

Tesis Doctoral

Caracterización de un sustituto de piel humana a base de dermis porcina

Pazos, Adriana Alejandra

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pazos, Adriana Alejandra. (2004). Caracterización de un sustituto de piel humana a base de dermis porcina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3752_Pazos

Cita tipo Chicago:

Pazos, Adriana Alejandra. "Caracterización de un sustituto de piel humana a base de dermis porcina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3752_Pazos

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

***“CARACTERIZACIÓN DE UN
SUSTITUTO DE PIEL HUMANA,
A BASE DE DERMIS PORCINA”***

Trabajo de Tesis para optar por el Título de Doctor

Departamento de Química Biológica

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de Buenos Aires

Autor: Lic. Adriana Alejandra Pazos

Directores: Dr. Claudia Beatriz González

Dr. Graciela Garbossa

ÁREA QUÍMICA BIOLÓGICA

INTA – UBA – IByME

1 3752

2004

CARACTERIZACIÓN DE UN SUSTITUTO DE PIEL HUMANA A BASE DE DERMIS PORCINA

Las lesiones cutáneas que abarcan una gran superficie de la piel, requieren el recubrimiento inmediato de la zona afectada para reducir riesgos de sepsis y facilitar la regeneración tisular. Entre los múltiples procedimientos terapéuticos aplicados en el tratamiento de estas lesiones, los injertos de piel proveen un medio adecuado y seguro para la regeneración tisular.

En esta tesis se estudió un *sustituto de piel humana a base de dermis porcina* utilizado para ese fin terapéutico, el cual es sometido para su comercialización a un tratamiento industrial que incluye liofilización. El objetivo de la tesis, consistió en la caracterización de este producto comercial, su comparación con la dermis fresca original, y la descripción de ciertos aspectos de su actividad biológica.

El análisis consistió en desarrollar la metodología adecuada para el aislamiento y cuantificación de los componentes de importancia biológica. Estos fueron los colágenos del tipo I y III, las proteínas fibronectina y laminina, y los proteoglicanos de ácido hialurónico, keratán sulfato, dermatán sulfato y condroitín sulfatos A y C. Los resultados de esta etapa sugieren que el tratamiento industrial aplicado para su comercialización, no los modificó de manera importante, ya que no hubo alteraciones cuali-cuantitativas relevantes. Además, el análisis de su actividad biológica en un “modelo de cultivo *in vitro*” de fibroblastos humanos, mostró que la dermis induce un aumento de la proliferación celular, un incremento de la síntesis de ADN y el consecuente acortamiento del ciclo celular. Por lo tanto, este sustituto dérmico puede considerarse una excelente herramienta para el tratamiento de pacientes con heridas cutáneas extensas.

Palabras claves: sustituto dérmico, dermis porcina, glicosaminoglicanos, colágeno, laminina, fibronectina, cultivo de fibroblastos.

CHARACTERIZATION OF A HUMAN SKIN SUBSTITUTE FROM PORCINE DERMIS

Extended skin damage requires immediate covering of the wounded area in order to avoid sepsis and to facilitate tissue regeneration. There are multiple approaches to treat these injuries, however skin graft is one of the most suitable and safe measures to accomplish this issue.

In the present thesis, it was examined a human skin substitute based on porcine dermis used for this kind of treatments, which was previously submitted to an industrial treatment that includes dried-freeze . The objective of this thesis was, characterization of the product, later comparison to the original fresh tissue, and description of certain aspects of its biological activity.

The analysis was focused on the development of an appropriate methodology to isolate and quantify those components considered of biological interest. These compounds were collagen types I and III, fibronectin, laminin, and hyaluronic acid, keratan sulphate, dermatan sulphate, and chondroitin sulphates A and C- containing proteoglycans. The results of this step suggest that the industrial treatment applied to the dermis for marketing purposes did not modify greatly the product , since there were no relevant qualitative and quantitative alterations. Besides, the biological activity analysis performed in an "*in vitro* culture model" of human fibroblasts showed that the dermis induces an increment of cellular proliferation and DNA synthesis, and a consequent shorten of cell cycle. Therefore, the studied dermal substitute could be considered as an excellent tool for the treatment of patients with extended skin injuries.

