisina, siendo bastante rápido (menos de 5 minutos) cuando el alginato tiene un alto porcentaje de ácido manurónico (al menos 57%) y la PLL tiene un peso molecular cercano a 18 kDa, condiciones que son similares a las presentadas en este trabajo.

Como está reportado en la literatura, la adhesión se presenta fundamentalmente entre los grupos G del alginato y los grupos amino de PLL [118]. La adsorción de proteína sobre los microportadores corresponde a un valor de  $0.0038$  mg de proteína/cm<sup>2</sup>; el área se calculó a partir de los microportadores empleados en el ensayo tomando un diámetro promedio de  $219 \mu\text{m}$ . El valor obtenido en este trabajo es bastante menor al reportado por Thu et al. [125] quienes reportan un valor de  $0.216\text{-}0.240$  mg PLL/cm<sup>2</sup> para un alginato similar (ácido gulurónico:43% , ácido manurónico: 57%) y PLL con un peso molecular de 18 kDa, lo anterior se puede deber a que en el ensayo reportado en la literatura la adsorción se realiza sobre esferas de alginato, mientras que en el presente trabajo se emplea una mezcla de plasma sanguíneo y alginato, por lo cual la cantidad de PLL adsorbida puede disminuir por la dificultad que se presenta para difundirse dentro de las microesferas, además el diámetro de las esferas empleadas en el mencionado trabajo es de  $700 \mu\text{m}$ . Durante la estandarización de la adsorción de PLL y fibrinógeno, se manejó una concentración de 35,000 microportadores/ml, lo cual indica que el 82.85% del espacio es de la solución y por lo tanto no debieron existir limitaciones difusionales para que la PLL se adsorbiera en

la superficie del microportador. En la literatura se ha reportado para alginato con 62 % de ácido manurónico y PLL con un peso molecular de 19.2 KDa una adsorción de PLL en el intervalo 0.5-2.8 mg PLL/ml de micro-esferas [163]; realizando los cálculos respectivos para este trabajo se tiene un valor de 1.15 mg PLL/ml de micro-esferas, valor dentro del rango reportado.



**Figura 3-11:** Concentración de Proteína a través del tiempo en ensayos de adsorción de Poli-l-lisina sobre microportadores de plasma/alginato. ○: Pozos con microportadores, ●: Pozos sin microportadores. Ensayo realizado para 35,000 microportadores/ml. No existe cambio en la concentración de proteína libre a través del tiempo, sin embargo sí se presentó adsorción de proteína sobre los microportadores de  $0.2486 \pm 0.0025$  mg/ml.

La adsorción de PLL sobre microesferas de alginato, se explica actualmente como la formación de una membrana sobre el alginato de calcio, la cual consiste en un complejo de alginato-PLL, sobre la cual varios investigadores depositan otra capa de alginato para disminuir la respuesta inmune una vez implantada la microesfera [125]. Una vez se ha depositado la PLL sobre el microportador, la superficie presenta un alto contenido del grupo amonio ( $\text{NH}_3^+$ ) [110]. Para garantizar la adhesión celular sobre los microportadores, se adsorbió fibrinógeno presente en el crioprecipitado de plasma sobre la superficie cargada

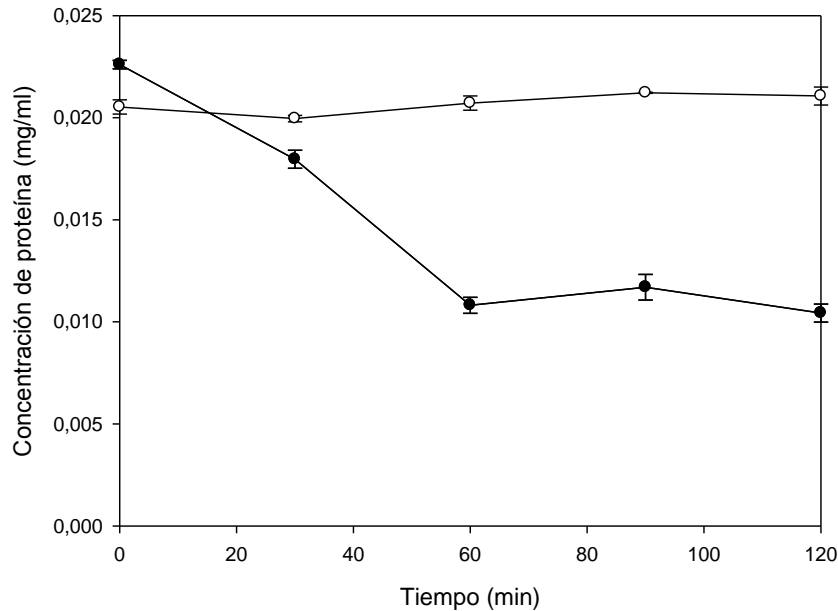
con PLL, de tal manera que las células se adhieran sobre el fibrinógeno, aprovechando la secuencia de reconocimiento que presenta esta molécula [72].

Adicionalmente, la formación de la membrana entre el alginato y PLL contribuye a la estabilidad de los microportadores, ya que cuando un gel de alginato de calcio es colocado en un medio que contiene fosfatos (como el DMEM, Hanks o DMEM-F12), citratos o magnesio, los geles sufren hinchamiento y liberan el agente activo contenido [142], ocasionando la desintegración de las microesferas. Lo anterior ocurre por remoción de los iones calcio debido a la acción de agentes quelantes como lactato, citrato y fosfato o por altas concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , que conlleva a una disminución en el entrecruzamiento y estabilidad de los geles [165], [171], [172].

### 3.2.4 Adsorción de fibrinógeno

Una vez adsorbida PLL sobre la superficie de los microportadores, se procedió a adsorber sobre la superficie de ellos fibrinógeno presente en el crio-precipitado de plasma. La carga superficial de los microportadores, una vez adsorbida la PLL, es positiva y la carga superficial del fibrinógeno es negativa (P.I. 5.5) [151], por lo cual se favorece la adsorción del fibrinógeno sobre PLL.

Las micropartículas cargadas positivamente con PLL fueron puestas en contacto con crioprecipitado de plasma sanguíneo, el cual es rico en fibrinógeno (concentración 4.67 mg/ml, ver Tabla 3-1). Al colocar los microportadores en contacto con la solución de crioprecipitado diluido (dilución: 1:1000), se presenta adsorción de las proteínas sobre ellos. Los resultados de la adsorción de fibrinógeno sobre los microportadores aparecen reportados en la Figura 3-12. Como se puede apreciar en esta Figura se presenta adsorción de proteína desde el tiempo inicial hasta 60 minutos de iniciado el ensayo, a partir de este tiempo no se presenta adsorción adicional de proteína. Es por lo anterior que se concluye que el tiempo requerido para la adsorción de fibrinógeno debe ser 1 hora.



**Figura 3-12:** Concentración de Proteína a través del tiempo en ensayos de adsorción de Fibrinógeno sobre microportadores de plasma/alginato recubiertos de Poli-l-lisina. ○: Pozos sin microportadores, ●: Pozos con microportadores.

La cantidad de proteína adsorbida es  $2.235 \times 10^{-4}$  mg de proteína/cm<sup>2</sup>. La cantidad de fibrinógeno adsorbido en diferentes superficies está en el intervalo de  $1.4$  a  $27 \times 10^{-4}$  mg de fibrinógeno/cm<sup>2</sup> según lo reportado por Bratek-Skicki [173], lo cual concuerda con lo reportado por Okubo [123] para la adsorción de fibrinógeno bovino sobre microesferas de poli-estireno, poli-etil-metacrilato y poli-metil-metacrilato la cual se halla en el intervalo de  $1.7 \times 10^{-4}$  mg/cm<sup>2</sup>. En contraste a lo anterior, Lima et al. [174] reportan valores entre 0.24 y 0.31 mg de fibrinógeno/cm<sup>2</sup> cuando es adsorbido sobre quitosán modificado, el cual es un valor bastante alto frente a lo reportado en la literatura mencionada.

Uno de los factores que más afectan la adsorción del fibrinógeno es su tamaño. El tamaño global del fibrinógeno es 45 nm X 9 nm X 6 nm con una densidad de proteína en monocapa entre 140 y 1052 ng/cm<sup>2</sup> [175], por lo cual se puede concluir que se adsorbió más de una monocapa sobre la superficie del microportador.

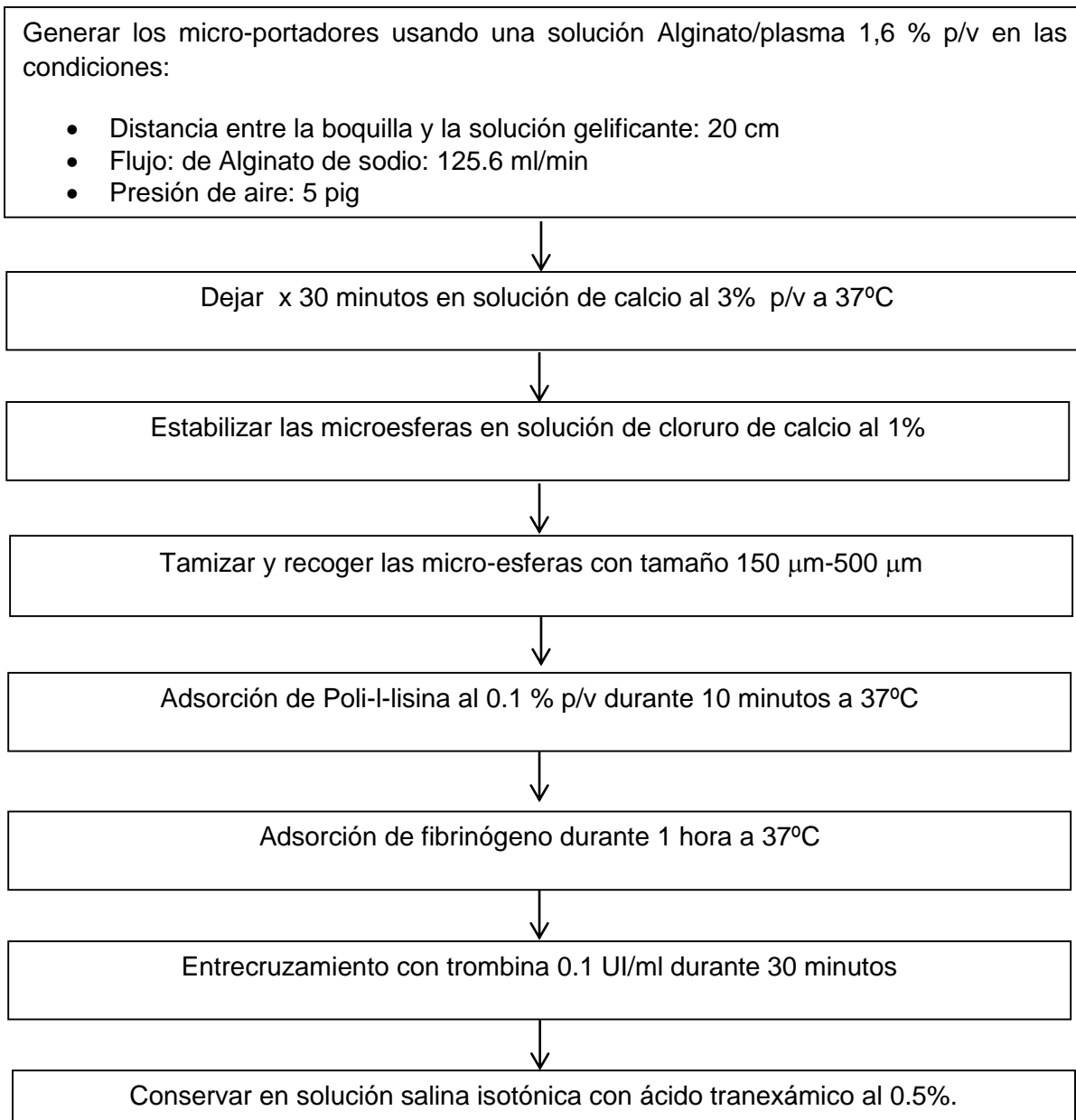
En el presente trabajo se utilizó crioprecipitado de plasma debido a que presenta un mayor contenido de fibrinógeno que el plasma sanguíneo (Ver Tabla 3-1) y un bajo contenido de albúmina, ya que al estar presentes las dos proteínas se suele presentar competencia por la adsorción sobre la superficie [175], lo cual haría que la superficie del microportador quedara tapizado con albúmina sobre la cual no hay adhesión de los fibroblastos.

Adicional a la precipitación del fibrinógeno, se realizó el entrecruzamiento con trombina para favorecer la adhesión de los fibroblastos. Yang et al. [72] demostraron que el entrecruzamiento con trombina favorece la adhesión celular, debido a que fibrinógeno posee 2 segmentos RGD (Arg-Gly-Asp) en las posiciones A $\alpha$  95-97 (RGD-1) y A $\alpha$  572-574 (RGD-2), siendo esta última posición innecesible para la adhesión celular en la configuración nativa del fibrinógeno. Luego de la polimerización con trombina el segmento RGD-2 queda disponible para la adhesión celular. La

Figura 3-17 c) y d) presenta la morfología de la superficie de los microportadores, en la cual se puede apreciar la red de fibrina generada alrededor de los microportadores. Adicionalmente, Biezenski et al. [176] reportan que la presencia de PLL acelera la conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de trombina, por lo cual la adsorción de PLL sobre la superficie de los microportadores favorece la activación de la cascada de coagulación.

Finalmente, las condiciones establecidas para la generación de microportadores se resumen en la Figura 3-13. La base del método de preparación de los microportadores, se puede resumir en la generación de un núcleo de plasma/alginato y la posterior adsorción de PLL y fibrinógeno entrecruzado con trombina. Este método de formación de microportadores, no se encuentra muy reportado en la literatura y cabe resaltar el reporte de Grohn et al [143] quienes adsorbieron colágeno sobre un núcleo de alginato de bario y Kwon y Peng [142] quienes adsorbieron gelatina sobre un núcleo de alginato de calcio y propilén glicol alginato (PGA). Este método presenta una ventaja considerable con respecto al método de la emulsión de aceite en agua, ya que no se requiere el uso de aceite y posterior lavado con solventes, para eliminar las trazas de aceite que puedan quedar. Además, la adsorción de proteínas termina siendo una metodología bastante sencilla de realizar y escalar en condiciones estériles.

Finalmente gracias al uso de fibrinógeno, el entrecruzamiento de la proteína se puede realizar con trombina y no con glutaraldehído como lo realizan varios reportes [139], [140], [141], [142] o con 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimide (EDC) [138], procedimiento que resulta desventajoso ya que requiere varios lavados o procesos como la liofilización para eliminar trazas de compuestos tóxicos para las células.

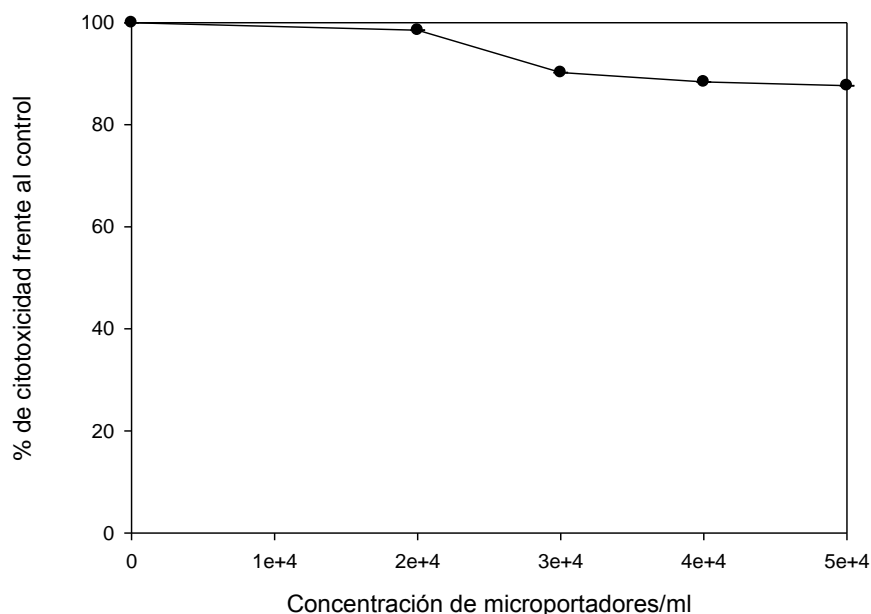


**Figura 3-13:** Diagrama de Flujo del proceso de generación de microportadores

El uso de una mezcla de alginato de calcio y plasma sanguíneo en el núcleo del microportador se realizó con miras a la implantación del microportador con células sobre la herida, sin necesidad de realizar la formación de un equivalente, tal como lo reporta Lafrance y Armstrong [140] quien aplicó fibroblastos adheridos a microportadores directamente en la herida, y logró una cicatrización más rápida y natural comparada con el uso de equivalentes laminares. Esta alternativa conllevaría a que el material del microportador sea biocompatible y biodegradable, y pueda integrarse al proceso normal de cicatrización de la herida. En esta vía tanto alginato como fibrina cumplirían con estos requerimientos.

### **3.2.5 Citotoxicidad de los microportadores**

Los resultados obtenidos para la determinación de la citotoxicidad se presentan en la Figura 3-14. Como se mostró en la ecuación 3-1, la citotoxicidad se reporta como el porcentaje de viabilidad de las células en presencia de los microportadores, comparado con el control en el cual no se han colocado microportadores; por tanto, un alto porcentaje con respecto al control indica una baja toxicidad del material evaluado. Como se puede apreciar en la mencionada figura, para una concentración superior a 20,000 microportadores/ml se empieza a presentar una disminución en el porcentaje de citotoxicidad frente al control. Esto puede deberse al incremento en la cantidad de microportadores colocados en cada uno de los pozos la fracción vacía se ve disminuida, lo que afecta la difusión de nutrientes y oxígeno en los ensayos con una concentración superior a 20,000 microportadores/ml. También es posible que el efecto se deba al aumento de concentración de sustancias citotóxicas presentes en los microportadores, pero a través del ensayo planteado es difícil poder concluir a cual efecto corresponda. Se reporta que la citotoxicidad de los microportadores, expresada como porcentaje de viabilidad con respecto al control, es del 98.5 % valor obtenido para la menor concentración de microportadores.



**Figura 3-14:** Porcentaje de Citotoxicidad de los microportadores frente al control para diversas concentraciones de microportadores/ml. La disminución en el porcentaje de citotoxicidad comparada con el control se puede deber al incremento en la cantidad de microportadores o al efecto citotóxico de las sustancias presentes en los microportadores. La citotoxicidad con respecto al ensayo control es del 98.5%.

La citotoxicidad obtenida es bastante baja, del mismo orden a la reportada por Rajangam et al. [138] quienes hallaron una citotoxicidad despreciable para microportadores de fibrinógeno bovino entrecruzados con 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimide (EDC). La citotoxicidad en los microportadores puede provenir de 2 fuentes principalmente: alginato y PLL. Previamente, dentro del Grupo de Investigación, Ramos [177] basado en la Norma ISO 10993-5 evaluó la citotoxicidad del extracto de geles de alginato sobre el crecimiento de fibroblastos de la línea L929 y no encontró efecto citotóxico. PLL ha demostrado un efecto citotóxico sobre las células en concentraciones superiores a 0.032 mg/ml de PLL [178], por lo cual se hace necesario el lavado de los microportadores antes de la aplicación final para evitar trazas de esta sustancia.

### 3.2.6 Adhesión celular

Los ensayos de adhesión celular se realizaron para una concentración inicial de microportadores de 15,000 microportadores/ml (área superficial 22.5 cm<sup>2</sup>/ml, volumen empacado: 7.5 %). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3-15. Para los datos obtenidos se realizó un ajuste de primer orden, como esta reportado en la literatura consultada [164], [179]:

$$\frac{dN}{dt} = -\kappa N \quad (3.2)$$

donde  $k$  es la constante de tiempo y  $N$  es la relación entre el número de células no adheridas a los microportadores y el número de células colocadas inicialmente.

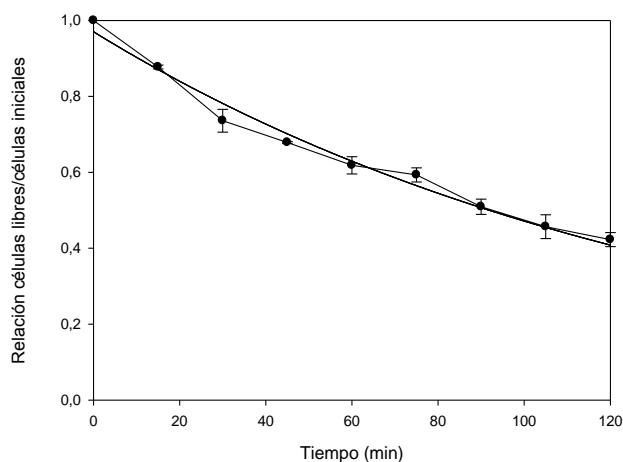
La integración de esta ecuación, se realiza tomando para el tiempo  $t=0$  un valor de  $N= N_0$  (valor que tiende a 1), lo cual conduce a:

$$N = N_0 \exp(-\kappa t) \quad (3.3)$$

Con los datos experimentales, se realizó el ajuste de los datos experimentales a este modelo dentro de un intervalo de confianza del 95%, dando como resultado:

$$N = 0.9583 \exp(-0.007t) \quad (3.4)$$

Con un coeficiente de correlación  $r^2=0.9868$ ,  $k: \text{min}^{-1}$ .



**Figura 3-15:** Cinética de adhesión celular para fibroblastos 3T3 sobre microportadores. El ajuste de los datos experimentales correspondió a una cinética de primer orden, con una constante de tiempo de  $-0.007 \text{ min}^{-1}$  y un coeficiente de correlación  $r^2: 0.9868$ .

La constante de tiempo  $k$  es un indicativo de la velocidad con la cual ocurre la adhesión celular a los microportadores. El proceso de adhesión de las células a los microportadores se puede explicar en 2 etapas: el primero es el contacto entre células y microportador, que se inicia con la activación de las integrinas involucradas haciendo contacto con sus ligandos compatibles, una secuencia de tripéptidos RGD (Arg-Gly-Asp) presentes en la fibrina adsorbida a la superficie de los microportadores, la cual es una etapa reversible; la segunda etapa es la adhesión celular, la cual puede ser reversible o irreversible [164], [180], según la célula pueda permanecer adherida o se desprenda. Durante la primera etapa se produce un cambio conformacional en el dominio extracelular de la molécula de adhesión, lo que afecta las funciones de las células y conlleva a cambios intracelulares en el citoesqueleto, lo que se evidencia con el cambio morfológico de las células una vez se encuentran adheridas [181], [182].