Key words: skin substitute, porcine dermis, glycosaminoglycans, collagen, laminin, fibronectin, fibroblasts culture.

A mis Padres

A mi Querido Leí (y nuestro fruto)

A la Memoria de mis Abuelos

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero agradecer a *Claudia*; por conducirme en mis primeros pasos por la investigación, por ser la primera persona que confió en mí para emprender este camino, por su perseverancia, su tiempo y sus contribuciones, y por creer en mi trabajo.

Agradezco a *Fabián* e *Isabel*, por el empuje y la presencia; a *Pili* por su sensibilidad y a *Nico* por su pasión, dos parámetros que me dieron el ánimo para concluir con este estudio.

Le agradezco muy profundamente a *Graciela*; por dirigirme en la segunda parte de esta tesis, por enseñarme el mundo del cultivo celular; por su apoyo incondicional y su ayuda desinteresada, por su espíritu crítico, su dedicación y su paciencia, por su docencia magistral y por su afecto, y sobre todo gracias por acompañarme a lograr este esfuerzo.

Agradezco a *Silvina* y a *Valeria*; por la compañía dentro y fuera del INTA, por la contención, por el cariño y el apoyo, y por aquellos tiempos compartidos.

Particularmente quiero agradecer a *Jorge* por su asistencia en la primera parte de esta tesis, por sus indicaciones pertinentes, por sus instrucciones precisas. También a *Viviana* y a *Celia* por su colaboración generosa y sus compañías necesarias en ese aislado subsuelo del IByME; a *Pata* y a *Pato* por su cooperación con las técnicas inmunológicas; a *J.C. Calvo*, por su contribución con diversos reactivos y a toda la gente del *IByME* que de alguna manera me asistió y ayudó con este trabajo.

Agradezco muy afectuosamente a *Alcira Nesse* por aceptarme en su laboratorio, ofrecerme su colaboración y permitirme desarrollar el trabajo de cultivo celular, y también a su grupo: *Dany*, *Nico*, *Gladys*, por la compañía y ayuda absolutas. Y gracias a todos los integrantes de Análisis Biológicos, por el tiempo compartido y sobre todo por hacerme sentir parte del grupo, *Beatriz*, *Cali*, *Ana María*, *Irene*, *Laura Schinus*, *Ana H.*, *Mercedes*, *Valeria*, *Miriam*. También agradezco a *Eduardo* y su gente, por sus aportes de ciclo celular y de reactivos y por su ayuda con el WinMDI; y especialmente a *Julieta* por sus protocolos optimizados y a *Caty* por el programa del WinMDI.

No quiero dejar de agradecer a *Laboratorios Genoma S.A.* por la provisión de las pieles utilizadas para esta tesis, así como también la colaboración prestada por sus profesionales. Además agradecer a los responsables de los laboratorios del Centro de Estudios Médicos e Investigaciones Clínicas (*CEMIC*), por la donación de las células humanas empleadas en los ensayos biológicos.

Quiero reconocer también el trabajo realizado por la Secretaría de Química Biológica, pues gracias a la ayuda de *Liliana* y su grupo, los tramites se desarrollaron en tiempo y forma.

Por otro lado aprecio la cooperación ofrecida por *Laura Pardo* y todo el grupo del Servicio de Citometría de Fundaleu, por su desinteresada colaboración y su valioso tiempo cedido.

Finalmente agradezco al *Dr. J. Casa* por su presencia y por su necesaria insistencia en la terminación de esta tesis; y a *Norma*, por su disposición para la finalización de esta labor.

También agradezco a todos mis *compañeros* de trabajo del INTA, particularmente a *Marina, Ana, Andrea y Ceci*, que con su apoyo, compañía y palabras de aliento contribuyeron a la culminación de esta gran tarea; y gracias a *Adry* y *Luli*, que corrieron tanto como yo para que los ejemplares salieran.

Naturalmente, quiero agradecer al *INTA* en general y al *ITA* en particular; por permitirme ingresar en el mundo de la investigación, por otorgarme un lugar de trabajo, y por hacerme participar en la aplicación directa de la ciencia.