Todo contacto entre célula y microportador no necesariamente conlleva la adhesión de la célula. La adhesión implica que la célula pueda unirse a grupos químicos específicos sobre la superficie del microportador, usando las integrinas presentes en la membrana [128] y permaneciendo un tiempo suficiente, de tal manera que la membrana celular se adhiera a la superficie del microportador.

Adicionalmente, para que se lleve a cabo una adecuada adhesión celular la distancia entre las superficies durante la asociación de los receptores de membrana debe ser dos veces el tamaño de los dominios extracelulares de las integrinas, es decir, entre 10 y 20 nm [183]. De ahí que, por lo general, se debe tener una concentración celular y de microportadores que garantice el contacto entre ellos, y es por ello que la concentración inicial de células y microportadores es fundamental para la adhesión celular; por otro lado, una baja agitación genera un menor esfuerzo cortante en la superficie de los microportadores que conlleve a la separación del microportador y la célula. Finalmente, las células adheridas avanzan en su ciclo celular, proliferando hasta abarcar toda la superficie disponible [128], [164].

Sun et al. [164] reportan que la adhesión de la línea celular Vero (células de riñón de mono) sobre microportadores de Citodex recubiertos con colágeno es de primer orden, con valores de  $k$  entre 0.0169 y 0.0217  $\text{min}^{-1}$ . El valor obtenido en el presente trabajo es de 0.007  $\text{min}^{-1}$  el cual es menor al reportado. Dicho parámetro depende de las condiciones en las cuales se realiza el ensayo (agitación, relación número de células a microportadores, fracción vacía, entre otros), la línea celular empelada, el material y la morfología de la superficie del microportador.

A partir del ajuste realizado, se calculó el tiempo necesario para una adhesión del 99% de las células colocadas inicialmente el cual dio un valor de 10.86 h. Este tiempo resulta menor al reportado por Gorodetsky et al. [140], quienes encontraron una adhesión celular superior al 95% para fibroblastos de la línea 3T3 sobre microportadores de fibrina, en un tiempo de 4 días. Phillips et al. [179] reportan un tiempo medio de adhesión (tiempo necesario para la adhesión del 50% de la población celular colocada inicialmente) de 75 min para la adhesión de fibroblastos humanos a microportadores de poliestireno cubiertos con trimetil amonio, menor a los 236 min de este trabajo.

El conteo de células no viables a través del tiempo, resultó negativo debido a que la agitación fue baja y se realizó en un agitador orbital, sin la presencia de agitadores magnéticos que pueden ocasionar un mayor esfuerzo cortante, y sin que exista golpe a los microportadores y células. Adicionalmente, el ensayo tan sólo duró 2 horas, el cual es un tiempo bastante corto para causar un daño celular considerable.

### 3.2.7 Densidad de los microportadores

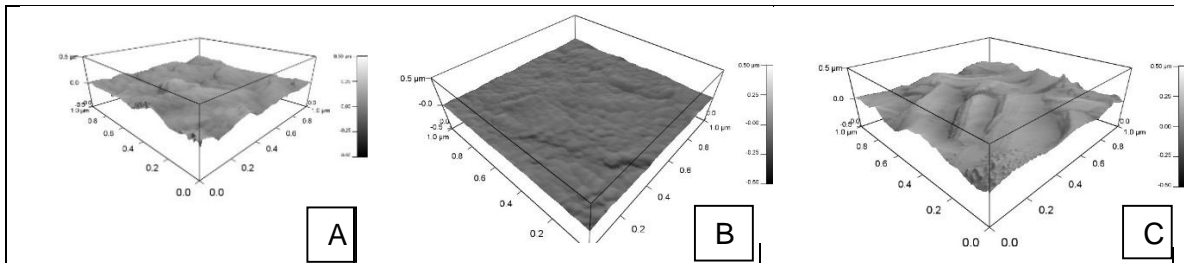
La densidad de los microportadores arrojó un valor de  $1.25 \pm 0.03$  g/ml. Este valor resulta mayor que el reportado para microportadores, cuyo intervalo se encuentra entre 1.02 y 1.10 g/ml [131]. En general se busca que la densidad sea cercana a la del medio de cultivo, para evitar un incremento en la potencia de agitación necesaria para mantener en suspensión los microportadores. Sin embargo, los biorreactores para el cultivo de células en Ingeniería Tisular no suelen tener tamaños superiores a 250 ml, por lo cual el consumo energético asociado con la agitación no es un factor a tener en cuenta. La densidad obtenida resulta ventajosa, por cuanto el cambio de medio se puede realizar fácilmente retirando la agitación y esperando que sedimenten los microportadores.

### 3.2.8 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de fuerza atómica (AFM)

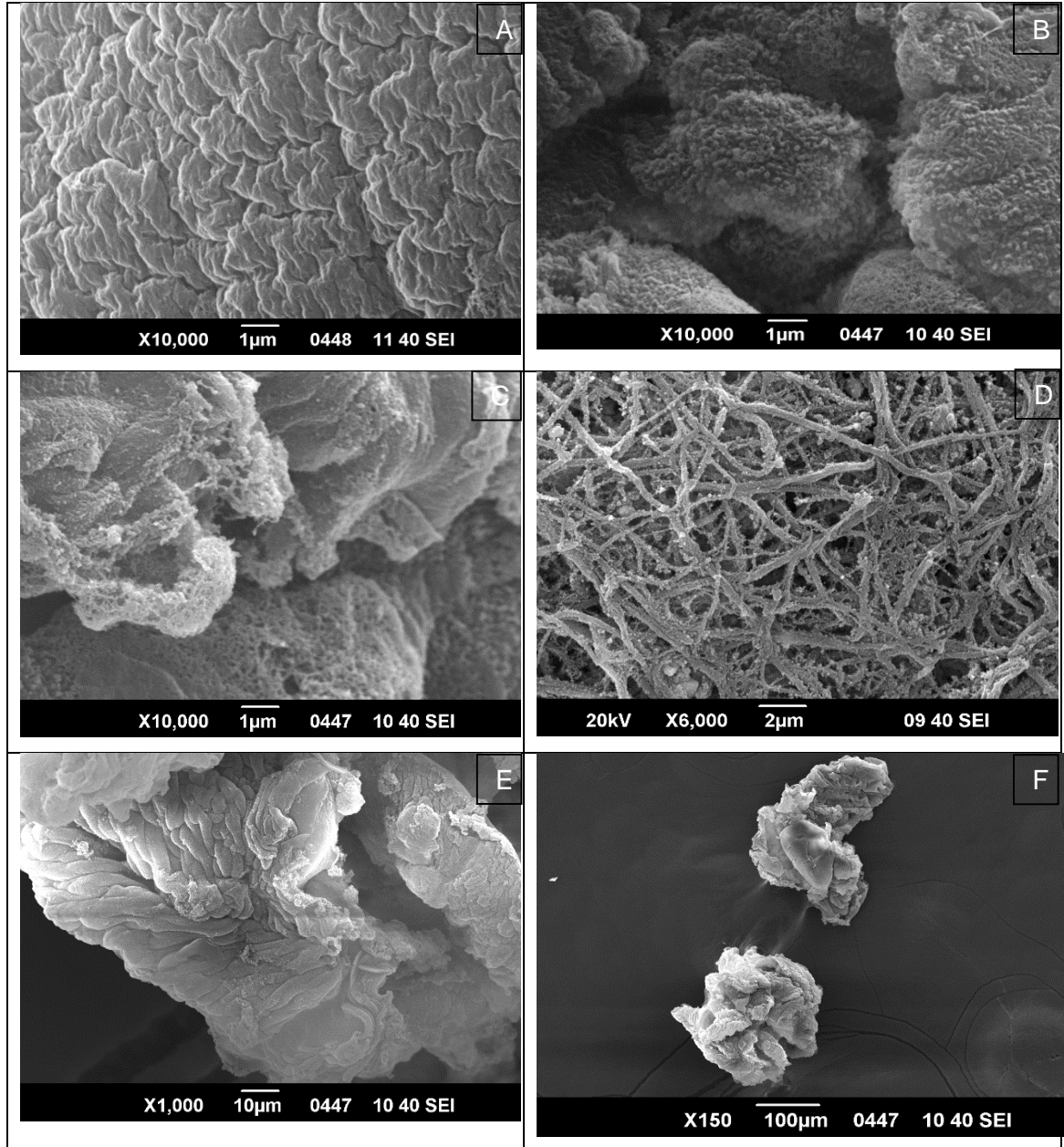
Mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM), se pudieron determinar los cambios superficiales que se presentaron en los microportadores desde su fabricación, pasando por la adsorción de PLL, fibrinógeno y el entrecruzamiento con trombina. La Figura 3-17 muestra la superficie de los microportadores durante su preparación, como se puede ver la superficie de los microportadores no es porosa y prevalece el alginato de calcio, por lo cual se puede concluir que las proteínas del plasma sanguíneo fueron encapsuladas dentro de las micro-partículas. Lo anterior explica por qué las células no se adhieren a la superficie de los microportadores, ya que alginato carece de proteínas de reconocimiento en su superficie [35], [117], por lo cual se hizo necesario modificar la superficie de los mismos. Una vez se ha adsorbida la PLL (Figura 3-17-b), la superficie muestra la presencia de la proteína como pequeños agregados adsorbidos sobre el alginato. La adsorción de la PLL se facilita porque esta proteína es un polianión, en tanto que la superficie de alginato está cargada negativamente [163], [184].

Sobre la superficie de los microportadores cargados con PLL se adsorbe fibrinógeno, y debido a la trombina se presenta el entrecruzamiento y la formación de redes de fibrina,

las cuales se pueden apreciar en el detalle de la Figura 3-17-d. Adicionalmente, se observó la superficie de los microportadores usando microscopía de fuerza atómica (AFM), tal como se observa en la Figura 3-16. Como se puede apreciar en esta figura existe un cambio superficial debido a la adsorción de las proteínas, la rugosidad es mayor para el microportador cargado con fibrinógeno y es menor para el microportador cargado con PLL.



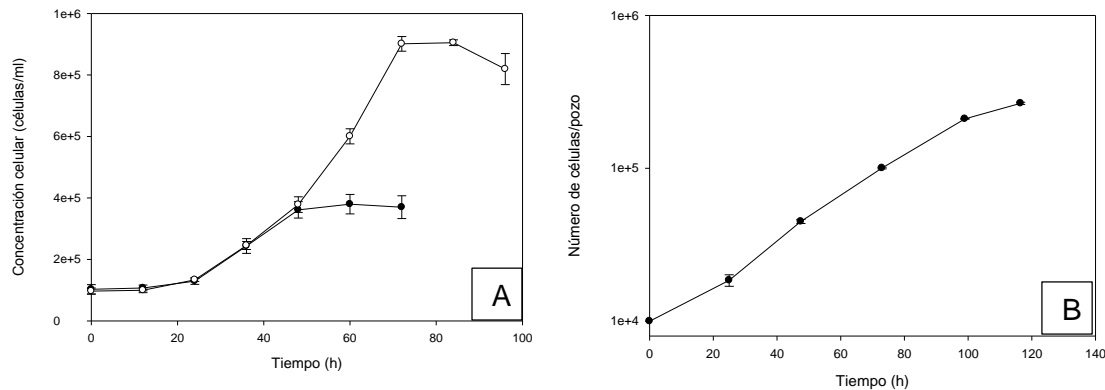
**Figura 3-16:** Microscopía de fuerza Atómica (AFM) de la superficie de los microportadores: a) estabilizados en solución salina, b) cargada con PLL, c) cargada con fibrinógeno.



**Figura 3-17:** Microscopía electrónica de barrido (SEM) para microportadores: a) Estabilizados en solución salina, b) Con PLL adsorbida en la superficie, c) con fibrinógeno entrecruzado con trombina adsorbido en la superficie, d) fibrina en la superficie de los microportadores, e) Micoportador a menor resolución, f) Microportadores a menor resolución.

### 3.2.9 Cinética de crecimiento en reactor *spinner*

La Figura 3-18 presenta la cinética de crecimiento de los fibroblastos murinos de la línea 3T3. En la parte izquierda de la figura aparece la curva de crecimiento en reactor *spinner* para las dos concentraciones de microportadores iniciales empleadas, 10,000 microportadores/ml y 20,000 microportadores/ml, y en la parte derecha la curva de crecimiento de la misma línea celular en caja de microtécnica. Como se puede apreciar en el biorreactor se presentó una fase de latencia durante las primeras 24 horas de cultivo. Esta etapa es una adaptación que deben realizar las células para ser cultivadas en suspensión en una superficie curva, una vez las células se han adaptado empieza la fase de crecimiento exponencial la cual se mantiene durante 1 día para la concentración de 10,000 microportadores/ml y 2 días para la concentración de 20,000 microportadores/ml, hasta finalmente alcanzar la fase estacionaria.



**Figura 3-18:** Cinética de crecimiento de Fibroblastos 3T3.

A: en reactor Spinner: ○: Concentración de 10,000 microportadores/ml, ●: Concentración de 20,000 microportadores/ml; B: en caja de microtécnica.

El crecimiento en la caja de microtécnica no presentó una fase de latencia, ya que las células simplemente se traspasaron de un frasco de cultivo a una caja, y por ende las células no requirieron mayor adaptación. Adicionalmente, para el tiempo de cultivo (5 días) no alcanzaron la fase estacionaria. El tiempo de duplicación para el crecimiento en reactor spinner fue de  $16.23 \pm 0.71$  h (concentración de 10,000 microportadores/ml) y  $17.65 \pm 0.13$  h (concentración de 20,000 microportadores/ml), mientras que en la caja de cultivo fue de  $23.40 \pm 0.19$  h. Lo anterior representa un avance para el cultivo de los fibroblastos 3T3 ya

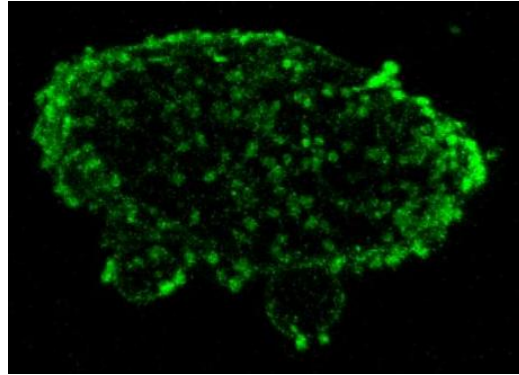
que al mantener el cultivo agitado se presenta una mayor disponibilidad de los nutrientes, entre ellos el oxígeno, lo cual conlleva a la disminución del tiempo de duplicación. Lo anterior está en concordancia con lo reportado por Oh et al [148] quienes cultivaron células madres embrionicas humanas (hESC) sobre microportadores de celulosa microgranular recubiertos de matrigel, y encontraron disminución en el tiempo de duplicación al pasar de 33 horas (cultivo en cajas de cultivo) a 21 horas (cultivo en biorreactor).

Sumado a lo anterior, el cambio de medio realizado cada 24 horas reemplaza nutrientes esenciales que han sido agotados por la célula, remueve sub-productos que inhiben el crecimiento celular y contribuyen con el control del pH [185]. Adicionalmente es posible realizar el cultivo celular empleando una mayor cantidad de microportadores, con lo cual se incrementaría el área disponible para el cultivo celular y obtener una mayor cantidad de biomasa al final. La agitación se mantuvo intermitente, ya que al mantenerla de manera continua se presentaba el desprendimiento de las células de la superficie del microportador, debido al encuentro entre el microportador y el agitador que resultaba demasiado agresivo, a pesar de emplear la menor agitación de la placa agitadora (50 r.p.m.), por lo cual se prefirió emplear un temporizador que ofreciera agitación al sistema durante 5 minutos cada 1.5 horas.

En cuanto a la densidad celular, la línea 3T3 cuando presenta 100% de confluencia alcanza una densidad de 50,000 células/cm<sup>2</sup>, en el biorreactor se alcanzó una densidad de 24,700 células/cm<sup>2</sup> (para una concentración de 10,000 microportadores/ml) y de 30,200 células/cm<sup>2</sup> (para una concentración de 20,000 microportadores/ml) ya que las células no alcanzaron a ocupar toda la superficie disponible quedando algunas fracciones vacías como se puede ver en la Figura 3-19 y la Figura 3-20. Es mayor la densidad cuando se emplea una mayor cantidad de microportadores, ya que se adherirán menos células por microportador lo que conducirá a que tengan una mayor área disponible para proliferar.

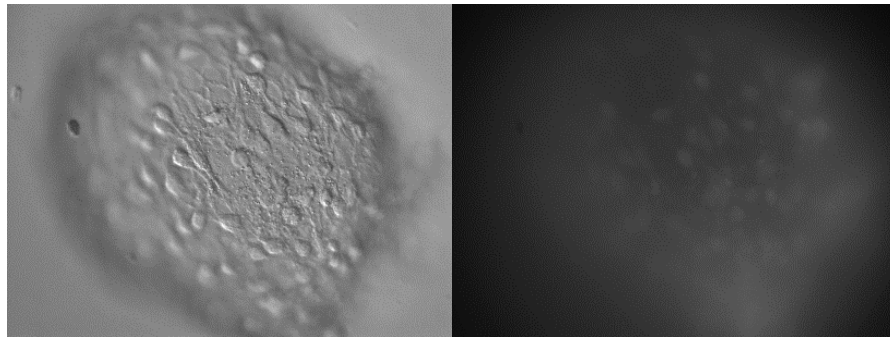
Finalmente, en la Figura 3-19 y en la Figura 3-20 se puede ver que las células se pegan a la superficie del microportador y no se presenta migración o proliferación celular dentro del mismo, debido a que los microportadores obtenidos no son porosos como se comprobó por microscopía electrónica de barrido, y por ende no hay espacio por donde puedan

migrar las células hacia el interior. Además esta microscopía muestra que las células permanecen viables sobre la superficie del microportador, ya que el kit Cell Trace empleado solamente revela fluorescencia de las células viables.



**Figura 3-19:** Microscopía Confocal de fibroblastos de la línea 3T3 sobre microportadores en el día 3 de cultivo en reactor Spinner.

Para evitar la degradación descontrolada de fibrina, se suelen emplear agentes anti-fibrinolíticos como el ácido tranexámico que retardan la degradación de fibrina [57], [58], [59], [60], [62]. El ácido tranexámico se empleó como suplemento del medio de cultivo, similar a lo reportado por Demol et al [60] y no dentro del gel como lo reporta Meana et al. [89], Arvelo et al. [58].



**Figura 3-20:** Microscopía de Fluorescencia de fibroblastos de la línea 3T3 sobre microportadores en el día 3 de cultivo en reactor Spinner.

La morfología de los fibroblastos adheridos a los microportadores (Figura 3-20) es la característica para el crecimiento sobre superficie plana que se encuentran adheridas, lo cual permite concluir que se presentó adhesión sobre la superficie del microportador,

gracias a la interacción de las integrinas de los fibroblastos y la secuencia RGD de la fibrina.

### 3.3 Conclusión

Para la mezcla de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano al 1.6% p/v de alginato, se establecieron las condiciones que conducen a la generación de microesferas. Las condiciones para obtener el mayor porcentaje de microesferas con un tamaño entre 150  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$  fueron: presión del aire 5 psig, flujo de la solución de alginato de sodio 125.6 ml/min y altura de la boquilla a la solución de cloruro de calcio 30 cm. Adicionalmente, se estableció que las micropartículas obtenidas no presentan en su superficie proteínas de reconocimiento para la adhesión celular, por lo cual se hizo necesario recubrirlas con PLL y fibrinógeno. Las condiciones para cargar los microportadores fueron solución de PLL en concentración 0.1 % p/v durante 10 minutos a 37° C, y la adsorción de fibrinógeno a partir de crioprecipitado en dilución 1:1000 durante 1 hora. Finalmente, el fibrinógeno adsorbido en la superficie del microportador se entrecruza usando trombina en concentración de 0.1U/ml durante 15 minutos. La densidad de los microportadores obtenidos fue de 1.25 g/ml y la citotoxicidad frente al control fue del 98.53%. Sobre estos microportadores se realizó la cinética de adhesión celular de fibroblastos murinos de la línea 3T3, la cual se ajustó una cinética de primer orden con una constante de tiempo de 0.007 min<sup>-1</sup>. Mediante el cultivo en reactor spinner se logró reducir el tiempo de duplicación de 23 h a 16.23 h y 17.65 h, empleando concentraciones de 10,000 microportadores/ml y 20,000 microportadores/ml, respectivamente.

## **4. Generación de un equivalente dérmico usando fibroblastos cultivados sobre microportadores de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio**

La generación de equivalentes dérmicos ha implicado el uso de diversos materiales en los cuales se suelen atrapar los fibroblastos, y con las condiciones de cultivo apropiadas se permite que proliferen remodelando la matriz extracelular característica de la dermis. Para poder evaluar el atrapamiento de células en geles de alginato con crioprecipitado y plasma sanguíneo, se purificó el alginato de sodio para disminuir el contenido de endotoxinas y polifenoles. La encapsulación de los fibroblastos se realizó en las condiciones establecidas en el segundo capítulo de este trabajo, con seguimiento a la viabilidad y proliferación celular a través del tiempo. Debido a que los resultados obtenidos mostraron que el gel no favorece la viabilidad ni la proliferación celular, se decidió realizar la encapsulación en geles de crioprecipitado. A los geles de Crioprecipitado se les realizó la caracterización reológica, similar a la efectuada para los geles de plasma/alginato presentada en el capítulo segundo. La fuente de obtención de fibroblastos humanos fueron biopsias de prepucio de niños, los cuales fueron multiplicados sobre microportadores APF en reactor *spinner*, siguiendo lo estandarizado en capítulo 3 de este trabajo.

De esta manera se integra lo presentado en los capítulos precedentes, con miras a establecer un proceso de proliferación celular usando reactores *spinner*, y la obtención de un equivalente dérmico.

## **4.1 Materiales y métodos**

### **4.1.1 Reactivos**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos: ácido algínico (Ref: A2033), suero fetal bovino (Ref: F-2442), medio DMEM-F12 (Ref:D-2906) y solución balanceada de Hank's (Ref: H-2387) los cuales fueron comprados a Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, USA); cloruro de calcio (Ref: 433381) fue comprado a Carlo Erba (StradaRivoltana, Italia); poli-L-lisina hidrobromuro en una concentración 0,1% p/v en agua (PM: 21,000 Da) fue comprada a Alamanda Polymers (Huntsville, USA); antibiótico/antimicótico (anti-anti, Ref: 15240 ) fue usado el comercializado por Gibco (Invitrogen); tranexam® (ácido tranexámico 100 mg/ml) se utilizó el donado por Laboratorios Ropsohn.

### **4.1.2 Plasma sanguíneo y crioprecipitado**

Se empleó la mezcla de plasma sanguíneo humano y de Crioprecipitado realizada en el numeral 3.1.1; la caracterización del plasma sanguíneo y del crioprecipitado aparecen en la Tabla 3-1.

### **4.1.3 Aislamiento de fibroblastos**

La obtención de los fibroblastos humanos se realizó a partir de muestras de piel de niños sometidos a circuncisión, previa firma del consentimiento informado, de acuerdo con el Comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia. La muestra se trasladó desde el Centro Médico hasta el Laboratorio en medio DMEM-F12 con antibióticos y antimicóticos al 3% (v/v). La muestra se sometió a disgregación mecánica y enzimática, para obtener células individuales empleando colagenasa (200 Unidades/ml) en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%, según se

presenta en el Anexo A. Una vez se alcanzaron células individuales, se centrifugó a 500 X g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Se realizó el conteo celular usando azul de tripano (ver Anexo C) y se sembraron  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en frascos T-25 y T-75.

#### **4.1.4 Pasaje celular**

Una vez las células aisladas alcanzaron una confluencia cercana al 80% en los frascos de cultivo, se realizó la tripsinización (Anexo B) y el conteo celular usando azul de tripano (Anexo C). Una vez determinada la concentración de células viables se realizó el pasaje de dichas células a un frasco con mayor área disponible, sembrando  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los pasajes celulares se mantuvieron hasta el pasaje 20.

#### **4.1.5 Criopreservación de las células obtenidas**

Las células de un frasco T-75 en confluencia cercana al 80%, se tripsinizaron según el Anexo B y se re-suspendieron en un volumen que garantice una concentración mínima de  $1 \times 10^6$  células/ml, en medio DMEM F-12 suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) tal como se muestra en Anexo D. Las células fueron depositadas en crioviales estériles de 1 ml de capacidad, congeladas a -70 °C durante 24 horas usando el dispositivo para congelación de células y transferidas al tanque de nitrógeno líquido.

#### **4.1.6 Purificación del alginato de sodio**

El método empleado para la purificación del alginato es el reportado por Tam et al. [186] y Langlois et al. [187]: se tomó ácido algínico y se trató con cloroformo en una relación 2.25% (p/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Después del tratamiento, el alginato fue filtrado usando papel filtro Whatman No. 4. El procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente el alginato fue disuelto en agua destilada en una concentración del 1.5% (p/v), se adicionó una cantidad equivalente de carbón activado acidificado y se mantuvo en agitación por 4 horas; dicho carbón activado se obtuvo a partir de carbón activado neutro

tratado con ácido nítrico 1N por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó el carbón activado con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. La solución fue pre-filtrada usando membranas de 8-10  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y luego se filtraron a través de membranas con tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ . En seguida, se repitió el procedimiento usando carbón activado neutro en la misma proporción que el carbón acidificado y se filtró empleando membranas del mismo tamaño de poro. Se formaron esferas al permitir la gelificación del alginato mediante la precipitación por goteo en una solución de cloruro de bario (50 mM), y se dejaron gelificar durante 1 hora. Las esferas fueron lavadas con agua destilada. Después de esto fueron tratadas 3 veces con ácido acético 1 M durante 12-14 horas; entre cada cambio de ácido se lavaron con agua destilada. Seguidamente, las esferas fueron tratadas dos veces con solución de citrato de sodio 0.5 M (pH 8) por 8 horas. Las esferas fueron lavadas con agua estéril después de cada cambio de medio. Las esferas fueron tratadas dos veces con etanol al 50% en agua que contiene acetona al 5% (16 horas) y etanol al 70% en agua con acetona al 5% (16 horas). Después de este tratamiento, las esferas fueron lavadas una vez con agua destilada y una vez con solución de cloruro de bario 20 mM. Las esferas fueron lavadas dos veces con agua destilada y mantenidas toda la noche en solución de EDTA 250 mM (pH 10). La solución que contiene las esferas disueltas se filtra a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemania). La solución filtrada fue puesta en diálisis usando una membrana de celulosa para diálisis (Sigma-Aldrich, Ref: D9777, peso molecular de corte 14 kDa) contra una solución de cloruro de sodio 150 mM por 20 horas y agua destilada por el mismo tiempo con cambios diarios de medio. Una vez finalizada la diafiltración, se adicionó solución 10 mM de cloruro de sodio y la solución resultante se filtró a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemania). El alginato de sodio obtenido fue precipitado por la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto. El alginato precipitado fue liofilizado (Modelo Freezone 2.5, Labconco, Kansas, USA).

### 4.1.7 Viscometría del crioprecipitado

Se realizaron ensayos de viscometría para la mezcla de crioprecipitado realizada. Estos ensayos se realizaron en un reómetro BOHLIN CVOR-200 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Inglaterra) usando una geometría de cono y plato de 2° y 40 mm de diámetro. Se empleó la siguiente rampa de velocidad de deformación: se incrementa la velocidad de deformación entre  $0.1 \text{ s}^{-1}$  y  $150 \text{ s}^{-1}$  durante 100 s, durante 120 s permaneció en  $150 \text{ s}^{-1}$  y por último descendió entre  $150 \text{ s}^{-1}$  y  $0.1 \text{ s}^{-1}$  durante 100 s. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado, manteniendo constante la temperatura en  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La distancia entre el cono y plato (*gap*) fue de  $50 \text{ }\mu\text{m}$ .

### 4.1.8 Reología dinámica de los geles de crioprecipitado

Se evaluaron geles de crioprecipitado entrecruzado con calcio divalente en dos relaciones volumétricas de crioprecipitado a solución de cloruro de calcio al 3 % p/v: 10:1 y 20:1. Inicialmente se realizaron ensayos de *amplitude sweep* conducentes a la determinación de la región viscoelástica lineal (VLR), que permitiera determinar la máxima deformación (*strain*). La mezcla del crioprecipitado y el cloruro de calcio se ubicó sobre el plato del sistema *peltier* del reómetro BOHLIN CVOR-200 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Inglaterra), utilizando la geometría de platos paralelos de 25 mm de diámetro. La mezcla se dejó gelificar por 30 minutos, manteniendo una separación entre platos (*gap*) de  $500 \text{ }\mu\text{m}$  y una temperatura de  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se realizaron ensayos manteniendo la frecuencia constante en 1 Hz y se varió la deformación entre 0.0001 y 10 (0.01% y 1000%), a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

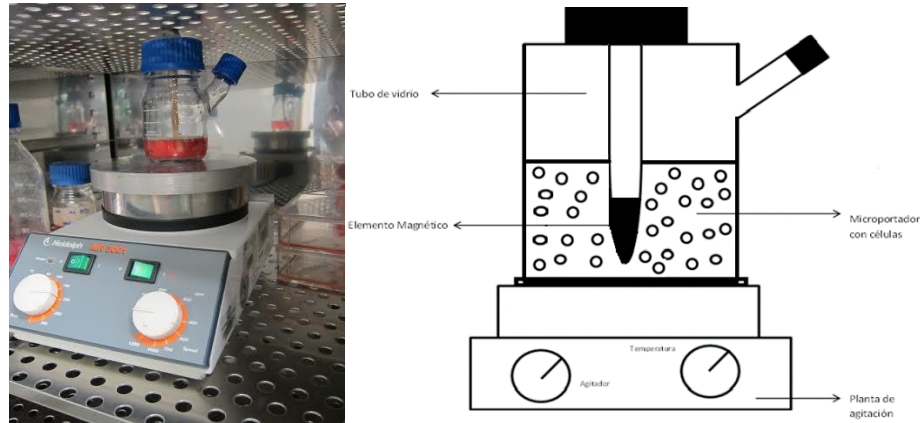
Una vez definida la región viscoelástica lineal (VLR) se realizaron ensayos de frecuencia variable (*frequency sweep*) en los cuales se varió la frecuencia entre 0.1 y 10 Hz manteniendo constante la deformación en 1% y la temperatura en  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; las variables de respuesta que se obtuvieron fueron el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ), la distancia entre platos (*gap*) fue de  $500 \text{ }\mu\text{m}$ .

#### 4.1.9 Evaluación de la proliferación celular en biorreactor

Siguiendo el protocolo establecido en la sección 3.1.9 para el crecimiento en biorreactor de fibroblastos 3T3, se realizó el cultivo en biorreactor de fibroblastos humanos. Se evaluó solo una concentración de microportadores iniciales (20,000 microportadores/ml) y una concentración inicial de fibroblastos  $1 \times 10^5$  fibroblastos/ml. Se tomaron los microportadores APF, suspendidos en solución salina 0.9% cloruro de sodio y 0.5% de ácido tranexámico® con un volumen empacado de 0.5. Se tomaron 6 ml, se centrifugaron a  $500 \times g$  durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron en el mismo volumen pero de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%.

Los fibroblastos se tomaron a partir de un frasco de cultivo T-75 en confluencia cercana al 80%, se tripsinizaron (Anexo B) y se realizó conteo celular usando azul de tripano (Anexo C). Se re-suspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado al 10 % con suero fetal bovino, 1 % de antibiótico-antimicótico y 0.5 % de ácido tranexámico de tal manera que se garantizara una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml.

Se transfirieron los microportadores (6 ml) y los fibroblastos (500  $\mu$ l) a un pozo de una caja de microtécnica de 6 pozos y se dejaron durante 12 horas en un agitador orbital a 50 rpm a 37°C. Transcurrido este tiempo, se tomaron los microportadores y se pasaron al reactor *spinner*, cuya descripción se realizó en el acápite 3.1.9. Se adicionó el resto del medio de cultivo hasta completar 30 ml. Se tomó la muestra inicial de 1 ml de microportadores con células y se determinó la concentración celular de células libres (conteo directo en cámara de Neubauer, según Anexo C) y células adheridas (tripsinización y conteo en Cámara de Neubauer, según Anexo B y Anexo C). Para evitar que la agitación despegara las células, el reactor se agitó a 50 r.p.m. durante 5 minutos cada hora y media. Se tomaron muestras cada 12 horas para determinar viabilidad y proliferación celular mediante tripsinización y conteo en Cámara de Neubauer (Anexo B y Anexo C), el cultivo se dejó hasta alcanzar la fase estacionaria. La Figura 4-1 presenta el montaje experimental empleado para el cultivo de los fibroblastos en reactor *spinner*.



**Figura 4-1** Biorreactor de 100 ml de capacidad con boquilla lateral ubicado sobre una plancha de agitación dentro de la incubadora con un volumen de reacción de 30 ml. Se puede apreciar el sistema de agitación magnético, el frasco de vidrio, la placa agitadora y los microportadores.

#### 4.1.10 Atrapamiento de células humanas en geles de plasma/alginate y crioprecipitado/alginate

Se evaluó el crecimiento de fibroblastos humanos atrapados en geles de plasma/alginate y crioprecipitado/alginate. Los fibroblastos se tomaron de la etapa final de cultivo en el reactor *spinner*, se centrifugaron los microportadores, se tripsinizaron (Anexo B) y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%, garantizando una concentración de  $5 \times 10^6$  fibroblastos/ml. El protocolo para realizar el atrapamiento de los fibroblastos está basado en lo presentado en el numeral 2.1.5 del presente trabajo. Se prepararon 1800  $\mu$ l de la mezcla de plasma sanguíneo/alginate de sodio y crioprecipitado/alginate de sodio, garantizando que la concentración de alginate final fuera 1.6% p/v; la solución original de alginate de sodio tenía una concentración de 3% p/v. A la mezcla anterior se adicionaron 200  $\mu$ l de una suspensión celular de fibroblastos humanos. Se colocaron 400  $\mu$ l de la suspensión por pozo de una caja de microtécnica de 24 pozos. Para lograr la gelificación, se asperjó la solución de cloruro de calcio al 3% p/v usando el aerógrafo comercial (Airbrush Ranger, Ref: 1140 008/W-71G 1394) durante 15 segundos, con un flujo de 22 ml por minuto y un flujo de aire de 4 l/min a una presión de 20 psig en cabina de flujo laminar. El aire empleado por la boquilla se esterilizó con un filtro para aire de 0.22  $\mu$ m (Sartorius, Alemania). El aerógrafo comercial, el filtro de aire y las mangueras

de silicona se esterilizaron con óxido de etileno. Se dejaron gelificar durante 30 minutos en la incubadora (37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>). Una vez se terminó la gelificación, se retiró el exceso de cloruro de calcio, se realizó un lavado con solución de Hanks y se adicionaron 400 µl de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%. En los días 2, 7, 11 y 15 se retiró el gel con ayuda de una espátula estéril, se colocó en solución de glutaraldehído al 1% en solución de PBSA. Las muestras se llevaron a patología donde se realizó la fijación y tinción con Hematoxilina/Eosina.

Para realizar el seguimiento del crecimiento celular, en los mismos días se desintegró el gel mediante la incubación con tripsina/EDTA por 2 horas y se realizó el conteo celular, previa tinción con azul de tripano según el Anexo C.

#### **4.1.11 Atrapamiento de fibroblastos humanos en geles de crioprecipitado**

Para el atrapamiento de fibroblastos humanos, se partió de las células cultivadas en el biorreactor. Los fibroblastos se tomaron de la etapa final de cultivo en el reactor *spinner*, se centrifugaron los microportadores, se descartó el sobrenadante y se sometieron a tripsinización (Anexo B) para liberar las células adheridas. Una vez liberadas las células se re-suspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%, garantizando una concentración de  $5 \times 10^6$  fibroblastos/ml. Se tomaron 1600 µl de crioprecipitado y se mezclaron con 200 µl de la suspensión celular y 200 µl de solución de cloruro de calcio al 3% p/v. Se agitaron con micropipeta y se sirvieron 400 µl de la suspensión celular por pozo de una caja de microtécnica de 24 pozos. Se llevaron a la incubadora por 30 minutos para lograr la gelificación. Una vez se alcanzó la gelificación, se lavaron con solución de Hanks y se adicionaron 400 µl de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y ácido tranexámico al 0.5%. En los días 2, 7, 11 y 15 el gel se retiró con ayuda de una espátula estéril, se colocó en solución de glutaraldehído al 1% en solución de PBSA. Las muestras se llevaron a patología donde se realizó la fijación y tinción con Hematoxilina/Eosina.

Para realizar el seguimiento de la proliferación celular, en los mismos días en que se fijó el gel para patología, se desintegró el gel mediante la incubación con tripsina/EDTA por 2 horas y se realizó el conteo celular, previa tinción con azul de tripano según el Anexo C.

#### **4.1.12 Comportamiento morfológico**

La evaluación de la morfología de las células atrapadas en los geles se evaluó mediante la tinción con hematoxilina/eosina. Los geles fueron fijados en glutaraldehído al 1% en PBSA. Posteriormente, fueron embebidos en parafina líquida, cortados usando micrótopo y fijados sobre una lámina porta objetos. Se sumergieron en xilol para eliminar la parafina durante 10 minutos, posteriormente fueron re-hidratados usando series decrecientes de etanol al 100 %, 95 % y 70 %. Se lavaron con agua y se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina, se lavó el exceso de colorante y se pasó por alcohol ácido. Se lavó nuevamente y se sumergió durante 30 segundos en eosina. Se deshidrata usando la serie creciente de etanol al 70%, 95% y 100%. Se deja deshidratar y se realiza el montaje final.

Para la verificación de la formación de fibras de colágeno se empleó la tinción Tricrómico de Masson, acorde a lo reportado por Arango et al [96]. Se toman los geles con células atrapadas y se entrecruzaron con glutaraldehído al 1% en PBSA, fueron embebidos en parafina, cortados con micrótopo, fijados en una lámina portaobjetos y desparafinado con xilol. Se tiñeron con hematoxilina férrica durante 10 minutos, lavados con agua durante 10 minutos. Posteriormente, se tiñeron con solución de escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos y se lavó con agua destilada. Seguidamente se trataron con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10-15 minutos y se tiñeron con solución de azul de anilina durante 15 minutos. Se lavaron con agua destilada y se dejaron en contacto con solución de ácido acético al 1% durante 3-5 minutos. Se deshidrataron y se fijaron con lámina cubreobjetos.

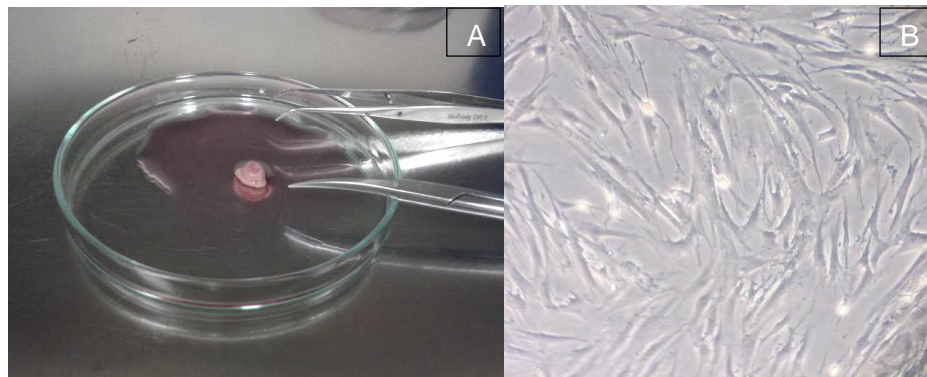
Adicionalmente se realizó tinción con vimentina para comprobar que las células aisladas, proliferadas y atrapadas en los geles seguían manteniendo su característica de fibroblastos.

## **4.2 Resultados y discusión**

### **4.2.1 Aislamiento de fibroblastos, pasaje celular y criopreservación**

Se obtuvieron muestras de prepucio de cinco niños, las cuales fueron procesadas para la obtención de fibroblastos, siguiendo el protocolo presentado en el Anexo A. La obtención de fibroblastos a partir de biopsias de prepucio de niños, es un procedimiento ampliamente documentado [19], [57], [58], [74], [89], [93] y constituye una excelente fuente de obtención de este tipo de células, por cuanto la biopsia termina siendo descartada en los Centros Médicos. Además, se puede tener fácil acceso a este tipo de muestras y los fibroblastos aislados crecen con facilidad.

En la Figura 4-2 se presenta una fotografía de los fibroblastos humanos aislados y de uno de los prepuccios entregados para el aislamiento de células. Como se puede apreciar en esta figura, la morfología de los fibroblastos aislados corresponde a la reportada en la literatura; dichas células tienden a tener prolongaciones en los extremos y a poseer una forma ahusada en la parte central. El espacio ocupado por estas células es bastante mayor al ocupado por las células de la línea 3T3, porque su tamaño es mayor. La concentración celular de los fibroblastos 3T3 es de 40,000 fibroblastos/cm<sup>2</sup> mientras que la concentración de los fibroblastos humanos es 10,000-15,000 fibroblastos/cm<sup>2</sup>; estos valores se obtuvieron a partir de la tripsinización y conteo celular en confluencia del 100% en pozos de una caja de 24 pozos.



**Figura 4-2:** A: prepuce de niño obtenido a partir de la circuncisión; B: fibroblastos humanos aislados a partir de prepuce de un niño (P-4; 20X).

Se puede apreciar en la parte B la morfología ahusada característica de los fibroblastos.

Una vez aisladas las células se colocaron en frascos de cultivo y se presentó la adhesión celular a la superficie; las células que no fueron viables quedaron suspendidas en el medio de cultivo y en el cambio de medio, que se realizó al segundo día de haber procesado la muestra, fueron eliminadas. Los fibroblastos fueron pasajeados hasta alcanzar el pasaje 20, cuando se descartaron las células. El cambio de medio se realizó cuando el medio de cultivo se tornó amarillo, lo cual indica una caída del pH gracias a la presencia del indicador rojo de fenol presente en el medio de cultivo. Los fibroblastos humanos no requieren cambios de medio tan frecuentes como los de la línea 3T3 que requieren dicho cambio cada tercer día; los fibroblastos humanos requirieron cambio de medio dos veces por semana, lo que indica que presentan un metabolismo más lento. Con miras a conservar las células para posteriores ensayos se congelaron una vez se alcanzó el pasaje 5, siguiendo el Anexo D.