A todos, *Muchas Gracias!!!*

*Aquél que obtiene una victoria sobre otro hombre es fuerte,
pero quien obtiene una victoria sobre sí mismo es poderoso.*

Leo-tse

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
LA PIEL	4
<i>Histogénesis</i>	4
1. <i>Tejido Epitelial</i>	5
2. <i>Tejido Conectivo</i>	6
2.1. <i>Matriz Extracelular</i>	7
2.1.a. <i>Proteoglicanos</i>	8
2.1.b. <i>Proteínas Fibrosas</i>	12
<i>Fibras de colágeno</i>	12
<i>Fibras reticulares</i>	13
<i>Fibras elásticas</i>	14
2.1.c. <i>Glicoproteínas de Adhesión</i>	14
2.2. <i>Células</i>	15
ESTRUCTURA DE LA PIEL	18
<i>Epidermis</i>	18
<i>Dermis</i>	19
<i>Membrana basal</i>	19
<i>Epidermopoyesis</i>	21
<i>Proliferación y diferenciación de Queratinocitos</i>	21
LESIONES CUTÁNEAS	22
<i>Lesiones cutáneas por quemaduras</i>	22
FISIOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN	23
1. <i>Etapas de Cicatrización</i>	23
1.1. <i>Fase catabólica o exudativa</i>	23
1.2. <i>Fase anabólica o proliferativa</i>	25
1.3. <i>Fase reparativa</i>	25
1.4. <i>Fase de contracción</i>	26
2. <i>Etapas de Epitelización</i>	26
2.1. <i>Migración de los queratinocitos</i>	26
2.2. <i>Mitosis de los queratinocitos</i>	26
2.3. <i>Maduración de las nuevas células epiteliales</i>	26
TRATAMIENTO DE LAS LESIONES PRODUCIDAS POR QUEMADURAS	27
1. <i>Cuidado de las heridas</i>	27
2. <i>Transplante de Piel</i>	28
2.1. <i>Injertos de piel</i>	28

2.2. Expansión de tejido	29
2.3. Sustitutos de Piel	29

OBJETIVOS 33

OBJETIVOS GENERALES	33
OBJETIVOS GENERALES	33

CAPITULO I: MATERIALES Y MÉTODOS 34

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA	34
MATERIALES	35
Dermis Porcina	35
Reactivos	35
METODOLOGÍA	36
ESQUEMA DE TRABAJO Y DENOMINACIÓN DE LAS DISTINTAS ETAPAS	36
Etapa 1. Caracterización de las Dermis a Partir del Contenido de sus Componentes Mayoritarios	36
a. Determinación del Porcentaje de Humedad	37
b. Determinación de la Concentración de Proteínas Totales	37
c. Determinación de la Concentración de Colágeno Total	37
Etapa 2. Preparación de extractos homogéneos y Aislamiento de los Componentes de Importancia Biológica de las Dermis	38
Etapa 3. Identificación y Cuantificación de Colágenos Tipo I y III en las Fracciones Correspondientes	41
a. Identificación de Colágenos Tipo I y III Mediante la Técnica de Inmunoblot	41
b. Determinación Cuantitativa de Colágenos Tipo I y III Mediante el método de ELISA	42
Etapa 4. Identificación y Cuantificación de las Proteínas (FN y LN) en las Fracciones Correspondientes.	43
a. FN	44
a.1. Identificación de FN Mediante la Técnica de Inmunoblot	44

a.2. Determinación Cuantitativa de FN Mediante el Método de ELISA	44
b. LN	45
b.1. Identificación de LN Mediante la Técnica de Inmunoblot	45
b.2. Determinación Cuantitativa de LN Mediante el Método de ELISA	46
Etapa 5. Identificación y cuantificación de los GAGs en las Fracciones Correspondientes	46
a. Determinación Cuantitativa de los GAGs Totales en las Fracciones Correspondientes	46
a.1. Determinación Cuantitativa de AH en las Fracciones Correspondientes.	46
a.2. Determinación Cuantitativa de HS, CSA, CSC y DS en las Fracciones F6, T6	46
a.3. Determinación Cuantitativa de KS en las fracciones F6 y T6	47