#### 4.2.2 Purificación del alginato de sodio

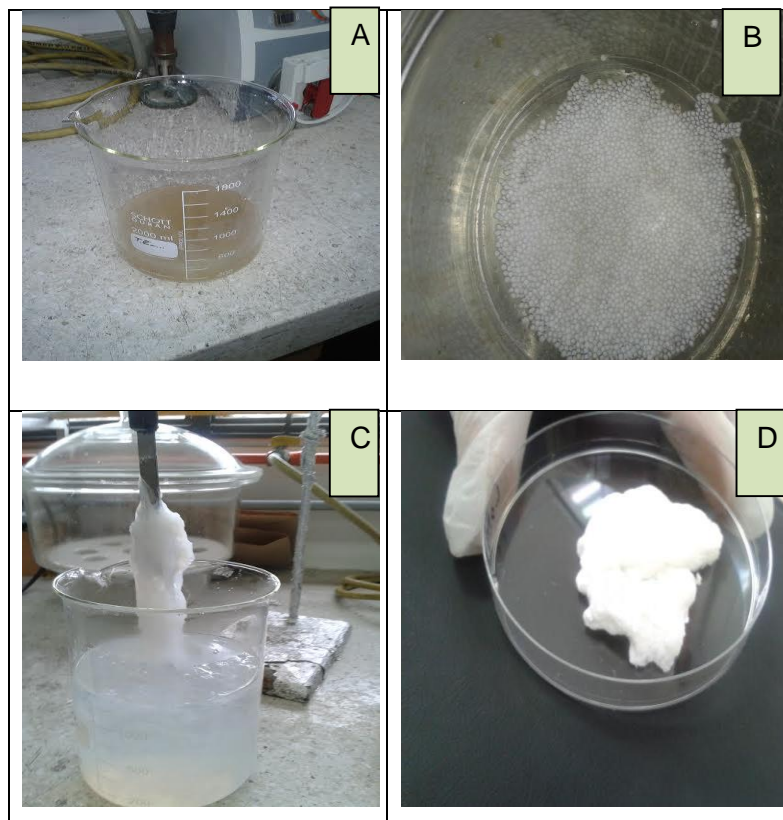
La biocompatibilidad de alginato ha sido ampliamente evaluada in vitro e in vivo y aún existe debate sobre el efecto de la composición en ese aspecto [115]. Se afirma que alginatos con alto contenido de ácido manurónico (M) son más inmunogénicos al producir cerca de 10 veces más citoquinas, comparados con alginatos con alto contenido de ácido gulurónico (G), mientras que otros autores han encontrado poca o ninguna respuesta

inmune [115]. Sin embargo, la literatura ha llegado a la conclusión que la principal fuente de respuesta inmune se debe a las impurezas remanentes en el alginato, tales como metales pesados, endotoxinas, proteínas y polifenoles que pueden estar presentes debido al proceso de separación [110], [115], [119]. Es por ello que el alginato debe ser sometido a un proceso de purificación, con miras a reducir el contenido de endotoxinas y polifenoles, que garantice una baja citotoxicidad que permita la conservación y proliferación de las células encapsuladas. En esta vía, Langlois et al [187] demuestran que la inmovilización en alginato purificado mejora la viabilidad y disminuye apoptosis celular de islotes de rata Wistar, comparado cuando son inmovilizados en alginato crudo; de manera similar Orive et al. [188] concluyen que la purificación de alginato reduce en un 63% el contenido de polifenoles, 91.45% el contenido de endotoxinas y 68.5% el contenido de proteínas, lo cual contribuye con la reducción de anticuerpos cuando son implantados en ratones. Debido a lo anterior, se vio la necesidad de realizar la purificación del alginato de sodio para evaluar el atrapamiento de fibroblastos.

La Figura 4-3 presenta algunas de las etapas de la purificación realizada en el laboratorio. Desafortunadamente no se pudo realizar la determinación del nivel de endotoxinas y polifenoles inicial y final del alginato empleado, por cuanto no se cuenta con las técnicas estandarizadas para ello. Sin embargo en la literatura consultada, como el reporte de Klock et al [189] quienes siguiendo el mismo protocolo empleado en el presente trabajo realizan la purificación de alginato rico en ácido manurónico (68%), y encuentran que el alginato purificado presenta un bajo nivel de endotoxinas (del mismo orden que el solvente empleado 6.1 EU/ml) y que además se han removido contaminantes mitogénicos, por lo cual no hay respuesta inflamatoria cuando es evaluado en modelos de experimentación animal. Basado en lo anterior, se puede concluir que el alginato purificado puede ser empleado para la encapsulación de células, sin que exista citotoxicidad del material. Anteriormente, dentro del Grupo de Investigación, Ramos [177] basado en la Norma ISO 10993-5 evaluó la citotoxicidad del extracto de geles de alginato (de la misma referencia al empleado en este trabajo) sin purificar sobre el crecimiento de fibroblastos de la línea L929 y no encontró efecto citotóxico. Lo anterior lleva a concluir que el alginato purificado resulta adecuado para el uso en Ingeniería Tisular.

La importancia de purificar el alginato, para aplicaciones en Ingeniería Tisular, ha llevado a la conformación de Empresas como Novamatrix ([www.novamatrix.biz](http://www.novamatrix.biz)) que comercializa, bajo el nombre de Pronova<sup>TM</sup>, alginato de sodio ultrapurificado para aplicaciones que incluyen Ingeniería Tisular, con un costo de US\$ 99.00/gramo.

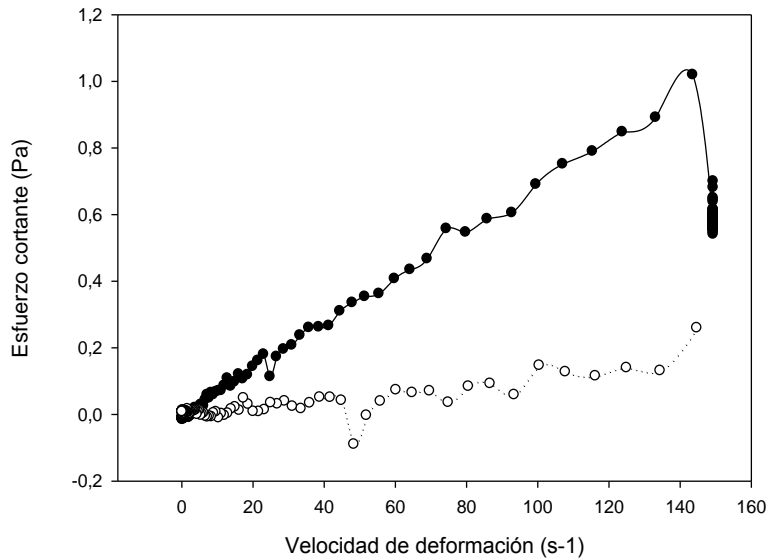
La purificación del alginato se hizo necesaria para el atrapamiento de las células, debido a que al realizar el atrapamiento de las células en los geles de plasma/alginato las células están en contacto directo con el material. No se realizó purificación para la formación de microportadores, debido a que gracias a la adsorción de proteínas las células están en contacto con fibrina, la cual no tiene reportada toxicidad.



**Figura 4-3:** Etapas de purificación del alginato: a) disolución de alginato de sodio en agua; b) formación de esferas de alginato de bario; c) precipitación de alginato de sodio en alcohol; d) alginato de sodio secado mediante liofilización.

### 4.2.3 Viscometría del crioprecipitado

La Figura 4-4 presenta el comportamiento del crioprecipitado de plasma sanguíneo cuando es sometido a un ensayo de viscometría. Como se puede apreciar en esta figura se presenta histéresis ya que la curva de ascenso y la curva de descenso del ensayo no se sobreponen. El comportamiento es bastante similar al presentado por el plasma sanguíneo (Figura 2-2), y de igual manera la histéresis se debe al reordenamiento de las proteínas presentes en la suspensión de una manera distinta cuando han sido sometidas a una alta velocidad de cizalla y ello conlleva a una disminución en la viscosidad.



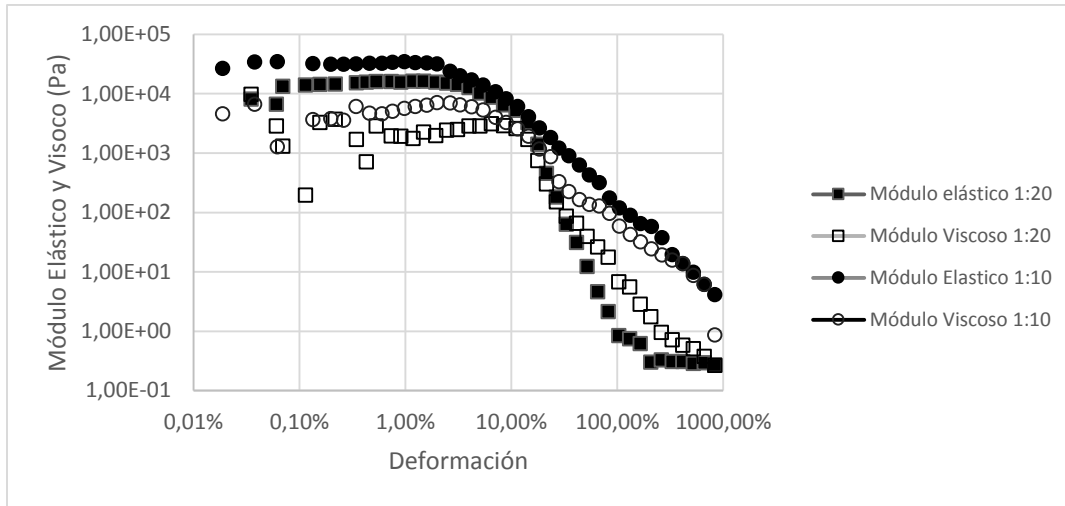
**Figura 4-4:** Curva de flujo para el crioprecipitado de plasma sanguíneo humano entre una velocidad de deformación de  $0.1 \text{ s}^{-1}$  y  $150 \text{ s}^{-1}$  a  $37 \text{ °C}$ . (●: Rampa de ascenso; ○: rampa de descenso). Se puede apreciar la histéresis debida fundamentalmente a la formación de *rouleaux*.

La curva de flujo muestra un comportamiento lineal durante la rampa de ascenso, lo cual corresponde a un comportamiento Newtoniano con un coeficiente de correlación promedio de  $0.9952 \pm 0.0035$  para los 3 ensayos realizados. La viscosidad para la rampa de ascenso del crioprecipitado de plasma sanguíneo es de  $6.47 \pm 0.47 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , con un comportamiento reológico correspondiente a un fluido Newtoniano. Al comparar la viscosidad del plasma

sanguíneo reportada en el numeral 2.2.3 ( $6.15 \pm 0.004$  mPa·s) con la obtenida para el crioprecipitado del plasma ( $6.47 \pm 0.47$  mPa·s), se puede ver que no existe cambio considerable a pesar del incremento de fibrinógeno al pasar de 2.73 mg/ml para el plasma sanguíneo a 4.67 mg/ml en el crioprecipitado, lo que indica que las proteínas presentes en el crioprecipitado tienen una estructura globular, por lo cual se puede incrementar el contenido de proteína sin que haya incremento en la viscosidad. Recientemente se ha mostrado que aunque el comportamiento a partir de ensayos reológicos, como el realizado en este trabajo, llevan a concluir que es un fluido newtoniano, mediante técnicas como flujo extensional se puede ver el comportamiento viscoelástico [190]. La viscosidad reportada para el plasma sanguíneo es de 1.34 mPa·s [190] y  $1.25 \pm 0.10$  mPa·s [42], los cuales son valores menores al encontrado en el presente trabajo, pero la formación de *rouleaux* puede contribuir a que exista desviación de dicho valor.

#### **4.2.4 Reología dinámica del crioprecipitado**

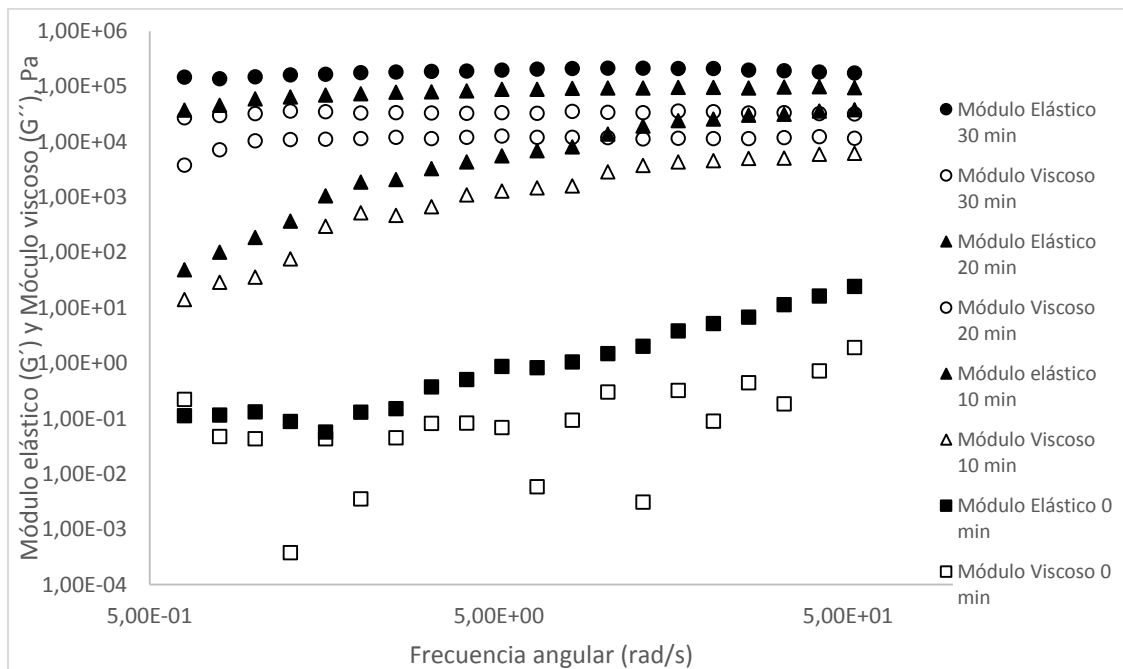
La determinación de la región viscoelástica lineal (VLR) de los geles de crioprecipitado se pueden ver en la Figura 4-5. El comportamiento que presentaron resultó similar al de los geles de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio (Figura 2-4 y Figura 2-5).



**Figura 4-5:** Determinación de la región viscoelástica Lineal (VLR) para geles de crioprecipitado en 2 relaciones volumétricas 1:10 y 1:20 (volumen de crioprecipitado a volumen de cloruro de calcio al 3% p/v). La VLR se fijó para los ensayos de reología dinámica en 1%.

A partir de la figura anterior, se puede ver que en las dos relaciones volumétricas de crioprecipitado a solución de cloruro de calcio al 3 % p/v (10:1 y 20:1), el módulo elástico estuvo por encima del módulo viscoso ( $G' > G''$ ), lo cual implica que se presentó la gelificación del crioprecipitado en un tiempo de 30 minutos para las 2 relaciones evaluadas. El comportamiento resulta similar al presentado para los geles de plasma/alginato presentados en la Figura 2-4 y Figura 2-5; adicionalmente la región viscoelástica lineal (VLR: *viscoelastic linear region*) se puede considerar hasta una deformación del 1 % para todos los ensayos, la cual fue seleccionada para los ensayos de frecuencia controlada (*frequency sweep*). Sin embargo, no se presentó gelificación para la relación crioprecipitado: cloruro de calcio 20:1 debido a que el calcio adicionado resulta insuficiente para la gelificación. La presencia en crioprecipitado de agentes quelantes como citratos y fosfatos, que evitan la coagulación, conlleva a que el calcio adicionado sea capturado por el anticoagulante, y es el exceso de calcio el que finalmente quedará disponible para la coagulación de la fibrina.

Con base en la determinación de la VLR, se realizaron barridos de frecuencia (*frequency sweep*) que se presentan en la Figura 4-6. Como se aprecia en la mencionada figura, en la medida en que se incrementa el tiempo de gelificación, se presenta el incremento en el módulo elástico ( $G'$ ) y en el módulo viscoso ( $G''$ ). En todos los tiempos de gelificación, se encontró un predominio del módulo elástico sobre el módulo viscoso. Así por ejemplo, para un tiempo de gelificación de 0 minutos, se presenta incremento en el módulo elástico ( $G'$ ) en la medida en que aumenta la frecuencia, sin que se pueda alcanzar estabilidad. Para el tiempo 10 minutos, los valores de los dos módulos, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), son mayores a los obtenidos en el tiempo inicial, sin embargo continúan incrementándose. Para el tiempo de 20 minutos y 30 minutos, se alcanza la estabilidad en los módulos y por tanto finaliza la gelificación.



**Figura 4-6:** *Frequency sweep* para los geles de crioprecipitado a diversos tiempos de gelificación: 0 min, 10 min, 20 min y 30 min. Se puede apreciar que el tiempo requerido para la gelificación es de 30 min, usando una relación en volumen 10:1 (volumen de crioprecipitado a volumen de cloruro de calcio al 3% p/v).

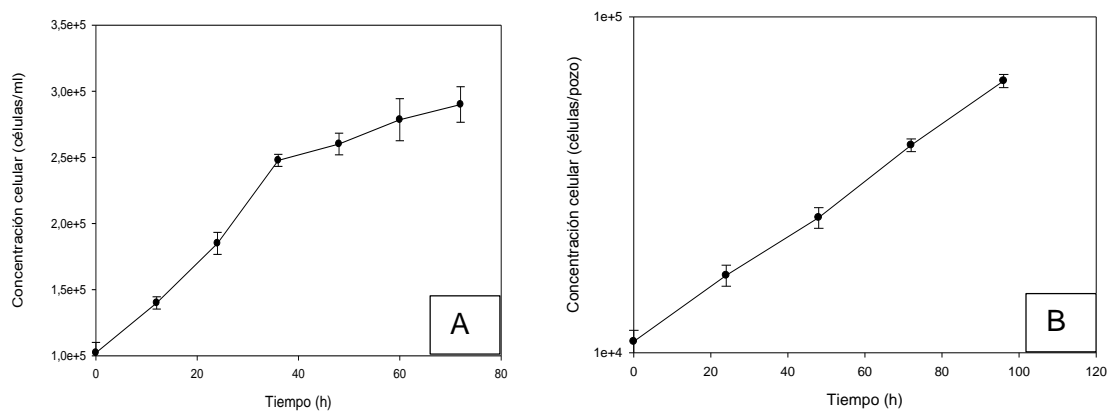
Se intentó realizar un ajuste como el planteado por la ecuación 2-7 para los ensayos con tiempo de gelificación de 30 minutos; sin embargo el ajuste presentó un coeficiente de determinación bastante bajo (del orden de 0.7). Lo anterior indica que el gel ha alcanzado

la estabilidad y que el módulo elástico es constante e independiente de la frecuencia angular. La relación  $G'/G''$  promedio arrojó un valor de  $7.35 \pm 0.94$ , lo cual indica el predominio del módulo elástico sobre el viscoso. Estos resultados son similares a los obtenidos por Eyrich [47], quienes evaluaron concentraciones de fibrinógeno entre 6.25 mg/ml y 50 mg/ml.

Una de las ventajas de los geles elaborados en el presente trabajo, comparados con otros reportados de fibrina, es la posibilidad de emplear crioprecipitado de plasma sin que se requiera la precipitación y purificación del fibrinógeno. Lo anterior es una ventaja tecnológica por cuanto, asociado a bancos de sangre, se facilita la generación de geles de fibrina o a partir del plasma del propio paciente (geles autólogos).

#### **4.2.5 Evaluación de la proliferación en biorreactor**

La evaluación de la proliferación celular en reactor *spinner* se presenta en la Figura 4-7, comparada con la proliferación celular en caja de microtécnica, para los fibroblastos humanos. Como se puede ver en la mencionada figura, no se presenta una fase de latencia en el crecimiento en biorreactor, sino que las células empiezan a proliferar sobre la superficie disponible del microportador. El tiempo de duplicación para el reactor *spinner* calculado a partir de los datos presentados fue  $28.43 \pm 2.09$  h, el cual resulta menor al obtenido para las células cultivadas en caja de cultivo el que fue de  $37.5 \pm 1.28$  h. El tiempo de duplicación es del mismo orden que el reportado por Phillips et al [179], quienes reportan un tiempo de duplicación de 22.5 h para el cultivo de fibroblastos humanos sobre microportadores de poliestireno recubierto con trimetil amonio.



**Figura 4-7:** Cinética de crecimiento de fibroblastos humanos en reactor *spinner*. A: reactor *spinner* con una concentración inicial de microportadores de 20,000 microportadores/ml. B: en caja de microtécnica. El tiempo de duplicación en reactor *spinner* fue de  $28.43 \pm 2.09$  h, menor al obtenido en la caja de microtécnica  $37.5 \pm 1.28$  h.

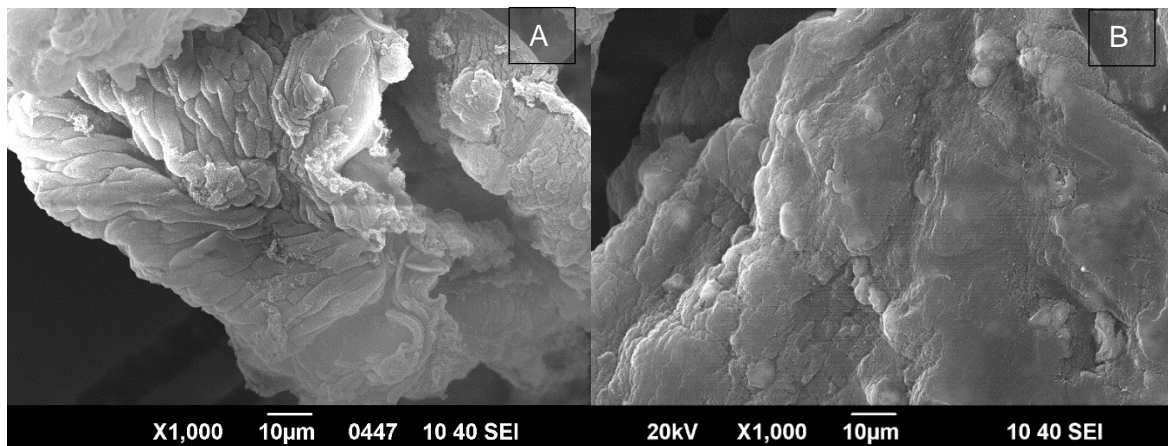
La adhesión de los fibroblastos humanos a los microportadores se debe a la presencia de integrinas  $\alpha\beta 3$  en la membrana celular, las cuales se unen a los sitios RGD presentes en la fibrina [191]. La cinética de crecimiento muestra que no existe fase de latencia, lo cual puede ser comparado con la cinética de crecimiento realizada para las células murinas (Figura 3-18), lo anterior se debe a una mayor interrelación entre la fibrina humana y los fibroblastos humanos.

La proliferación en biorreactor permitió incrementar la concentración celular cerca de 3 veces, a pasar de una concentración inicial de  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  en 72 horas. La concentración celular en reactores *spinner* se puede incrementar mucho más al colocar una mayor concentración de microportadores inicial; sin embargo, en este estudio se buscó realizar la exploración de la proliferación celular en reactor *spinner*, la información obtenida permitiría realizar el escalamiento del proceso a un mayor volumen y con mayor concentración de microportadores. La Figura 4-8 (B) muestra una fotografía obtenida mediante microscopía de barrido electrónico (SEM), para los microportadores cargados con fibroblastos a la hora 48 de cultivo. Debido al procesamiento de entrecruzamiento con glutaraldehído y deshidratación con etanol, se presenta deformación del microportador por lo que no se pueden identificar plenamente los fibroblastos, al comparar la mencionada fotografía con la Figura 4-8 (A). Por ello se concluye que la mejor alternativa para la

obtención de fotografías de las células sobre los microportadores es mediante la tinción con agentes fluorescentes y el uso de microscopía confocal o de fluorescencia (Figura 3-19 y Figura 3-20).