CAPITULO I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA 49

Etapa 1. Caracterización de las Dermis a Partir del Contenido de los Componentes Mayoritarios	49
a. Determinación del Porcentaje de Humedad	49
b. Determinación de la Concentración de Proteínas Totales	49
c. Determinación de la Concentración de Colágeno Total	50
Conclusiones Etapa 1	50
Etapa 2. Preparación de Extractos Homogéneos y Aislamiento de los Componentes de Importancia Biológica de las Dermis.	50
Conclusiones Etapa 2	57
Etapa 3. Identificación y Cuantificación de Colágenos Tipo I y III en las Fracciones Correspondientes	57
a. Identificación de Colágenos Tipo I y III Mediante la Técnica de Inmunoblot	57
b. Determinación Cuantitativa de Colágenos Tipo I y III mediante el Método de ELISA	59
Conclusiones Etapa 3	60
Etapa 4. Identificación y Cuantificación de las Proteínas (FN y LN) en	

<i>las Fracciones Correspondientes.</i>	61
a. FN	61
a.1. <i>Identificación de FN Mediante la Técnica de Inmunoblot</i>	61
a.2. <i>Determinación Cuantitativa de FN Mediante el Método de ELISA</i>	62
b. LN	63
b.1. <i>Identificación de LN Mediante la Técnica de Inmunoblot</i>	63
b.2. <i>Determinación Cuantitativa de LN Mediante el Método de ELISA</i>	63
<i>Conclusiones de la Etapa 4</i>	64
<i>Etapa 5. Identificación y cuantificación de los GAGs en las Fracciones Correspondientes</i>	65
a. <i>Determinación Cuantitativa de los GAGs Totales en las Fracciones Correspondiente</i>	65
a.1. <i>Determinación Cuantitativa de AH en las Fracciones Correspondientes.</i>	66
a.2. <i>Determinación Cuantitativa de HS, CSA, CSC y DS en las Fracciones F6, T6</i>	67
a.3. <i>Determinación Cuantitativa de KS en las fracciones F6 y T6</i>	69
<i>Resultados Generales de la Etapa 5</i>	70
<i>Conclusiones de la Etapa 5.</i>	71
<i>Resultados Generales del Capítulo I</i>	72

CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS 78

1. OPTIMIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE DE CULTIVO	80
1.1. Soluciones, Medios y Reactivos	80
1.2. Condiciones de Esterilidad y Bioseguridad	81
1.3. Células	81
1.3.1. Mantenimiento	84
1.3.2. Recuento y viabilidad celular	84
1.3.3. Concentración Óptima de Suero Fetal Bovino	84
1.3.4. Optimización del Número de Células	85
2. BIOENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA DERMIS PORCINA Y/O SUS COMPONENTES SOBRE UN MODELO DE CULTIVO IN VITRO DE FIBROBLASTOS HUMANOS	85
2.1. Morfología Celular	85

2.2.	<i>Proliferación Celular</i>	86
2.3.	<i>Acción de los GAGs</i>	86
2.4.	<i>Migración Celular</i>	87
2.5.	<i>Adhesión Celular</i>	87
2.6.	<i>Ciclo Celular</i>	88
 <u>TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</u>		90
 <u>CAPITULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>		91
1.	OPTIMIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE DE CULTIVO	91
1.1.	<i>Características morfológicas generales del cultivo primario de fibroblastos</i>	91
1.2.	<i>Concentración Óptima de Suero Fetal Bovino</i>	92
1.3.	<i>Optimización de la Densidad Celular</i>	94
2.	EVALUACIÓN DE ALGUNOS ASPECTOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA	96
2.1.	<i>Efecto de la Dermis Sobre la Morfología Celular</i>	96
2.2.	<i>Proliferación Celular</i>	99
2.3.	<i>Efecto de los GAGs Mayoritarios de la Dermis Liofilizada Sobre el Cultivo Celular</i>	101
2.4.	<i>Migración Celular</i>	105
2.5.	<i>Optimización de las condiciones de arresto celular</i>	106
2.6.	<i>Duración del Ciclo Celular de Fibroblastos</i>	107
 <u>CONCLUSIÓN</u>		115
 <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>		116

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las lesiones que resultan en un extenso daño de la piel, necesitan inmediato recubrimiento de la zona agredida, a fin de permitir la reparación y regeneración tisular, restaurando así la normal función de la misma (Manimalha Balasubramani et al., 2001). Dado que en este tipo de lesiones es dificultoso contar con suficiente superficie sana para ser utilizada como auto-injerto, las investigaciones en este área se han orientado al desarrollo de materiales alternativos obtenidos mediante ingeniería tisular, para proteger las heridas y permitir su regeneración (Gallico, 1990). En este sentido, la industria de los sustitutos de piel ofrece una fuente apreciable de terapias de avanzada para el tratamiento de las heridas cutáneas, tanto crónicas como agudas (Harding et al., 2002).

Los pacientes con lesiones agudas tales como quemaduras graves y anomalías cutáneas congénitas que requieren injertos de piel, en general no sufren trastornos de cicatrización. Sin embargo el mayor inconveniente es que el alto porcentaje de superficie corporal involucrada no deja suficiente cantidad de piel sana para ser utilizada como zona dadora para cubrir las heridas (Boyce, 2001). Las heridas crónicas tales como úlceras venosas, diabéticas y por presión, si bien de menor superficie, requieren también de este tipo de tratamientos para lograr rápidos y mejores resultados.

Tanto las heridas como las complicaciones derivadas de ellas representan un gasto considerable de los recursos destinados a la salud. En Argentina, los costos del tratamiento de los pacientes quemados, tanto en la fase aguda como en la correspondiente a las secuelas, son elevadísimos; y obviamente los más afectados son los grupos sociales más desposeídos (Waisman, 2002). Estos costos están constituidos no sólo por gastos directos de hospitalización, atención ambulatoria y rehabilitación, sino por gastos indirectos como la pérdida de productividad.

El objetivo fundamental de los sustitutos de piel es el de restablecer la anatomía y fisiología de la piel dañada y la consecuente curación de las heridas. Por ende, una mayor accesibilidad a estos sustitutos proporcionaría una serie de ventajas por sobre la terapia convencional, como por ejemplo: la necesidad de contar con una menor superficie de zona dadora de piel, un menor número de procedimientos quirúrgicos, y la consecuente disminución del tiempo de hospitalización, de la morbimortalidad, y de los gastos que ello involucra (Boyce, 2001).

Establecida la importancia que tienen estos sustitutos de piel para el tratamiento de las lesiones descriptas, se plantea en esta tesis la caracterización de un sustituto de piel humana para ser utilizado en el tratamiento de lesiones cutáneas de importancia, y la descripción del modo de acción de sus componentes activos, a fin de ponderar su actividad biológica.

El análisis cuali-cuantitativo de la composición de estos sustitutos de piel, así como el ensayo de su efectividad biológica requieren establecer estándares de uniformidad.

Este conocimiento permitirá avanzar en la comprensión de la fisiología de los procesos de reepitelización y cicatrización y brindará la posibilidad de mejorar la velocidad y calidad de la restitución epitelial.

LA PIEL

La piel es el órgano que recubre la superficie externa del organismo en su totalidad. En el adulto, su superficie se aproxima a los dos metros cuadrados, su peso es de alrededor de tres kilos y su espesor varía entre los 0,5 mm y los 4 mm, según la zona de cobertura. Es también, la primera línea de defensa del organismo contra la infección y la deshidratación, a la vez que un importante órgano sensorial. Por el hecho de estar considerablemente expuesta al medio ambiente, es susceptible de sufrir trastornos tales como engrosamientos, erupciones, alteraciones del color, formación de quistes, quemaduras, heridas, infecciones u otros desórdenes (Fallabella *et al.*, 1990).

Por su estructura la piel se compone de dos capas, la externa o *epidermis*, formada por tejido epitelial, y la subyacente o *dermis* formada por tejido conectivo. Ambas forman una masa compacta que descansa sobre una capa de tejido conectivo más laxo (llamada hipodermis) también denominada tejido celular subcutáneo o grasa subcutánea (Fallabella *et al.*, 1990; Geneser, 2000 d).