Grandes ventajas se pueden tener al cultivar fibroblastos sobre microportadores. Por ejemplo, Palmiero et al [149] reportan, después de 4 días de cultivo en reactor *spinner*, la formación de colágeno tipo I para el cultivo de fibroblastos bovinos al ser cultivados en microportadores de gelatina, comparados con el cultivo en 2D sobre frascos de cultivo. Lo anterior se debe fundamentalmente a que las células son cultivadas en 3D y por otro lado, la aplicación de esfuerzos cortantes durante la agitación favorece la expresión de colágeno.

Aunque el uso de microportadores y biorreactores ha sido empleado desde hace varios años para la producción de hibridomas, vacunas y factores de crecimiento, la posibilidad de usar este tipo de tecnología para el cultivo de aislamientos primarios emerge como una posibilidad a integrar en la Ingeniería Tisular [179].



**Figura 4-8:** Microscopía electrónica de barrido (SEM) para microportadores. A: microportadores sin fibroblastos; B: microportadores con fibroblastos adheridos. Debido al tratamiento de entrecruzamiento y deshidratación con glutaraldehído y etanol, se presenta deformación de los microportadores

Una de las ventajas de usar células adheridas a microportadores está relacionada con la posibilidad de transportarlas desde el laboratorio hasta la clínica. Gorodetsky et al [192] evaluaron la posibilidad de mantener fibroblastos adheridos a microportadores de fibrina en condiciones de hipoxia a temperatura ambiente, y encontraron que es posible extender hasta por 10 días las células viables y adheridas, lo cual se convierte en una alternativa tecnológica para el traslado de equivalentes.

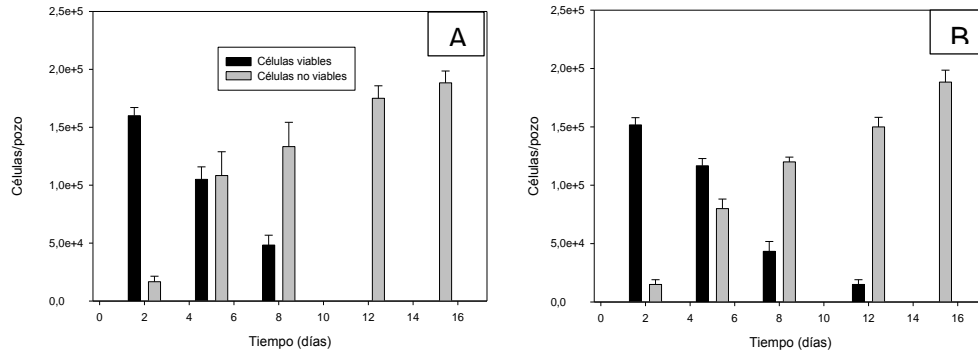
Adicionalmente, los fibroblastos adheridos sobre microportadores pueden ser aplicados directamente en la zona de la herida. En esta vía Lafrance y Armstrong [133] emplearon microesferas (diámetro: 73-140 $\mu$ m) de PLGA sobre las cuales crecieron fibroblastos y queratinocitos y los colocaron en zonas afectadas de modelos porcinos y encontraron que la cicatrización es más rápida y natural frente a otros métodos, además estimaron que con 2 g de microportadores podrían cubrir un área cercana a 2 m<sup>2</sup> que es la superficie total del cuerpo. Una de las desventajas de este material es la pérdida de la capacidad de controlar la pérdida de fluidos de la superficie de la herida, y de proveer una barrera a la infección. En esta vía la aplicación de microportadores y biorreactores puede contribuir con la reparación y remodelación tisular que iría más allá a ser un método de proliferación celular.

Otra posibilidad es el atrapamiento de los microportadores cargados con fibroblastos en geles. Esta vía ha sido explorada por Nehls y Drenckhahn [137] quienes muestran que células endoteliales adheridas a microportadores al ser colocados en geles de fibrina presentan migración celular y favorecen la angiogénesis. Sommar et al. [150] realizan el cultivo de fibroblastos humanos sobre microportadores de gelatina, los cuales son atrapados en geles de plasma rico en plaquetas, y mediante el empleo de medios inductores logran la formación de cartílago y hueso *in vitro*. Esta alternativa no se evaluó en este trabajo porque se prefirió el cultivo convencional en geles con células atrapadas en ellos.

#### **4.2.6 Encapsulación de fibroblastos en geles de plasma/alginato y crioprecipitado/alginato**

En el capítulo 1 se presentó la metodología para la formación de un gel de plasma/alginato de calcio al 1.6 p/v, el cual se evaluó en el atrapamiento de fibroblastos humanos. Con una

concentración inicial de 500,000 células/ml se prepararon los geles y se dejaron en cultivo por un periodo de 15 días. El uso de la mezcla plasma/alginato es una posibilidad que buscaba aprovechar, la resistencia mecánica que ofrece el alginato de calcio y la adhesión celular que ofrece la fibrina presente en el plasma sanguíneo.



**Figura 4-9:** Comparación del crecimiento celular en geles de plasma/alginato. A: sin ácido tranexámico, B: con ácido tranexámico al 0.5%.

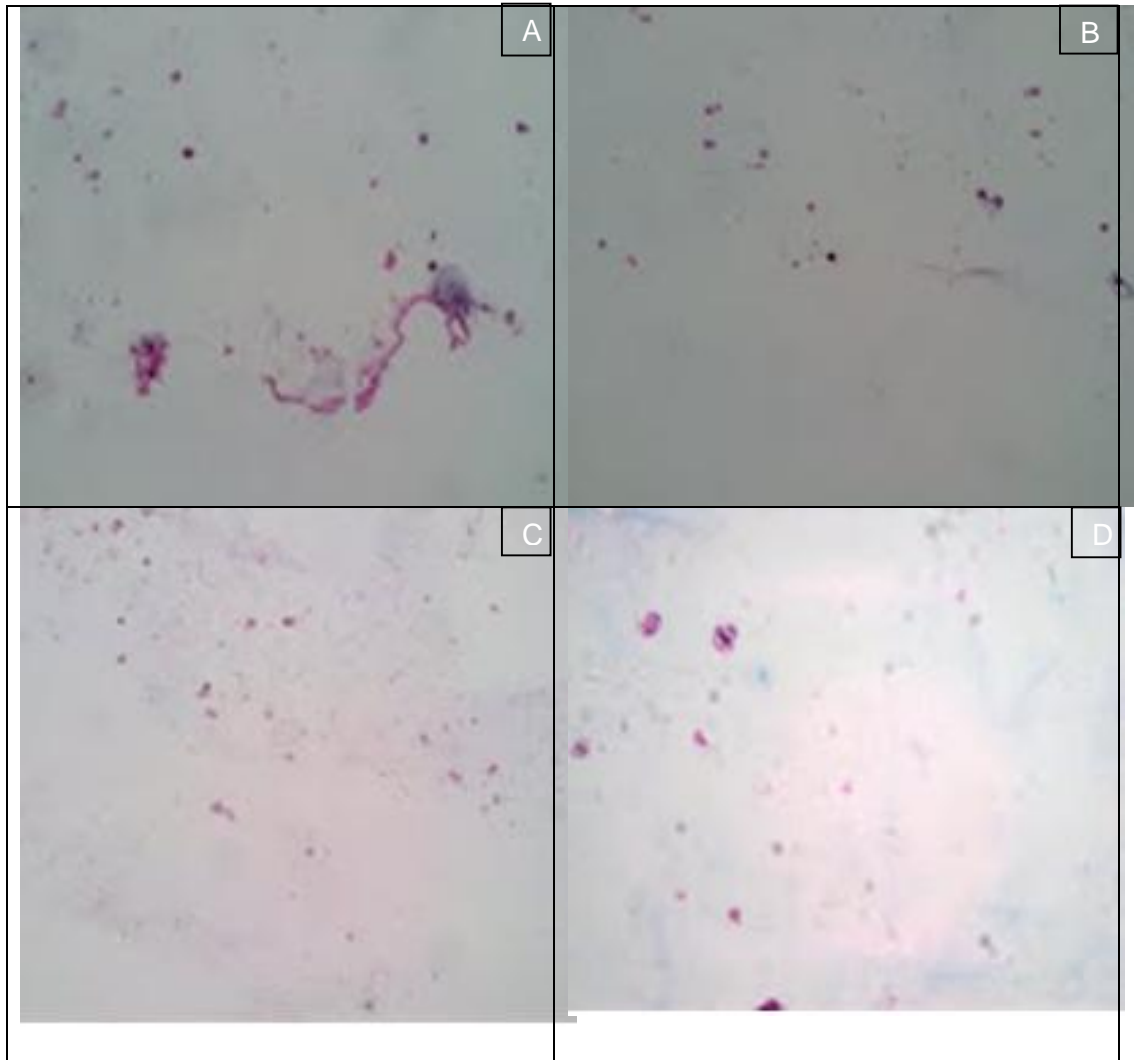
Los resultados obtenidos en la proliferación celular no fueron los esperados. La Figura 4-9 muestra los resultados obtenidos para la viabilidad celular en los geles de plasma/alginato, en presencia de ácido tranexámico y en ausencia del mismo. En esta figura en la parte izquierda se puede ver que la viabilidad celular, en geles sin ácido tranexámico, disminuye a través del tiempo, y sobre el día 12 la mayoría de las células se tornan no viables. La adición de ácido tranexámico al medio de cultivo logra extender la viabilidad, sin embargo sobre el día 15 ya no se encuentran células viables. Lo anterior reafirma que el comportamiento reológico es gobernado por el alginato y no por la fibrina. Las células no viables en el día 2 se puede deber a la alta viscosidad de la mezcla alginato/plasma que ocasiona que se deba pipetear más veces para homogeneizar y ello puede ocasionar daño por un alto esfuerzo cortante durante el mezclado [115].

Como se mencionó atrás, la estabilidad del gel está relacionada con la pérdida de calcio que conlleva a que el estado de gel se vaya tornando, a través del tiempo, en un estado de líquido viscoso, y al ser los fibroblastos células anclaje-dependientes se ve comprometida la viabilidad celular. Dicha desorción del calcio ocurre fundamentalmente en medios isotónicos [115], [120]. Como se mostró en el capítulo 2, el alginato es el que

gobierna el comportamiento reológico del gel y su desintegración afecta totalmente la estabilidad del mismo; además, la presencia de proteínas en el plasma sanguíneo hace que la estructura de caja de huevos, reportada por Grant et al. [103] para polisacáridos como el alginato, no se forme, porque las proteínas interfieren en la unión entre ácidos gúlicos, ocasionando una menor resistencia en el gel. En ensayo realizado para revisar la estabilidad del gel, este se dejó en medio DMEM-F12, en incubadora y se evidenció la desintegración en 5 días. Un resultado similar ha sido reportado por Bohari et al. [193], quienes afirman que a concentraciones mayores a 2% de alginato de baja viscosidad el gel se torna inestable y se forman esferoides después del día 15 de cultivo; en tanto que concentraciones del 0.5% presentan dichos esferoides sobre el día 8 de cultivo. Las células cultivadas en el presente trabajo no formaron esferoides, siempre mantuvieron una morfología esférica, indicando que no se presentó adhesión al soporte, ni proliferación celular.

Para evitar que la presencia de fibrina contribuyera con la desintegración, ya que a bajas concentraciones de fibrinógeno (menor a 6.25 mg/ml) la literatura reporta la desintegración en un tiempo menor a 1 semana [47], se montaron ensayos con la adición de un agente anti-fibrinolítico (ácido tranexámico) donde los resultados fueron similares al ensayo en el cual no se adicionó dicho agente (Figura 4-9).

Lo anterior se corresponde plenamente con lo mostrado en la Figura 4-10, donde se puede apreciar que las células mantuvieron una morfología esférica (sin adhesión celular), sin que se viera aumento en la concentración celular y con presencia de células picnóticas, lo cual es una evidencia de la muerte celular. Se puede concluir que aunque está presente la fibrina en los geles, no se produce interacción con los fibroblastos atrapados y eso explica la morfología esférica que mantuvieron, al no presentar adhesión celular los fibroblastos, por ser anclaje-dependientes, empezaron a perder viabilidad a través del tiempo. Sumado a lo anterior esta la inestabilidad del gel que ocasiona que finalmente los fibroblastos mueran a través del tiempo.

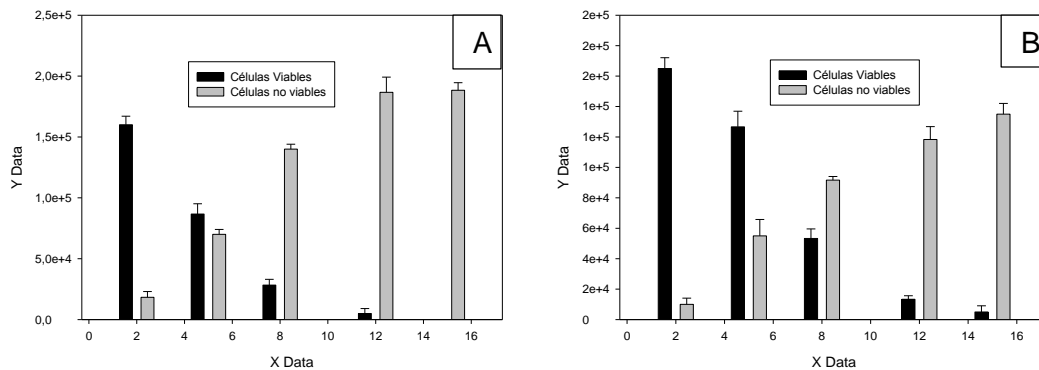


**Figura 4-10:** Tinción con hematoxilina/Eosina para fibroblastos humanos atrapadas en geles de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio al 1.6% p/v. Días: 2 (A), 7(B), 11(C) y 15(D). Aumento: 20 X.

Debido a lo anterior, se decidió atrapar los fibroblastos en geles de alginato con crioprecipitado en vez de plasma sanguíneo, manteniendo constante la concentración de alginato de sodio (1.6% p/v). Los resultados vistos en la Figura 4-12 muestran que aún con el incremento en la concentración de proteína en el gel, la viabilidad celular a través del tiempo disminuye, lográndose extender la presencia de algunas células viables hasta el día 12, y finalmente sobre el día 15 ya no existen células viables. Adicionalmente, la adición

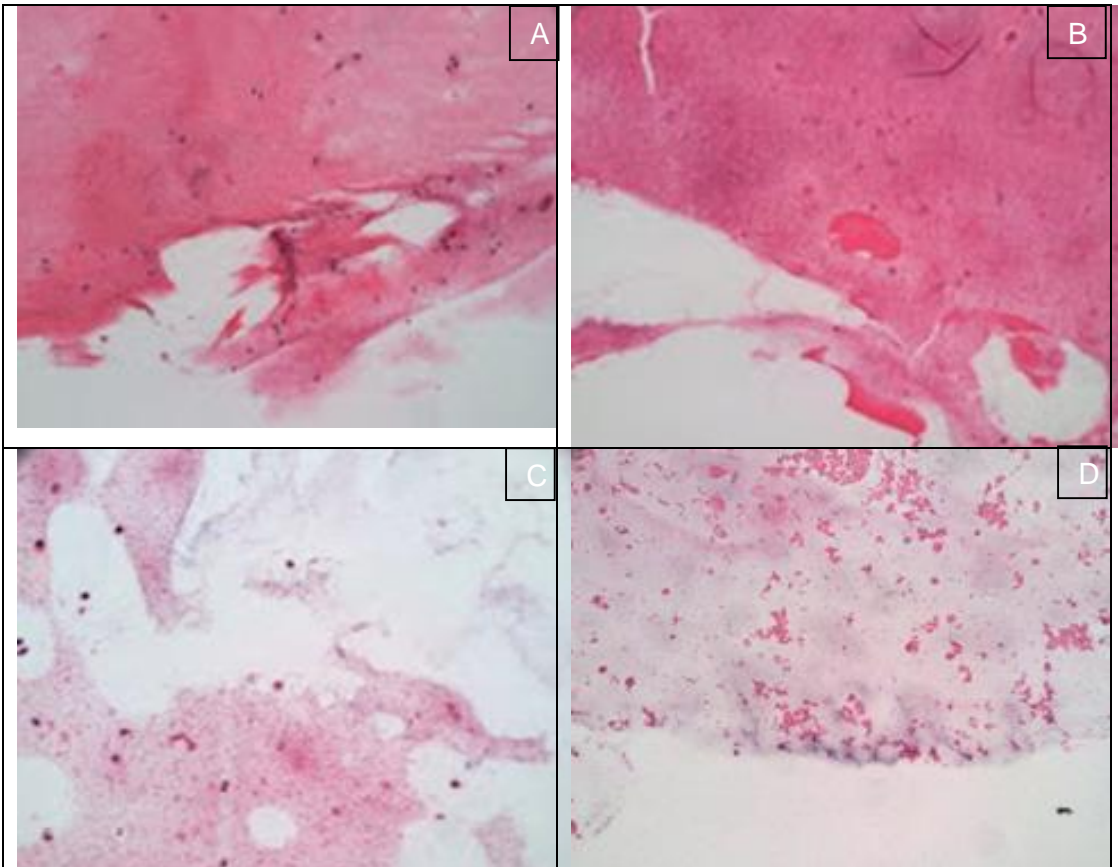
de ácido tranexámico no contribuye con la viabilidad celular, mostrando que el gel es gobernado por la presencia de alginato de calcio.

Lo anterior se corrobora con los resultados obtenidos mediante tinción con Hematoxilina/eosina (Figura 4-12), que muestra que los fibroblastos mantienen una morfología esférica dentro del gel y formaciones picnóticas, indicando que las células están perdiendo viabilidad celular.



**Figura 4-11:** Comparación del crecimiento celular en geles de crioprecipitado/alginato. A: sin ácido tranexámico, B: con ácido tranexámico al 0.5%.

La concentración de fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo y en el crioprecipitado (ver Tabla 3-1) resulta bastante baja para la generación del soporte, comparada con la reportada en la literatura [80], donde emplean concentraciones de fibrinógeno de 25 mg/ml y de alginato de sodio al 0.25%, y aún así encuentran geles inestables sobre el día 6. Ma et al [194] muestran que en la medida en que disminuye la concentración de fibrinógeno en la mezcla con alginato, el gel resultante termina siendo continuo para el alginato y con algunas inclusiones de fibrina, así por ejemplo para concentraciones de 16 mg/ml de alginato (cercana a las empleadas en este trabajo) y 30 mg/ml de fibrinógeno (más de 10 veces la concentración de fibrina empleada en este trabajo). Lo anterior lleva a concluir, que la estructura interna del gel fibrina queda aislada y la mayoría de las células quedan atrapadas en alginato.



**Figura 4-12:** Tinción con hematoxilina/Eosina para fibroblastos humanos atrapadas en geles de crioprecipitado de plasma sanguíneo humano y alginato de calcio al 1.6% p/v. Días: 2, 7, 11 y 15. Aumento 20 X.

Adicionalmente, los geles de plasma/alginato y de crioprecipitado/alginato muestran otro elemento que favorece la inestabilidad del gel, como lo es la presencia de altas concentraciones de citrato y fosfato, el cual es empleado como anticoagulante. El Hemocentro Distrital, institución que aportó el plasma sanguíneo y el crioprecipitado, utiliza bolsas estériles de la marca TERUMO ([www.terumomedical.com](http://www.terumomedical.com)) para la recolección de

sangre, y cada bolsa empleada para la colección de la sangre contiene 63 ml de anticoagulante cuya composición en % p/v es: ácido cítrico anhidro USP 0,299%, citrato de sodio dihidratado USP 2,63 %, fosfato de sodio monobásico monohidratado USP 0,222%, y dextrosa monohidratada USP 2,55%; a cada bolsa se adicionan 450 ml de sangre [195].

Los resultados obtenidos son contrastados con lo reportado por Hunt et al. [196] quienes muestran que células NIH 3T3 micro-encapsuladas en alginato de calcio permanecen viables durante 60 días y muestran que los geles liberan calcio al medio de cultivo, porque empiezan a disminuir la resistencia mecánica. Lo anterior se debe a la exposición de los geles a cationes monovalentes como sodio y potasio, así como fosfatos en los cuales dichos iones están presentes. En la misma línea Pokrywczynska et al [117] cultivaron fibroblastos murinos de la línea 3T3 en 3 concentraciones iniciales de  $2 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  y  $6 \times 10^6$  células/ml usando geles de alginato de viscosidad media, similar al empleado en este trabajo, y encontraron que las células migran desde el interior del gel hacia la superficie, llegando inclusive a formar esferoides (agregados celulares). La Empresa Cosmo Bio Co Ltd ([http://www.cosmobio.co.jp/index\\_e.asp](http://www.cosmobio.co.jp/index_e.asp)) evaluó el crecimiento de fibroblastos murinos de la línea 3T3-L1 en esferas de alginato ( $2 \times 10^5$  células/ml) y encontraron después de 21 días que las células no proliferan dentro de dichos geles [112]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo llevan a concluir que alginato no es un buen candidato para ser soporte de fibroblastos.

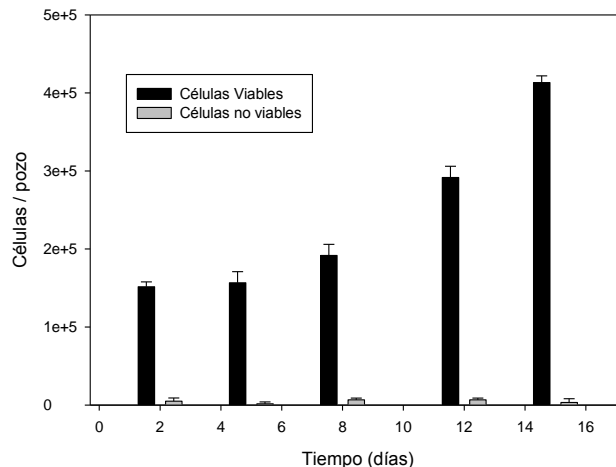
A pesar de los resultados obtenidos, es posible que el gel obtenido pueda ser apropiado evaluado para otras líneas celulares tales como células osteogénicas, condrogénicas o adipogénicas [79], [80], [81], [82], donde se han evaluado geles de fibrina/alginato.