Histogénesis

A través del desarrollo embrionario, un único huevo fertilizado (cigoto) da lugar a un organismo multicelular constituido por al menos 200 tipos celulares diferentes, ordenados en una distribución espacial precisa correspondiente a los tejidos. La transición desde el cigoto inicial hasta un organismo maduro involucra una combinación de divisiones celulares –para aumentar el número de células– y diferenciación –para generar nuevos tipos de células–. Las divisiones sucesivas del huevo fertilizado conducen a la formación de un cúmulo de células llamado blástula, la cual se invagina en un proceso denominado gastrulación a partir del cual se establecen las tres capas germinativas del organismo, ectodermo, mesodermo y endodermo (Watt, 1992). En estas capas, las células continúan el proceso de división y diferenciación; de esta manera surgen los tejidos los cuales, posteriormente, se agrupan para formar los órganos y los sistemas. La histogénesis estudia la formación de los tejidos, es decir, el desarrollo de células no diferenciadas de una capa germinativa hasta células diferenciadas de un tejido. De acuerdo a esto último se describen cuatro tipos fundamentales de tejido: epitelial, conectivo, muscular y nervioso. (Geneser, 2000 a)

Dado que los constituyentes principales de la piel son el tejido *epitelial* y *conectivo*, solamente éstos serán descritos a continuación.

1. Tejido Epitelial

La porción epitelial de la piel (epidermis) deriva del ectodermo. Este tejido cubre o reviste todas las superficies corporales, ya sean externas o internas. Generalizando, toda sustancia que ingrese o egrese del organismo debe atravesar, necesariamente, una capa de epitelio. Este tejido descansa siempre sobre una capa de tejido conectivo muy vascularizado, el cual actúa como soporte estructural y fisiológico del mismo, aportando nutrientes a través de los capilares. Ambos tejidos están separados entre sí por una capa extracelular de sostén denominada membrana basal. (Geneser, 2000 b).

El epitelio es un tejido compuesto por células adyacentes sin sustancia intercelular que las separe, las células epiteliales están unidas fuertemente entre sí, dejando espacios intercelulares muy estrechos. En la superficie lateral existen uniones intercelulares funcional y morfológicamente distintas. La unión hermética o *zonula occludens* se encuentra localizada en la zona más apical y actúa como barrera de permeabilidad. Por debajo de ella y a lo largo de la membrana lateral, los *desmosomas* permiten la transmisión intercelular de fuerzas mecánicas. Otro tipo de unión, ampliamente distribuida en los tejidos y que involucra la comunicación intercelular, consiste de *uniones espaciadas* que permiten el pasaje de iones y moléculas pequeñas ($PM < 800$ Da). Las uniones herméticas y los *desmosomas* se encuentran principalmente en el epitelio al igual que los *hemidesmosomas* los cuales median contactos entre células y matriz extracelular (Toner y McCornick, 1992; Geneser, 2000b).

La *zonula occludens* está conformada por un número variable de filamentos paralelos de proteínas globulares intermembrana que están en contacto directo (lado a lado) con estructuras similares en la membrana de la célula adyacente. La denominación *zonula* se debe a que esta zona de fusión de las membranas se distribuye como un cinturón alrededor de la célula. (Cormack, 1988)

El desmosoma es un complejo de contacto constituido por dos placas densas, cada una de ellas situada en el citoplasma de células contiguas, y enfrentadas entre sí. Estas placas están ancladas al citoesqueleto a través de tonofilamentos de queratina. Además, existen glucoproteínas transmembrana –pertenecientes a la familia de las cadhaerinas– las cuales por su dominio citoplasmático se fijan a la placa y, por su dominio extracelular, a los correspondientes dominios extracelulares de las glucoproteínas de la membrana celular opuesta (Geneser, 2000 b).

Entre las principales funciones del tejido epitelial cabe mencionar su comportamiento como cubierta protectora ya que resguarda las superficies libres contra el daño mecánico, la entrada de microorganismos y la pérdida de agua por evaporación. Sobre las superficies internas, en la mayoría de los casos su función es de absorción o de secreción, pero en algunos sitios sólo actúa como barrera.