#### **4.2.7 Atrapamiento de fibroblastos en geles de crioprecipitado**

Debido a la inestabilidad del gel de plasma/alginato y crioprecipitado/alginato, se decidió preparar geles usando crioprecipitado gelificado mediante la adición de calcio, aportado por una solución de cloruro de calcio. La Figura 4-13 presenta la concentración celular a través del tiempo. Como se puede ver durante los primeros cinco días no se presenta proliferación celular, las células permanecen viables adaptándose a las condiciones del

gel. Una vez se han adaptado a las condiciones del gel se empieza a presentar la proliferación celular hasta el día 15. Este ensayo se realizó en la presencia de ácido tranexámico debido a que ensayos previos mostraron que en el día 5 los geles se tornaron inestables, y dejaron en libertad los fibroblastos que terminaron adheriéndose a la superficie de la caja de cultivo. Un resultado similar es reportado por Acevedo et al [74], quienes presentan geles de fibrina estables solo por 3 días, a pesar de tener una mayor concentración de fibrina (54 mg/ml y 27 mg/ml).

Un elemento importante es la concentración de ácido tranexámico. Furst et al. [197] establecen que al suplementar el medio de cultivo con ácido tranexámico en concentración 50-100 mg/ml disminuye la viabilidad de fibroblastos hasta en un 50% y concluyen que la concentración a emplear debe ser mucho más baja. Cholewinski et al. [198] evalúan concentraciones del orden de 30-160  $\mu\text{g/ml}$  sin que haya efecto citotóxico sobre células de músculo liso y fibroblastos aislados de la arteria carótida. Demol et al. [60] emplean una concentración de 0.5 mg/ml para la diferenciación de células derivadas del periostio humano. A partir de esta revisión se escogió la concentración de 0.5 mg/ml porque esta concentración es el límite superior de la concentración que se administra intravenosamente en pacientes (0.02-0.5 mg/ml) [197] y es similar a la reportada por Demol et al. [60].

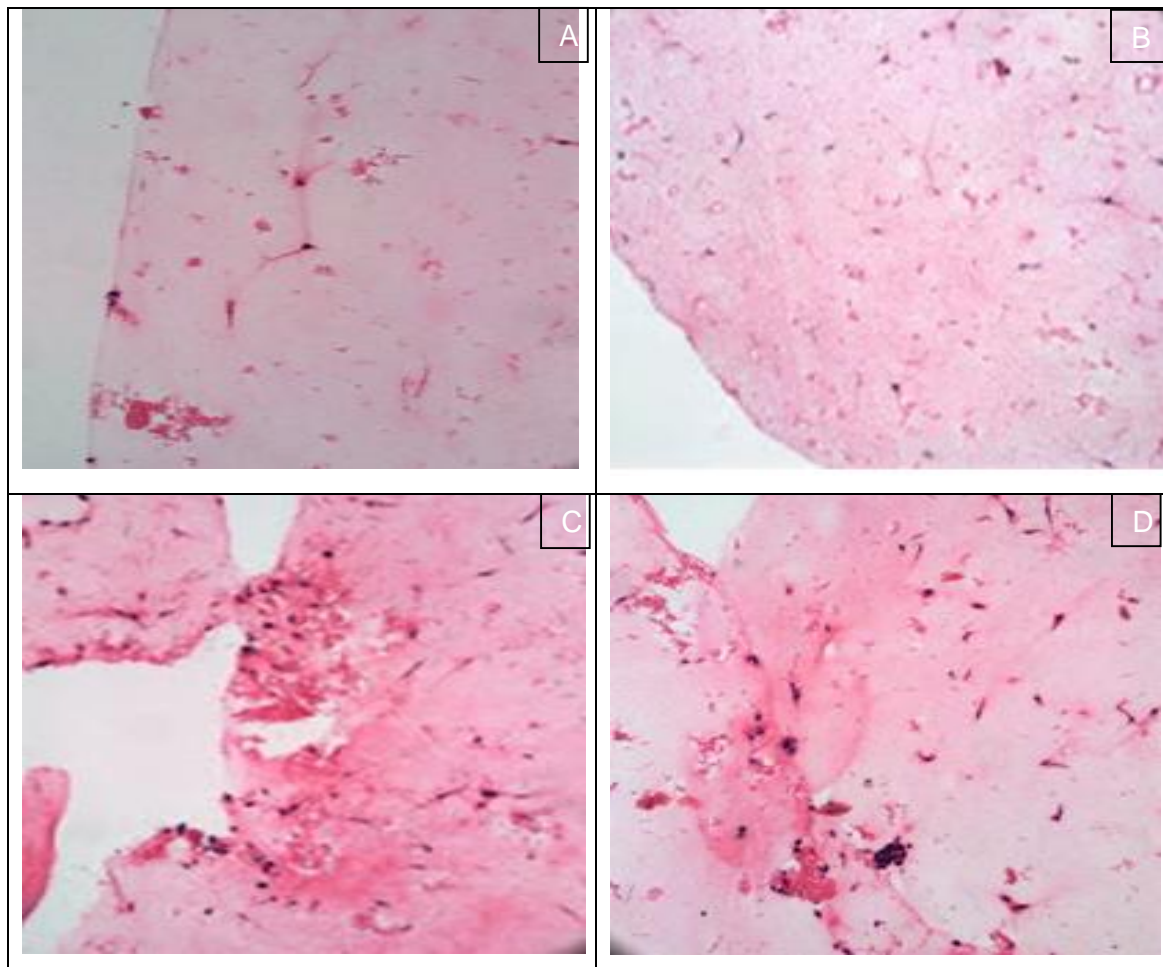


**Figura 4-13:** Crecimiento celular en geles de Crioprecipitado polimerizado con cloruro de calcio, relación volumétrica 10:1, suplementado con tranexam® al 0.5%.

---

La Figura 4-14 presenta la tinción con hematoxilina/eosina para los geles de crioprecipitado elaborados con una relación volumétrica 10:1 (Crioprecipitado a cloruro de calcio al 3 % p/v). Como se puede observar en esta figura en el día 2 las células se observan completamente viables, con la forma característica elongada en los extremos y ahusada en el centro. En el día 15 se puede observar una mayor concentración celular, con unas células con zona basófila teñida de color púrpura (núcleo celular) y una zona eosinófila de color rosa (citoplasma). A pesar de la baja concentración de fibrina empleada en este ensayo, se logró mantener por 15 días la estabilidad del gel gracias a la adición de ácido tranexámico. Resultados similares reportan Pohl y Christophers [199] quienes cultivaron fibroblastos murinos de la línea 3T3 y fibroblastos aislados de cobayos en geles de fibrina cuya concentración de fibrina se mantuvo entre 0.3 mg de fibrina/ml y 10 mg de fibrina/ml y encuentran que la morfología de los fibroblastos es ahusada; adicionalmente la velocidad de crecimiento de los fibroblastos es menor en los geles que en el crecimiento en cajas de microtécnica.

---

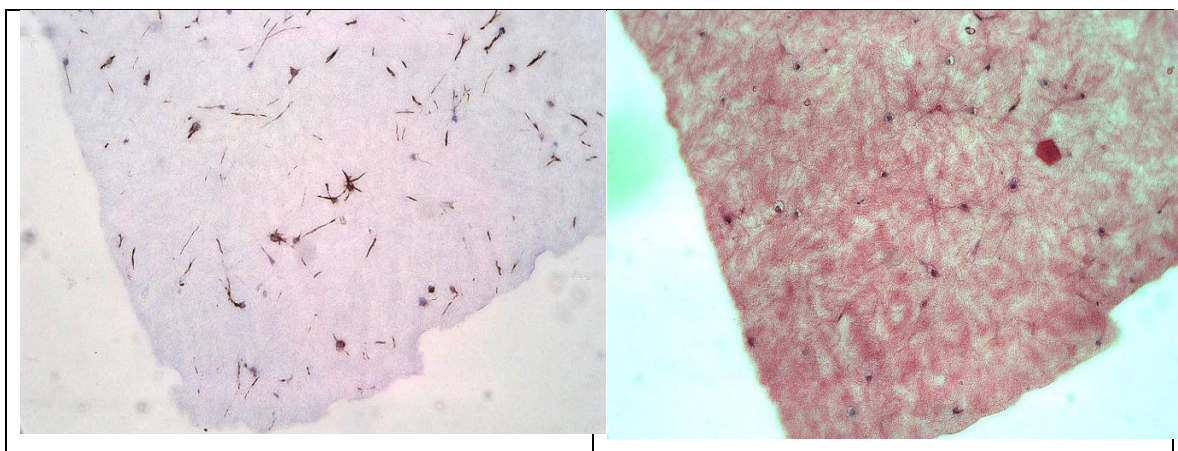


**Figura 4-14:** Tinción con Hematoxilina y Eosina para el equivalente dérmico formado a partir de la coagulación de crioprecipitado de plasma sanguíneo. Días: 2, 7, 11 y 15; Aumento 20 X. Se puede apreciar el incremento en la concentración celular a través del tiempo, así como la morfología característica de los fibroblastos (elongada en los extremos y ahusada en el centro). La tinción muestra una zona basófila (núcleo celular) y una zona eosinófila (citoplasma).

La Figura 4-15 muestra la tinción tricrómico de Masson y de vimentina para los geles de crioprecipitado en el día 15 de cultivo. La tinción con tricrómico de Masson muestra un resultado negativo para la formación de colágeno (Figura 4-15-B). Este resultado es contrario a lo reportado por Franco y Restrepo [97] quienes a partir de células de mucosa humana encuentran abundante formación de fibras de colágeno a los 20 días de cultivo, empleando la Técnica del Tricrómico de Mason. Similarmente, Meana et al. [89] reportan

la formación de colágeno tipo IV en geles de fibrina usando anticuerpos para su detección. Es posible que la concentración celular empleada en el presente trabajo (500,000 células/ml) sea baja para alcanzar una mayor confluencia celular como la reportada por Franco y Restrepo [97] o que la concentración de ácido tranexámico empleada pudiera ser alta y ejerciera citotoxicidad sobre las células. Se recomienda la optimización de la concentración de ácido tranexámico, para determinar la concentración que permita un mejor balance sobre la estabilidad del gel y el crecimiento celular.

Por otro lado la tinción de vimentina (Figura 4-15-A) revela la presencia de esta proteína, la cual es un indicativo de que las células aisladas y proliferadas en los geles de crioprecipitado conservan las características de fibroblastos.



**Figura 4-15:** Tinción para el equivalente dérmico formado a partir de la coagulación de crioprecipitado de plasma sanguíneo en el día 15. A: tinción de vimentina. B: tinción de tricrómico de Mason. Aumento 20 X. Se evidencia que no hay formación de colágeno (B) a pesar de mantenerse el linaje de fibroblastos de las células aisladas (A).

La utilización de plasma y crioprecipitado se convierten en una alternativa para la generación de soportes para el crecimiento celular. En la actualidad, el Comité Internacional de la Cruz Roja ha establecido los protocolos para la identificación de algunos patógenos que pueden causar la transmisión de enfermedades por transfusión (TTDs, *transfusion transmissible diseases*) que incluyen: hepatitis B, hepatitis C, malaria, sífilis así como nuevas TTDs y patógenos como el virus de inmunodeficiencia humana 1/2 (HIV-1/2), virus T-linfotrópico humano (HTLV-1/2), virus del oriente del Nilo y enfermedad de Chagas [200], lo cual permite establecer que el uso de plasma y crioprecipitado no presentaría un

riesgo mayor al que podría existir en una transfusión sanguínea. Adicionalmente, el uso de plasma y crioprecipitado se convierte en una excelente oportunidad para la generación de equivalentes autólogos de fácil obtención [201], lo que reduce la posibilidad de transmisión de virus y aumenta la compatibilidad.

### 4.3 Conclusión

Siguiendo los protocolos establecidos en la literatura, se realizó el aislamiento de fibroblastos humanos a partir de biopsias de niños. Para la evaluación de la proliferación celular de fibroblastos humanos, se realizó la purificación del alginato de sodio, con miras a disminuir la concentración de polifenoles y endotoxinas. El comportamiento reológico del crioprecipitado de plasma mostró un comportamiento Newtoniano con una viscosidad de  $6.47 \pm 0.47$  mPa·s. Mediante ensayos de reología dinámica se encontró que la región viscoelástica lineal (VLR), para ensayos de frecuencia controlada, es 1% de deformación para relaciones volumétricas 10:1 y 20:1 (crioprecipitado a cloruro de calcio al 3% p/v). El tiempo de gelificación se determinó en 20-30 minutos, el cual es apropiado para el atrapamiento de los fibroblastos. Mediante el cultivo de fibroblastos humanos en reactor *spinner* se logró reducir el tiempo de duplicación, comparado con la proliferación en cajas de microtécnica, de  $37.5 \pm 1.28$  h a  $28.43 \pm 2.09$  h. El atrapamiento de fibroblastos en geles de plasma sanguíneo/alginato de calcio se encontró que los geles no son estables en el medio de cultivo, por lo cual los geles se desestabilizan sobre el día 5 de cultivo; no hay proliferación ni mantenimiento de la viabilidad celular con la formación de células picnóticas. El atrapamiento de fibroblastos humanos en geles de crioprecipitado de plasma mostró proliferación de las células durante 15 días, el gel permaneció estable gracias a la adición de ácido tranexámico al 0.5%; sin embargo, no hay formación de redes de colágeno que pueda ser detectada por la tinción de tricrómico de Masson.





# 5. Conclusiones y recomendaciones

## 5.1 Conclusiones

Mezclas de alginato de sodio y plasma sanguíneo humano al 0.2%, 0.4%, 0.8% y al 1.6 % p/v de alginato fueron caracterizadas en su comportamiento reológico (viscometría) y el potencial  $\xi$ . La presencia de alginato incrementó la viscosidad de la mezcla presentando un comportamiento pseudoplástico, acorde a lo planteado en la literatura; adicionalmente, las concentraciones al 0.8% y 1.6% resultaron bastante estables debido a un alto potencial  $\xi$  que garantiza que no se precipitan las proteínas/polisacáridos presentes en las mezclas.

Para la mezcla de plasma/alginato de sodio al 0.8% y 1.6% en alginato, se evaluó la gelificación mediante la aspersion de soluciones de cloruro de calcio al 1%, 2% y 3% p/v. Mediante reología dinámica se determinó la región viscoelástica lineal (VLR) de los geles, la cual se extiende hasta el 1% de deformación. Los barridos de frecuencia entre 0.1 Hz y 10 Hz mostraron que en los geles predomina el comportamiento de sólido sobre el líquido ( $G' > G''$ ). Los geles fabricados con una concentración al 1.6% de alginato mostraron un UTS de  $6.369 \pm 0.243$  kPa. La microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró que las proteínas presentes en el plasma se encuentran en la superficie de las películas obtenidas.

Mediante el empleo de mezclas de alginato de sodio/plasma sanguíneo humano al 1.6% p/v de alginato se establecieron las condiciones para la generación de microesferas con un mayor porcentaje de las mismas con diámetro entre 150  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ : presión del aire 5 psig, flujo de la solución de alginato de sodio 125.6 y altura de la boquilla a la solución de cloruro de calcio 30 cm.

Las micropartículas obtenidas no presentan en su superficie proteínas de reconocimiento para la adhesión celular, por lo cual se hizo necesario recubrirlas con PLL y fibrinógeno.

Las condiciones para cargar los microportadores fueron solución de PLL en concentración 0.1 % p/v durante 10 minutos a 37° C, y la adsorción de fibrinógeno a partir de crioprecipitado en dilución 1:1000 durante 1 hora. El fibrinógeno adsorbido en la superficie del microportador se entrecruza usando trombina en concentración de 0.1U/ml durante 15 minutos. La densidad de los microportadores obtenidos fue de 1.25 g/ml y la citotoxicidad frente al control fue del 98.53%.

La cinética de adhesión celular de fibroblastos murinos de la línea 3T3 sobre microportadores APF se ajustó a una cinética de primer orden, con una constante de tiempo de 0.007 min<sup>-1</sup>. Mediante el cultivo en reactor *spinner* se logró reducir el tiempo de duplicación de 23 h a 16.23 h y 17.65 h, empleando concentraciones de 10,000 microportadores/ml y 20,000 microportadores/ml, respectivamente.

El comportamiento reológico del crioprecipitado de plasma mostró un comportamiento Newtoniano con una viscosidad de 6.47± 0.47 mPa·s. Mediante ensayos de reología dinámica se encontró que la región viscoelástica lineal (VLR), para ensayos de frecuencia controlada, es 1% de deformación para relaciones volumétricas 10:1 y 20:1 (crioprecipitado a cloruro de calcio al 3% p/v). El tiempo de gelificación se determinó en 20-30 minutos, el cual es apropiado para el atrapamiento de los fibroblastos.

Mediante el cultivo de fibroblastos humanos en reactor *spinner* se logró reducir el tiempo de duplicación, comparado con la proliferación en cajas de microtécnica, de 37.5 ± 1.28 h a 28.43 ± 2.09 h.

En el atrapamiento de fibroblastos en geles de plasma sanguíneo/alginato de calcio se encontró que los geles no son estables en el medio de cultivo, por lo cual ellos se desestabilizan sobre el día 7 de cultivo; no hay proliferación ni mantenimiento de la viabilidad celular, con la formación de células picnóticas.

El atrapamiento de fibroblastos humanos en geles de crioprecipitado de plasma mostró proliferación de las células durante 15 días, el gel permaneció estable gracias a la adición de ácido tranexámico al 0.5%, sin formación apreciable de redes de colágeno.

---

## 5.2 Recomendaciones

Realizar la determinación de colágeno en los geles de fibrina empleando técnicas como transcriptasa reversa-reacción en cadena de polimerasa (TR-PCR) o Western Blotting que permitan la determinación en bajas concentraciones.

Evaluar distintas concentraciones de ácido tranexámico en los geles de fibrina.

Generar los microportadores usando equipos de encapsulación donde existan campos eléctricos y mallas vibratorias.

Evaluar en modelos de experimentación animal los microportadores cargados con fibroblastos.

Evaluar el atrapamiento de factores de crecimiento en los geles de plasma-alginato de calcio.

160      Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor  
de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma  
sanguíneo humano y alginato de sodio

---

# Anexo A: Aislamiento de Fibroblastos a partir de muestras de piel humana

## Reactivos

- Buffer PBS o solución salina estéril (0,9% p/v)
- Medio DMEM-F12, Sigma-Aldrich.
- Suero Fetal Bovino, Sigma-Aldrich.
- Solución de colágenasa tipo I (2000 unidades/ml de medio DMEM-F12), Sigma Aldrich.
- Solución Antibiótico/antimicótico 100 X.

## Procedimiento

- Recoger la muestra de piel del paciente, proveniente de una circuncisión y colocarla en solución DMEM-F12 suplementada con antibiótico/antimicótico al 1-3 %
- Trasladar la muestra desde el centro hospitalario hasta el laboratorio.
- Tomar la muestra de piel de paciente y retirar la solución transportadora.
- Sumergir la muestra brevemente (30 – 60 segundos) en una solución de etanol al 70%; descartar el etanol.
- Lavar la muestra del tejido con solución de Hanks suplementada con antibiótico/antimicótico al 1%. Repetir este procedimiento mínimo 3 veces, descartando la solución empleada.
- Desechar el tejido graso o necrotizado mediante el uso de bisturí.

- Disociar mecánicamente la muestra usando tijeras afiladas o una hoja de bisturí en caja de Petri. Cortar la muestra lo más finamente posible (cubos de ~ 1 mm de lado).
- Transferir los cortes a un tubo de cetrífuga de 15 ml.
- Adicionar la enzima colágena diluyéndola 10 veces (concentración final 200 Unidades/ml) usando medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10 %.
- Incubar a 37° C en atmósfera controlada cuya concentración sea: CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%, durante 4 horas. Realizar agitación manual periódicamente cada 15 minutos.
- Recoger el sobrenadante, centrifugar a 500 G X 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino y 1% con antibiótico/antimicótico.
- Realizar conteo celular y transferir a un frasco de cultivo.
- Incubar a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%. Las células obtenidas serán denominadas como el primer pasaje (P1).
- Si se quieren obtener más células, se puede adicionar más colagenasa diluída en medio DMEM-F12, suplementado con suero fetal bovino al 10%, y repetir el procedimiento para el aislamiento de fibroblastos, hasta agotar la muestra de tejido.
  
- Monitorear la proliferación de los fibroblastos hasta su confluencia cambiando el medio de cultivo cada tercer día. Una vez alcanzada la confluencia, la población será subcultivada en proporción 1 a 5 en frascos T. En cada pasaje se determinará la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer; la viabilidad celular se determinará por la prueba de exclusión con azul de tripano

# Anexo B: Tripsinización

## Reactivos:

- Solución de Tripsina/EDTA.
- Preparación de la solución de Tripsina/EDTA.

Disolver en 800 ml de agua:

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	g
Glucosa	0.2	g

Añadir:

Tripsina	0.5	g
EDTA	0.2	g
Rojo fenol 0.5%	250	ul

- Ajustar el pH a 7.4 mediante la adición de hidróxido de sodio 0.1 N o ácido clorhídrico 0.1 N.
- Llevar a un volumen de 1 litro en balón aforado.
- Filtrar usando filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Procedimiento para la tripsinización.**

- Una vez las células han alcanzado una confluencia cercana al 80% se debe realizar la tripsinización.
- Retirar el medio de cultivo.
- Lavar con solución de Hanks empleando el mismo volumen empleado para el cultivo celular.
- Retirar la solución de Hanks.
- Adicionar solución de Tripsina/EDTA en un volumen igual al mismo empleado en el cultivo celular.
- Incubar a 37°C hasta que se despeguen las células (entre 2 y 5 minutos), si se desea se puede golpear el frasco (con mesura) para ayudar a desprender las células del frasco de cultivo.
- Una vez las células se han despegado (vista al microscopio de contraste de fases), añadir la misma cantidad de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero humano al 10% para neutralizar la acción de la T/E.
- Pasar las células a un tubo cónico para centrifuga.
- Centrifugar a 500 g X 10 minutos.
- Resuspender el pellet en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y pasarlo a frasco de cultivo.

# Anexo C: Tinción con azul de tripano

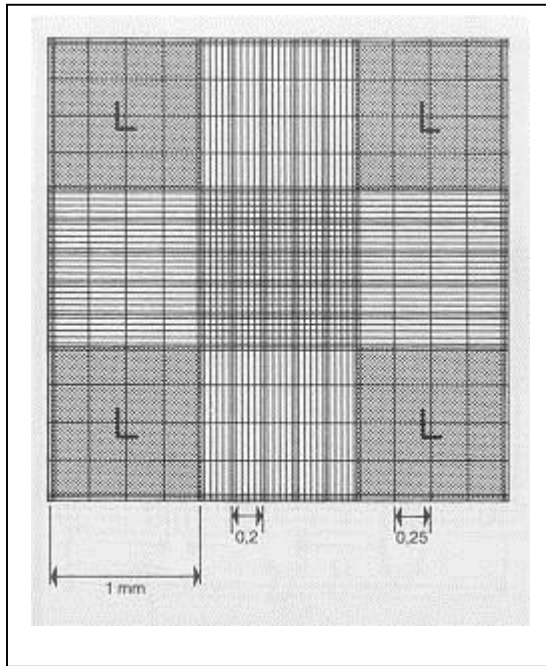
## Reactivos.

Azul de tripano al 0.4%.

Medio de cultivo.

## Procedimiento.

- Si las células se encuentran en monocapa, tripsinizar las células siguiendo el protocolo presentado en el Anexo B, dejando las células suspendidas en medio de cultivo. Se debe buscar que la concentración celular aproximada sea de  $1 \times 10^6$  células/ml.
- Si las células se encuentran en microportadores o en un equivalente, desintegrarlo mediante el uso de tripsina/EDTA por 2 o 3 horas hasta lograr tenerlas en suspensión en medio de cultivo. Se debe buscar que la concentración celular aproximada sea de  $1 \times 10^6$  células/ml.
- En un tubo para microcentrífuga colocar 20  $\mu$ l de la suspensión celular y adicionar 20  $\mu$ l de la solución de Azul de Tripano.
- Agitar y dejar en contacto por 5-15 minutos.
- Limpie la superficie de la cámara de Neubauer con alcohol al 70% con un paño suave.
- Deje evaporar el alcohol en el ambiente.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- Tomar 20  $\mu$ l de esta suspensión y colocarlos en la cámara de Neubauer de tal manera que se distribuyan en la cámara por capilaridad.
- Ubicar en microscopio invertido en el objetivo 10X la cámara de Neubauer.
- Realizar conteo celular en una de las zonas marcadas (L). Si se quiere se puede realizar conteo en las cuatro zonas y promediar. Las células refringentes son células viables; las células azules son células muertas.



La concentración celular está dada por:  $C = n * \text{dilución} * 10^4 \text{ células/ml}$ .

# Anexo D: Criopreservación de las células

## Reactivos

DMSO (di-metil sulfóxido, evaluado en células)

Medio de cultivo DMEM-F12

Suero fetal bovino.

## Procedimiento

- Crecer células suficientes para la criopreservación. Una vez se han cultivado las células en Frasco T-75, se tripsinizan siguiendo el protocolo presentando en el Anexo B.
- Resuspender en un volumen que garantice una concentración celular cercana entre  $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  células viables/ml. El medio en el cual se resuspenden es medio DMEM-F12 suplementado al 10% v/v con dimetilsulfóxido (el cual actúa como agente crioprotector) y 10% de suero fetal bovino.
- Colocar los crioviales en hielo, ubicarlos en el recipiente para la congelación de células y almacenarlo en un refrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.
- Transcurrido este tiempo, pasar el criovial a un tanque con nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).



# Anexo E: Determinación de proteína por Bradford

El intervalo de detección de proteína es 0.2-20  $\mu\text{g}$  de proteína.

## Reactivos.

Agente para tinción: Disolver 100 mg de azul de Comassie G en una mezcla de 100 ml de ácido fosfórico al 85% y 50 ml de de etanol al 95% y llevarlo a 1 litro con agua fría. Guardarlo en frasco ámbar.

Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) : Concentración 0,1 mg/ ml.

## Curva de Calibración.

En 6 tubos de ensayo adicionar cada uno de los siguientes volúmenes:

	Volumen adicionado ( $\mu\text{l}$ )					
Solución patrón	0	50	100	150	200	250
Agua	500	450	400	350	300	250

Adicionar a cada tubo 1000  $\mu\text{l}$  de solución de Bradford y esperar 5 minutos.

Leer absorbancia a 595 nm.

Construir la gráfica de absorbancia vs concentración de albúmina de suero bovino.

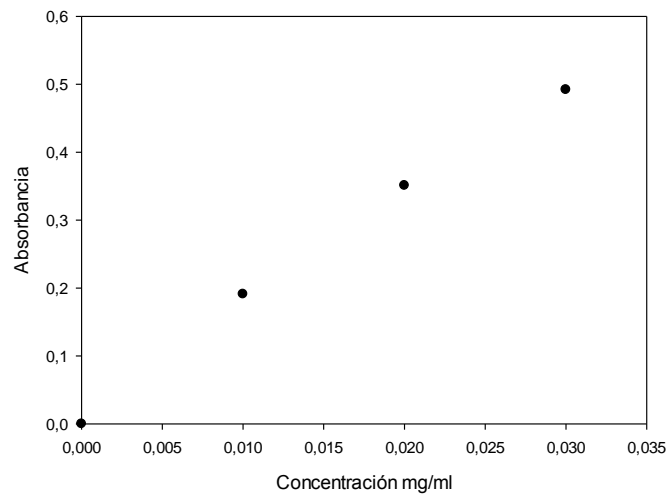
## Lectura de las muestras

Tomar 500  $\mu\text{l}$  de la muestra a la cual se le quiere determinar la proteína.

Adicionar a cada tubo 1000  $\mu\text{L}$  de solución de Bradford y esperar 5 minutos.

Leer absorbancia a 595 nm.

Mediante el uso de la curva de calibración, leer la concentración de proteína presente en la muestra.



# Anexo F: Protocolo para la cuantificación celular mediante MTT

## Reactivos

Solución de MTT: 4 mg/ml preparado en solución de PBS-1X y esterilizado con membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## Procedimiento.

- Retirar el medio de cultivo de los pozos de una caja de 24 pozos.
- Lavar con solución de PBS las células adheridas a la caja de microtécnica.
- Adicionar 400  $\mu\text{l}$  del medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico/antimicótico al 1% y 100  $\mu\text{l}$  de reactivo MTT.
- Dejar en incubadora a 37 °C con control de CO<sub>2</sub> durante 3 horas.
- Retirar el MTT.
- Lavar con 500  $\mu\text{l}$  de solución de Hank's.
- Adicionar 1 ml de DMSO (di-metil sulfóxido).
- Esperar 5 minutos para completar la extracción del formazán.
- Leer absorbancia en espectrofotómetro



## Bibliografía

- [1] M. Berrocal, E. Mendoza y A. Gómez, «Análisis estadístico de pacientes con quemaduras, asistidos en la consulta de urgencias del Hospital Universitario de Cartagena (Colombia).», *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, vol. 24, n° 4, pp. 403-407, 1998.
- [2] Secretaria Distrital de Salud, Donación y trasplante de órganos y tejidos. Alcaldía Mayor de Bogotá., Bogotá: Secretaría Distrital de Salud, 2009..
- [3] M. Ehrenreich y A. Ruszczak, «Update on tissue-engineered biological dressings,» *Tissue Engineering*, vol. 12, n° 9, pp. 2407-2424, 2006.
- [4] S. Baker, M. Stacey y M. Singh, «Etiology of chronic leg ulcers,» *Eur J Vasc Surg*, vol. 6, pp. 245-251, 1992.
- [5] M. Concha y A. S. C. Vidal, «Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloides,» *Cuad. Cir.* , vol. 16, pp. 21-47, 2002.
- [6] B. Seal, T. Otero y A. Panitch, «Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration,» *Materials Science and Engineering*, vol. 34, pp. 147-230, 2001.
- [7] D. Velásquez, C. Pineda, M. Cardona, N. Gómez, G. Gartz, I. Usuga, D. Tróchez y C. Londoño, «Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis: oportunidades en el medio antioqueño,» *Revista Ingeniería Biomédica*, vol. 2, n° 3, pp. 1-7, 2008.
- [8] A. López, «Hospital San Vicente de Paul.» [En línea]. Available: [www.elhospital.org.co](http://www.elhospital.org.co). [Último acceso: 1 octubre 2009].
- [9] M. Ellis, M. Jarman-Smith y J. Chaudhuri, «Bioreactor systems for tissue engineering a four-dimensional challenge.,» de *Bioreactors for Tissue Engineering* , Netherlands, Springer, 2005.
- [10] J. Alvarez-Barreto y V. Sikavitsas, «Tissue Engineering Bioreactors.,» de *Tissue Engineering*, New York, Taylor y Francis, 2007..
- [11] I. Martin, D. Wendt y M. Heberer, «The role of bioreactors in tissue engineering,» *Trends in Biotechnology*, vol. 22, n° 2, 2004..
- [12] S. Bottcher-Haberzeth, T. Biedemann y E. Reichmann, «Tissue Engineering of skin,» *Burns*, vol. 36, pp. 450-460, 2010.

- [13] P. Hebda, «Wound healing of the skin,» de *Essential Tissue Healing of the Face and Neck*, Shelton, BC Decker Inc, 2009, pp. 1-15.
- [14] V. Falanga y K. Faria, «Bioengineered skin constructs,» de *Principles of Tissue Engineering*, 3 ed ed., Amsterdam, Elsevier, 2007.
- [15] D. Supp y S. Boyce, «Bioengineering of human skin substitutes,» de *Tissue Engineering*, New York, Taylor and Francis, 2007.
- [16] F. Geneser, «Histología. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.,» 2007..
- [17] G. Cooper, *The Cell: A molecular approach*, Washington: ASM Press, 1997.
- [18] U. Welsch, *Histología*, Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008.
- [19] J. Ahlfors y K. Billiar, «Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodeled matrix.,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2183-2191, 2007.
- [20] L. Villalba y E. Bilevich, *Consenso sobre cicatrización de heridas*, Buenos Aires: Sociedad Argentina de Dermatología, 2008.
- [21] F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer y K. Schenke-Layland, «Skin tissue engineering-in vivo and in vitro applications,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 128, pp. 352-366, 2011.
- [22] S. MacNeil, «Biomaterials for tissue engineering of skin,» *Materials Today*, vol. 11, n° 5, pp. 26-35, 2008.
- [23] C. Peniche y W. Arguelles-Monal, *Ingeniería de Tejidos aplicada a la sustitución y regeneración de piel*, La Habana: Editorial Universitaria, 2009.
- [24] K. Ghosh y R. Clark, «Wound repair,» de *Principles of Tissue Engineering*, Amsterdam, Academic Press, 2007, pp. 1149-1165.
- [25] F. Wood, «Tissue Engineering of skin,» de *Principles of Regenerative Medicine*, Amsterdam, Academic Press, 2011, pp. 1063-1078.
- [26] R. Kamel, J. Ong, E. Eriksson, P. P.E. y E. Caterson, «Tissue Engineering of Skin,» *Journal of American College of Surgeons*, vol. 217, n° 3, pp. 533-555, 2013.
- [27] F. O'Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,» *Materials Today*, vol. 14, n° 3, pp. 88-95, 2011.
- [28] G. Falke y A. Atala, «Reconstrucción de tejidos y órganos usando ingeniería tisular.,» *Arch. Argen. Pediatr*, vol. 98, n° 2, pp. 103-115, 2000..
- [29] M. Tenenhaus y H. Rennekampff, «Surgical advances in burn and reconstructive plastic surgery: new and emerging technologies,» *Clin Plastic Surg*, vol. 39, pp. 435-443, 2012.

- [30] L. Korkina, V. Kostyuk y L. Guerra, «Biohydrogels for the In Vitro Reconstruction and In Situ Regeneration of Human Skin,» de *Hydrogels: Biological properties and applications*, Milan, Springer Verlag, 2009, pp. 97-110.
- [31] S. Warren, K. Fong, R. Nacamuli, H. Song, T. Fang y M. Longaker, «Biomatériaux de réparation de la peau et de l'os en chirurgie plastique,» *EMC-Chirurgie*, vol. 1, pp. 583-591, 2004.
- [32] M. Shoichet, R. Li, M. White y S. Winn, «Stability of hydrogels used in cell encapsulation: an in vitro comparison of alginate and agarose,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 50, pp. 374-381, 1996.
- [33] M. Saltzman y T. Kyriakides, «Cell interactions with polymers,» de *Tissue Engineering*, 2007..
- [34] A. Hokugo, T. Takamoto y Y. Tabata, «Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber,» *Biomaterials*, vol. 27, pp. 61-67, 2006..
- [35] D. Yoon y J. Fischer, «Polymeric scaffolds for tissue engineering applications,» de *Tissue Engineering*, New York, Taylor and Francis, 2007..
- [36] J. Pachence, M. Bohrer y J. Kohn, de *Principles of Tissue Engineering*, Amsterdam, Elsevier, 2007..
- [37] I. Sukmana, «Bioactive polymer scaffold for fabrication of vascularized engineering tissue,» *J Artif Organs*, vol. 15, pp. 215-224, 2012.
- [38] D. Olsen, C. Yang, M. Bodo, R. Chang, S. Leigh, J. Baez, D. Carmichael, Perala, M, E. Hamalainen, M. Jarvinen y J. Polarek, «Recombinant collagen and gelatin for drug delivery,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 44, pp. 1547-1567, 2003.
- [39] A. Mazlyzam, B. Aminuddin, L. Saim y B. Ruszymah, «Human serum is an advantageous supplement for human dermal fibroblast expansion: clinical implications for tissue engineering of skin,» *Archives of Medical Research*, vol. 39, pp. 743-752, 2008.
- [40] P. Johnson, A. Mikos, J. Fisher y J. Jansen, «Strategic directions in tissue engineering,» *Tissue Engineering*, vol. 13, n° 12, pp. 2827-2837, 2007.
- [41] J. Schaller, S. Gerber, U. Kampf, S. Lejon y C. Trachsel, *Human blood plasma proteins: structure and function*, John Wiley and Sons, 2008..
- [42] M. Rampling, «Compositional Properties of blood,» de *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, Amsterdam, IOS Press,, 2007.
- [43] F. Moure, M. Rendueles y M. Diaz, «Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography,» *Meat Science*, vol. 64, pp. 391-398, 2003.
- [44] O. K. Baskurt, *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, IOS Press, 2007..

- [45] D. Rawn, *Bioquímica Tomo I*, Madrid: McGraw-Hill, 1989., p. 532.
- [46] K. Standeven, R. Ariens y P. Grant, «The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function,» *Blood Reviews*, vol. 19, pp. 275-288, 2005.
- [47] D. Eyrich, F. Brandl, B. Appel, H. Wiese, G. Maier, M. Wenzel, R. Staudenmaier, A. Goepferich y T. Blunk, «Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 55-65, 2007..
- [48] B. Blombacn y N. Bark, «Fibrinopeptides and fibrin gel structure,» *Biophysical chemistry*, vol. 112, pp. 147-151, 2004.
- [49] R. Doolittle, «Fibrinogen and fibrin,» *Annu Rev Biochem*, vol. 53, pp. 195-229, 1984.
- [50] E. Grassl y R. Tranquillo, «Fibrillar fibrin gels,» de *Scaffolding in Tissue Engineering*, Boca Ratón, Taylor & Francis, 2006, p. 638.
- [51] A. M. Lauricella, «Variabilidad de las redes de fibrina,» *Acta Bioquim Clin Latinoam*, vol. 41, n° 1, pp. 7-19, 2007..
- [52] D. Minors, «Hamostasis, blood platelets and coagulation,» *Blood*, vol. 8, n° 5, pp. 214-216, 2007.
- [53] V. Johari y C. Loke, «Brief overview of the coagulation cascade,» *Dis Mon*, vol. 58, pp. 421-423, 2012.
- [54] J. Páramo, E. Panizo, C. Pegenaute y R. Lecumberri, «Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia,» *Rev Med Univ Navarra*, vol. 53, n° 1, pp. 19-23, 2009.
- [55] R. Gómez Baute, T. Guerra Alonso, L. Dita Salabert, J. Fernández y M. Cabrera Zamora, «Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares,» *Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*, vol. 9, n° 2, pp. 65-74, 2011.
- [56] R. Broomhead y S. Mallett, «Clinical aspects of coagulation,» *Anaesthesia and intensive care medicine*, vol. 11, n° 5, pp. 195-199, 2010.
- [57] S. Llames, M. Del Rio, F. Larcher, E. García, M. García, M. Escamez, J. Jorcano, P. Holguín y A. Meana, «Human plasma as termal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin,» *Transplantation*, vol. 77, n° 3, pp. 350-355, 2004..
- [58] F. Arvelo, P. Pérez y C. Cotte, «Obtención de laminas de piel humana mediante Ingeniería de Tejidos,» *Acta Científica Venezolana*, vol. 55, pp. 74-82, 2004..
- [59] J. Iriarte, Obtención de un constructo tridimensional tisular como equivalente dérmico para terapéutica alternativa dermatológica, Bogotá: Universidad nacional de Colombia: Tesis Especialización en dermatología, 2007.

- [60] J. Demol, J. Eyckmans, S. Roberts, F. Luyten y H. Van Oosterwyck, «Does tranexamic acid stabilised fibrin support the osteogenic differentiation of human periosteum derived cells?,» *European Cells and materials*, vol. 21, pp. 272-285, 2011.
- [61] S. Rowe, «Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels,» *Acta Biomaterialia*, vol. 3, pp. 59-67., 2007..
- [62] C. Cornelissen, M. Dietrich, S. Kruger, J. Spillner, T. Schmitz-Rode y J. Jockenhoevel, «Fibrin gel as alternative scaffold for respiratory tissue engineering,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, n° 3, pp. 679-687, 2011.
- [63] T. Tanaka, «Gels,» *Sci. Am.*, vol. 244, pp. 124-138, 1981..
- [64] A. Hoffman, «Hydrogels for biomedical applications,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 43, pp. 3-12, 2002.
- [65] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi y F. Alhaique, «Polysaccharide hydrogels for modified release formulations,» *Journal of Controlled Release*, vol. 119, pp. 5-24, 2007..
- [66] F. Brandl, F. Sommer y A. Goepferich, «Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 134-146, 2007.
- [67] H. Zhao, L. Ma, J. Zhou, Z. Mao, C. Gao y J. Shen, «Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma,» *Biomed. Mater.*, vol. 3, p. 015001, 2008.
- [68] A. Haisch, A. Loch, J. David, A. Prub, R. Hansen y M. Sittinger, «Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering,» *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 38, pp. 686-689, 2000.
- [69] C. Buchta, H. Hedrich, M. Macher, P. Hocker y P. Redl, «Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by Cryoseal and vivostat in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel,» *Biomaterials*, vol. 26, pp. 6233-6241, 2005.
- [70] W. Spotnitz, «Fibrin sealant: past, present and future: a brief review,» *World J Surg*, vol. 34, pp. 632-634, 2010.
- [71] G. Marx, «Evolution of fibrin glue applications,» *Transfusion Medicine Review*, vol. 17, n° 4, pp. 287-298, 2003.
- [72] W. Yang, B. Wu, S. Asakura, I. Kohno y M. Matsuda, «Soluble fibrin augments spreading of fibroblasts by providing RGD sequences of fibrinogen in soluble fibrin,» *Thrombosis Research*, vol. 114, pp. 293-300, 2004.

- [73] E. D, «Fibrin for Tissue Engineering of cartilage,» 2006. [En línea]. Available: [http://epub.uni-regensburg.de/10444/1/Diss-Final\\_web\\_pass.pdf](http://epub.uni-regensburg.de/10444/1/Diss-Final_web_pass.pdf). [Último acceso: 12 2011].
- [74] C. Acevedo, D. Brown, M. Young y J. Reyes, «Senescent cultures of human dermal fibroblasts modified phenotype when immobilized in fibrin polymer,» *Journal of Biomaterials Science*, vol. 20, pp. 1929-1942, 2009.
- [75] H. Bak, A. Afoke, A. McLeod, R. Brown, P. Shamlou y P. Dunnill, «The impact of rheology of human fibronectin-fibrinogen solutions on fibre extrusion for tissue engineering,» *Chemical Engineering Sciences*, vol. 57, pp. 913-920, 2002..
- [76] N. Huang, J. Chu, J. Randall y L. Song, «Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression,» *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 3947-3956, 2010.
- [77] P. Vavken, S. Joshi y M. Murray, «Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis,» *The Knee*, vol. 18, pp. 42-46, 2011.
- [78] H. Zhao, L. Ma, Y. G. C. Gong y J. Shen, «A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation,» *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 20, pp. 135-143, 2009.
- [79] G. Bhakta, K. Lee, R. Magalhaes, F. Wen, S. Siam, D. Hutmacher y L. Kuleshova, «Cryoreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification.,» *Biomaterials*, vol. 30, pp. 336-343, 2009.
- [80] A. Shikanov, M. Xu, T. Woodruff y L. Shea, «Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro follicle development.,» *Biomaterials*, vol. 30, pp. 5476-5485, 2009.
- [81] B. Sayyar, M. Dodd, J. Wen, S. Ma, L. Marquez-Curtis, A. Janowska-Wieczorek y G. Hortelano, «Encapsulation of factor IX-engineered mesenchymal stem cells in fibrinogen-alginate microcapsules enhances their viability and transgene secretion,» *Journal of Tissue Engineering*, vol. 2, nº 1, pp. 1-12, 2012.
- [82] H. Zhou y H. Xu, «The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 32, nº 30, pp. 7503-7513, 2011.
- [83] M. Xu, X. Wang, Y. Yan, R. Yao y Y. Ge, «An cell-assembly derived physiological 3D model of the metabolic syndrome, based on adipose-derived stromal cells and a gelatin/alginate/fibrinogen matrix,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 3668-3877, 2010.

- [84] E. Doncel, M. Darder, E. Martín, L. Vásquez, M. Nieto y M. Ruíz, «Gelation under dynamic conditions: a strategy for in vitro cell ordering,» *J Mater Sci Mater Med*, vol. 17, pp. 795-802, 2006.
- [85] T. Aper, O. Teebken, G. Steinhoff y A. Haverich, «Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model,» *J Vasc Endovasc Surg*, vol. 28, pp. 296-302, 2004.
- [86] A. Ionescu, M. Alaminos, J. Cardona, J. García-López, M. González, R. Ghinea, A. Campos, E. Hita y M. Pérez, «Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties,» *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 4, pp. 1963-1973, 2011.
- [87] Y. Shachaf, M. Gonen-Wadmany y D. Seliktar, «The biocompatibility of Pluronic F 127 fibrinogen-based hydrogels,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 2836-2847, 2010.
- [88] M. Pandima, M. Sekar, M. Chamundeswari, A. Moorthy, G. Krithiga, N. Selva y T. Sastry, «A novel wound dressing material-fibrin-chitosan-sodium alginate composite sheet,» *Bull. Mater. Sci.*, vol. 35, n° 7, pp. 1157-1163, 2012.
- [89] A. Meana, J. Iglesias, M. Del Río, F. Larcher, B. Madrigal y M. Fresno, «Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels,» *Burns*, vol. 24, n° 7, pp. 621-630, 1998..
- [90] R. Horch, H. Bannasch y G. Stark, «Cultured human keratinocytes as a single cell suspension in fibrin glue combined with preserved dermal grafts enhanced recontitution in athymic mice full-thickness wounds,» *Eur J Plast Surg*, vol. 22, pp. 237-243, 1999.
- [91] J. Kopp, M. Jeschke, A. Bach, U. Knese y R. Horch, «Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix,» *Cell and Tissue Banking*, vol. 5, pp. 89-96, 2004..
- [92] H. Bannasch, T. Unterberg, M. Fohn, B. Weyand, R. Horch y B. Stark, «Cultured keratinocytes in fibrin with decellularised dermis close porcine full-thickness wounds in a single step,» *Burns*, vol. 34, pp. 1015-1021, 2008.
- [93] C. Acevedo, R. Somoza, C. Weinstein-Oppenheimer, D. Brown y M. Young, «Growth factor production from fibrin-encapsulated human keratinocytes,» *Biotechnol Lett*, vol. 32, pp. 1011-1017, 2010.
- [94] A. Mazlyzam, D. Aminuddin, N. Fuzina, M. Norhayati, O. Fauziah, M. Isa, L. Saim y Ruszymah., «Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold,» *Burns*, vol. 33, pp. 355-363, 2007.

- 
- [95] C. Weinstein-Oppenheimer, A. Aceituno, D. Brown, C. Acevedo, R. Ceriani, M. Fuentes, F. Albornoz, C. Henríquez-Roldán, P. Morales, C. Maclean, S. Tapia y M. Young, «The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing,» *Journal of Translational Medicine*, vol. 8, n° 59, pp. 1-11, 2010.
- [96] M. Arango, C. Chamorro, L. Restrepo, L. Correa y J. Henao, «Características histológicas de piel cultivada in vitro,» *Rev Argent Dermatol*, vol. 90, pp. 190-200, 2009.
- [97] L. Franco y L. Restrepo, «Producción y aplicación de equivalentes epiteliales autólogos para la recuperación de un defecto de fisura palatina en un paciente,» *Revista Nacional de Odontología*, vol. 8, n° 14, pp. 17-23, 2012.
- [98] Zetameter, «Zetametria en 5 minutos,» 2009.. [En línea]. Available: <http://www.zeta-meter.com>. [Último acceso: 1 Octubre 2009].
- [99] E. Parente, M. Crudele, M. Aquino y F. Clemente, «Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM 576 in batch fermentation.,» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, pp. 3-4., 1998..
- [100] P. Eiselt, J. Yeh, R. Latvala, L. Shea y D. Mooney, «Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels,» *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1921-1927, 2000.
- [101] L. Shapiro y S. Cohen, «Novel alginate sponges for cell culture and transplantation,» *Biomaterials*, vol. 18, pp. 583-590, 1997.
- [102] N. Hunt y L. Grover, «Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine,» *Biotechnol Lett*, vol. 32, pp. 733-742, 2010..
- [103] G. Grant, E. Morris, D. Rees, P. Smith y D. Thom, «Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model,» *Febs Letters*, vol. 32, n° 1, pp. 195-198, 1973.
- [104] S. Mazzitelli, G. Luca, F. Mancuso, M. Calvitti, R. Calafiore, C. Nastruzzi, S. Johnson y S. Badylak, «Production and characterization of engineered alginate-based microparticles containing ECM powder for cell/Tissue engineering applications,» *Acta Biomaterialia*, vol. 7, pp. 1050-1062, 2011.
- [105] A. Rokstad, B. O-L, B. Steinkjer, L. Ryan, K. G, S.-B. G. Strand B, L. I, E. T y M. T, «Alginate microbeads are complement compatible, in contrast to polycation containing microcapsules, as revealed in a human whole blood model,» *Acta Biomaterialia*, vol. 7, pp. 2566-2578, 2011.
- [106] M. Panouillé y V. Larreta-Garde, «Gelation behaviour of gelatin and alginate mixtures,» *Food Hydrocolloids*, vol. 23, pp. 1074-1080, 2009.

- [107] M. Moresi, M. Bruno y E. Parente, «Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests,» *Journal of Food Engineering*, vol. 64, pp. 179-186, 2004.
- [108] M. Moresi, M. Mancini, M. Bruno y R. Rancini, «Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic gels,» *Journal of Texture Studies*, vol. 32, pp. 375-396, 2001.
- [109] X. Liu, L. S. T. Qian y Z. Tong, «Rheology characterization of sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release,» *Polymers*, vol. 44, pp. 407-412, 2003.
- [110] G. Orive, S. Tam, J. Pedraz y J. Hallé, «Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy,» *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3691-3700, 2006.
- [111] H. Uludag, P. De vos y P. Tresco, «Technology of mammalian cell encapsulation,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 42, pp. 29-64, 2000.
- [112] Cosmo Bio Co, «Como Bio Co: Inspiration for life Science,» Cosmo Bio Co Ltd, [En línea]. Available: [http://www.cosmobio.co.jp/index\\_e.asp](http://www.cosmobio.co.jp/index_e.asp). [Último acceso: 1 Agosto 2013].
- [113] J. Sun y H. Tan, «Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications,» *Materials*, vol. 6, pp. 1285-1309, 2013.
- [114] N. Hunt y L. Grover, «Encapsulation and culture of mammalian cells including corneal cells in alginate hydrogels,» de *Corneal Regenerative Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, New York, Humana Press, 2013, p. 230.
- [115] K. Lee y D. Mooney, «Alginate: Properties and biomedical applications,» *Progress in Polymer Science*, vol. 37, pp. 106-126, 2012.
- [116] N. Hunt, R. Shelton y L. Grover, «Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels,» *Biomaterials*, vol. 30, pp. 6435-6443, 2009.
- [117] M. Pokrywcznska, T. Drewa, A. Jundzill y J. Lysik, «Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells,» *Transplantation Proceedings*, vol. 40, pp. 1664-1667, 2008.
- [118] P. De Vos, B. De Haan y R. Van Schilfgaarde, «Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules,» *Biomaterials*, vol. 18, n° 3, pp. 273-278, 1997.
- [119] F. Klock, H. Frank, R. Houben, T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, M. Wohrle, K. Federlin y U. Zimmermann, «Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation,» *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 40, pp. 638-643, 1994.

- [120] X. Huang, X. Zhang, X. Wang, C. Wang y B. Tang, «Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 114, nº 1, pp. 1-8, 2012.
- [121] J.-H. Kim y J.-Y. Yoon, «Protein adsorption on polymer particles,» de *Encyclopedia of surface and colloid Science*, New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 4373-4381.
- [122] M. Martins, S. Sousa y J. Antunes, «Protein Adsorption Characterization,» de *Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols*, New York, Springer Science+Business Media, 2012, p. 319.
- [123] M. Okubo y H. Hattori, «Competitive adsorption of fibrinogen and albumin onto polymer microspheres having hydrophilic/hydrophobic heterogeneous surface structures,» *Colloid & Polymer Science*, vol. 271, pp. 1157-1164, 1993.
- [124] F. Lim y A. Sun, «Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas,» *Science*, vol. 210, nº 21, pp. 908-910, 1980.
- [125] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, P. Soon-Shiong y Skjak-Braek, «Alginate polycation microcapsules,» *Biomaterials*, vol. 17, pp. 1031-1040, 1996.
- [126] H. A. Barnes, *An introduction to Rheology*, Elsevier, 1993..
- [127] C. Macosko, *Rheology: principles, measurements and applications.*, New York: Wiley-VCH, 1994..
- [128] M. Kiremitci, M. Ozilgen y E. Piskin, «Attachment and growth kinetics of anchorage-dependent BHK cells on microcarriers,» *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, pp. 830-836, 1989.
- [129] K. Shivakumar, R. Nair, A. Jayakrishnan, B. Chithambara y C. Kartha, «Synthetic hydrogel microspheres as substrata for cell adhesion and growth,» *In vitro cellular & developmental biology*, vol. 25, nº 4, pp. 353-357, 1989.
- [130] R. I. Freshney, *Culture of animal cells: A manual of basic technique.*, 4 ed ed., New York: Wiley-Liss, 2000..
- [131] J. Malda y C. Frondoza, «Microcarriers in the bioengineering of cartilage and bone,» *Trends in Biotechnology*, vol. 24, nº 7, 2006..
- [132] S. Kim, S. Gwak, C. Yong y B. Kim, «Skin regeneration using keratinocytes and dermal fibroblasts cultured on biodegradable microspherical polymer scaffolds,» *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, vol. 75 B????, pp. 369-377, 2005.
- [133] M. Lafrance y D. Armstrong, «Novel living skin replacement biotherapy approach for wounded skin tissues,» *Tissue Engineering*, vol. 5, nº 2, pp. 153-170, 1999.

- [134] O. Rogovaya, A. Vasiliev, I. Kiselev y V. Terskikh, «Use of human fibroblasts grown on microcarriers for formation of connective tissue engineering,» *Russian Journal of developmental Biology*, vol. 35, n° 2, pp. 76-79, 2004.
- [135] X. Chen, C. Liu, C. Liu, X. Meng, C. Lee y H. Park, «Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 27, pp. 269-274, 2006.
- [136] Y. Bayram, M. Deveci, N. Imirzalioglu, Y. Soysal y M. Sengezer, «The cell based dressing with living allogenic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study.,» *British Journal of Plastic Surgery*, vol. 58, pp. 988-996, 2005.
- [137] V. Nehls y D. Drenckhahn, «A novel microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis,» *Microvascular research*, vol. 50, pp. 311-322, 1995.
- [138] T. Rajangam, H. Paik y S. An, «Development of fibrinogen microspheres as a biodegradable carrier for tissue engineering,» *BioChip J.*, vol. 5, n° 2, pp. 175-183, 2011.
- [139] C. Wang, Y. Gong, Y. Lin, J. Shen y D. Wang, «A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery,» *Acta Biomaterialia*, vol. 4, pp. 1226-1234, 2008..
- [140] R. Gorodetsky, R. Clark, J. An, J. Gailit, L. Levdansky, A. Vexder, E. Berman y G. Marx, «Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing,» *The Journal of investigative dermatology*, vol. 112, n° 6, pp. 866-872, 1999..
- [141] K. Wissemann y B. Jacobson, «Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells,» *In vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 21, n° 7, pp. 391-401, 1985.
- [142] Y. Kwon y C. Peng, «Calcium-alginate gel bead cross-linked with gelatin as microcarrier for anchorage-dependent cell culture,» *BioTechniques*, vol. 33, pp. 212-218, 2002.
- [143] P. Grohn, G. Klock y Z. U., «Collagen-coated Ba<sup>2+</sup>- alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells,» *BioTechniques*, vol. 22, pp. 970-975, 1997.
- [144] H. Blanch y D. Clark, *Biochemical Engineering.*, New York: Marcel Dekker, 1996..
- [145] M. Shuler y F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic concepts*, London: Prentice Hall, 1992.
- [146] D. Wendt, S. Riboldi, M. Cioffi y I. Martin, «Bioreactors in Tissue Engineering: Scientific Challenges and Clinical Perspectives,» *Adv. Biochem Engin/Biotechnol*, vol. 112, pp. 1-27, 2009.

- [147] R. Freshney, B. Obradovic, W. Grayson, C. Cannizzaro y Vunjak-Novakovic., «Principles of Tissue Culture and bioreactor design,» de *Principles of Tissue Engineering*, Amsterdam, Elsevier, 2007..
- [148] S. Oh, A. Chen, Y. Mok, X. Chen, U. Lim, A. Chin, A. Choo y S. Reuveny, «Long-term microcarriers suspension cultures of human embryonic stem cells,» *Stem Cell Research*, vol. 2, pp. 219-230, 2009.
- [149] C. Palmiero, G. Imparato, F. Urciuolo y P. Netti, «Engineered dermal equivalent tissue in vitro by assembly on microtissue precursors,» *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 2548-2553, 2010.
- [150] P. Sommar, S. Petterson, C. Ness, H. Johnson, G. Kratz y J. J., «Engineering three-dimensional cartilage- and bone- like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatine microcarriers,» *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, vol. 63, pp. 1036-1046, 2010.
- [151] K. E. Sapsford y F. S. Ligler, «Real-Time analysis of protein absorption to a variety of thin films,» *Biosensor and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 1045-1055, 2004.
- [152] F. Moure, M. Rendueles y M. Diaz, «Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography,» *Meat Science*, vol. 64, pp. 391-398, 2003.
- [153] J. Schaller, S. Gerber, U. Kampfer, S. Lejon y C. Trachsel, Human blood plasma proteins: structure and function, West Sussex: Jhon Wiley and Sons, 2008..
- [154] M. Mancini, M. Moresi y F. Sappino, «Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates,» *Journal of Food Engineering*, vol. 28, pp. 283-295, 1995.
- [155] Y. Yang, O. Campanella, M. Hamaker, G. Zhang y Z. Gu, «Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations,» *Food Hydrocolloids*, vol. 30, n° 1, pp. 26-32, 2013.
- [156] M. Mancini, M. Moresi y F. Sappino, «Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates,» *Journal of Food Engineering*, vol. 28, pp. 283-295, 1995.
- [157] A. Blandino, M. Macías y D. Cantero, «Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 88, n° 6, pp. 686-689, 1999.
- [158] H. Winter y F. Chambon, «Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point,» *Journal of Rheology*, vol. 30, n° 2, pp. 367-382, 1986.

- [159] F. Chambon y H. Winter, «Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry,» *Journal of Rheology*, vol. 31, n° 8, pp. 683-697, 1987.
- [160] W. Saltzman, *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of replacement organs and tissues*, Oxford: Oxford University Press, 2004.
- [161] M. Linnes, B. Ratner y C. Giachelli, «A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 5298-5306, 2007.
- [162] M. Wang, G. Pins y F. Silver, «Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride,» *Materials Science and Engineering*, vol. C3, pp. 131-135, 1995.
- [163] I. Constantinides, S. Grant, S. Celper, I. Gauffin-Holmberg, K. Agering, J. Oca-Cossio, J. Buid, J. Flint, C. Hamaty, N. Simpson y S. Blackband, «Non-invasive evaluation of alginate/poly-L-lysine/alginate microcapsules by magnetic resonance microscopy,» *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2438-2445, 2007.
- [164] X. Sun, Y. Zhang, W. Tan, Y. Zhou y P. Hua, «Attachment kinetics of vero cells onto CT-3 microcarriers,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 90, n° 1, pp. 32-36, 2000.
- [165] C. Ouwerx, N. Velings, M. Mestdagh y M. Axelos, «Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations,» *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, pp. 393-408, 1998.
- [166] M. Saville y V. Brown, «Clinical aspects of coagulation,» *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, vol. 8, n° 6, pp. 234-238, 2007.
- [167] A. Berges, *Guía para el uso clínico de sangre*, Ciudad de México: Secretaría de Salud Mexicana, 2007.
- [168] E. Santos, G. Orive, A. Calvo, R. Catena, P. Fernández-Robredo, A. García Layana, R. Hernández y J. Pedraz, «Optimization of 100 um alginate-poly-L-lysine-alginate capsules for intravitreal administration,» *Journal of Controlled Release*, vol. 158, pp. 443-450, 2012.
- [169] E. Chan, T. Lim, P. Ravindra, R. Mansa y A. Islam, «The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method,» *Journal of Food Engineering*, vol. 108, pp. 297-303, 2012.
- [170] H. Moghadam, M. Samimi, A. Samimi y M. Khorram, «Electro-spray of high viscous liquids for producing mono-sized spherical alginate beads,» *Particuology*, vol. 6, pp. 271-275, 2008.
- [171] S. Wee y W. Gombotz, «Protein release from alginate matrices,» *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 31, n° 3, pp. 267-285, 1998.
- [172] J. Tu, S. Bolla, J. Barr, J. Miedema, X. Li y B. Basti, «Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug

loading and release characterization,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 303, pp. 171-181, 2005..

- [173] A. Bratek-Skicki, P. Zeliszewska y Z. Adamczyk, «Tuning conformations of fibrinogen monolayers on latex particles by pH of adsorption,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 103, pp. 482-488, 2013.
- [174] P. Lima, S. Pereira, R. Rabello, E. Rodríguez-Castellón, M. Beppu, P. Chevallier, D. Mantovani y R. Vieira, «Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and k-carrageenan films,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 111, pp. 719-725, 2013.
- [175] M. Holmberg y X. Hou, «Fibrinogen adsorption on blocked surface of albumin,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 84, pp. 71-75, 2011.
- [176] N. Biezunski, E. Shafrir, A. De Vries y E. Katchalski, «The action of polylysine on the conversion of fibrinogen into fibrin by coagulase thrombin,» *Biochem J.*, vol. 59, n° 1, pp. 55-58, 1955.
- [177] A. Ramos, Generación de microportadores basados en mezclas de alginato de sodio y fibrinógeno, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia: Tesis de Maestría en Ingeniería Química, 2014.
- [178] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein y T. Kissel, «In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis,» *Biomaterials*, vol. 24, pp. 1121-1131, 2003.
- [179] B. Phillips, R. Meng, T. Tan, W. Rust y J. Crook, «Efficient expansion of clinical-grade human fibroblasts on microcarriers: cells suitable for ex vivo expansion of clinical-grade hESCs,» *Journal of Biotechnology*, vol. 134, pp. 79-87, 2008.
- [180] W. Comisar, D. Mooney y J. Linderman, «Integrin organization: linking adhesion ligand nanopatterns with altered cell responses,» *Journal of Theoretical Biology*, vol. 274, pp. 120-130, 2011.
- [181] D. Worth y M. Parsons, «Review adhesion dynamics: mechanisms and measurements,» *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40, pp. 2397-2409, 2008.
- [182] M. Régenta, E. Planusa, A. Bouina, D. Bouvarda, M. Brunnera, E. Fauroberta, A. Millon-Frémillona, M. Blocka y C. Albiges-Rizoa, «Specificities of 1 integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength,» *European Journal of Cell Biology*, vol. 90, pp. 261-269, 2011.
- [183] C. Yan, J. Sun y J. Ding, «Critical areas of cell adhesion on micropatterned surfaces,» *Biomaterials*, vol. 32, pp. 3931-3938, 2011.
- [184] C. Lopez-Pena y D. McClements, «Optimizing delivery systems for cationic biopolymers: competitive interactions of cationic polylysine with

- anionic k-carrageenan and pectin,» *Food Chemistry*, vol. 153, pp. 9-14, 2014.
- [185] G. Bluml, «Microcarrier Cell Culture Technology,» de *Methods in Biotechnology, Vol 2: Animal Cell Biotechnology*, Totowa, Humana Press Inc, 2007, pp. 149-178.
- [186] S. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Ménard, J. Hallé y L. Yahia, «Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation,» *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1296-1305, 2006.
- [187] G. Langlois, J. Dusseault, S. Bilodeau, S. K. Tam, D. Magassouba y J. Hallé, «Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules,» *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 3433-3440, 2009.
- [188] G. Orive, S. Ponce, R. Hernández, A. Gascón, M. Igartua y J. Pedraz, «Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates,» *Biomaterials*, vol. 23, pp. 3825-3831, 2002.
- [189] G. Klock, A. Pfeffermann, C. Ryser, P. Grohn, B. Kuttler, H. Hahn y U. Zimmermann, «Biocompatibility of manuronic acid-rich alginates,» *Biomaterials*, vol. 18, nº 10, pp. 707-713, 1997.
- [190] M. Brust, C. Schaefer, R. Doerr, L. Pan, M. García, P. Arratia y C. Wagner, «Rheology of human blood plasma: viscoelastic versus newtonian behavior,» *Physical Review Letters*, vol. 110, pp. 1-5, 2013.
- [191] J. Gailit, C. Clarke, D. Newman, M. Tonnesen, M. Mosesson y R. Clark, «Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through intefrin avB3,» *Experimental Cell Research*, vol. 232, pp. 118-126, 1997.
- [192] R. Gorodetsky, L. Levdansky, E. Gaberman, O. Gurevitch, E. Lubzens y W. McBride, «Fibrin microbeads loaded with mesenchymal cells support their long-term survival while sealed at room temperature,» *Tissue Engineering: Part C*, vol. 17, nº 7, pp. 745-755, 2011.
- [193] S. Bohari, D. Hukins y L. Grover, «Effect of calcium alginate concentration on viability and proliferation of encapsulated fibroblasts,» *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 21, pp. 159-170, 2011.
- [194] K. Ma, A. Titan, M. Stafford, C. Zheng y M. Levenston, «Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 3754-3764, 2012.
- [195] D. Greening, K. Glenister, R. Sparrow y R. Simpson, «International blood collection and storage: clinical use of blood products,» *Journal of proteomics*, vol. 73, pp. 386-395, 2010.

- [196] N. Hunt, A. Smith, U. Gbureck, R. Shelton y L. Grover, «Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation,» *Acta Biomaterialia*, vol. 6, nº 9, pp. 3649-3656, 2010.
- [197] W. Furst, A. Banerjee y H. Redl, «Comparison of structure, strength and cytocompatibility of a fibrin matrix supplemented either with tranexamic acid or aprotinin,» *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 82, nº 1, pp. 109-114, 2007.
- [198] E. Cholewinski, M. Dietrich, T. Flanagan, T. Schmitz-Rode y S. Jockenhoevel, «Tranexamic acid- an alternative to aprotinin in fibrin-based cardiovascular tissue engineering,» *Tissue Engineering: Part A*, vol. 15, pp. 1-11, 2009.
- [199] J. Pohl y E. Christophers, «Growth characteristics of skin fibroblasts and 3T3 cells entrapped by polymerizing fibrin,» *In vitro*, vol. 15, nº 8, pp. 624-630, 1979.
- [200] D. Greening, K. Glenister, R. Sparrow y R. Simpson, «International blood collection and storage: clinical use of blood products,» *Journal of proteomics*, vol. 73, pp. 386-395, 2010..
- [201] P. De la Puente y D. Ludeña, «Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering,» *Experimental Cell Research*, vol. 322, pp. 1-11, 2014.