Otra función destacable es su capacidad de contractilidad la cual depende de la ubicación del tejido. Por otra parte, las terminaciones nerviosas le confieren la facultad de comportarse como órgano sensorial del tacto.

Los epitelios varían mucho en su conformación de acuerdo a las diversas funciones que deben cumplir. Se los clasifica según la cantidad de capas celulares y la forma de las células de la capa superficial; por ejemplo, si posee dos o más capas, se lo denomina *estratificado*. En el caso del *epitelio plano estratificado* las células más cercanas a la membrana basal son cúbicas, luego le siguen células poliédricas irregulares y las más cercanas a la superficie se achatan hasta hacerse planas.

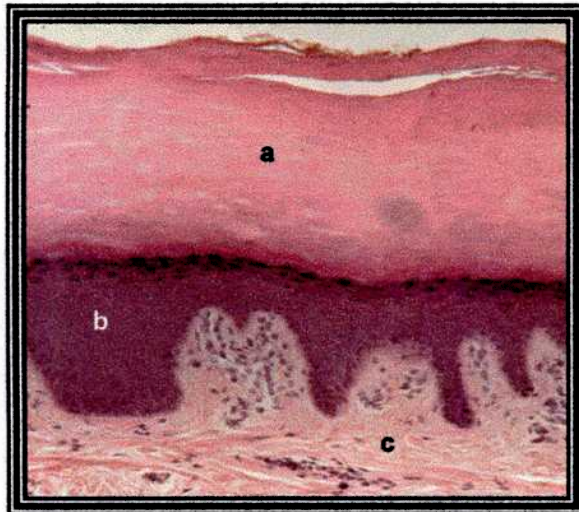


Figura 1:

Epitelio Plano Estratificado Queratinizado de la piel gruesa

a: capa de queratina

b: epidermis

c: papilas dérmicas

Tomada de Geneser, 2000

El epitelio protector más importante es el que forma la epidermis y se lo llama *epitelio plano estratificado queratinizado*, en el cual las células más superficiales se transforman en una capa inerte de queratina, muy resistente (Figura 1). La queratina tiene varias funciones; dado que es virtualmente impermeable, evita la evaporación de las células subyacentes a la vez que impide que el cuerpo se embeba de agua durante el baño. Por otro lado, debido a su alta resistencia, protege a las células epiteliales subyacentes del desgaste (Cormack, 1988).

2. Tejido Conectivo

El tejido conectivo, derivado del mesodermo, es también denominado tejido de sostén, dado que representa el "esqueleto" que sostiene otros tejidos y órganos. Es responsable de amortiguar, soportar y mantener la forma dentro del cuerpo, incluyendo cartílagos, huesos, tendones y ligamentos (Figura 2).

Este tejido contiene *células fundamentales* (fibroblastos y células reticulares), *células residentes* (adipocitos) y *en migración* (células cebadas, macrófagos y otros leucocitos). También se caracteriza por contener sustancias extracelulares, en su mayor parte secretadas por los fibroblastos.

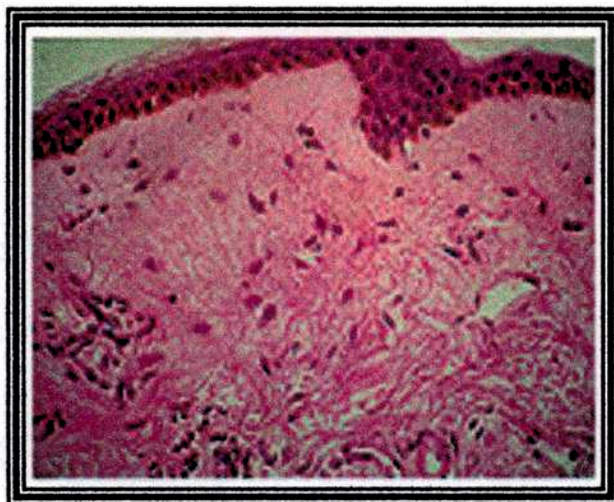


Figura 2:

Tejido Conectivo

Tomada de:

UCCh, 2003

El conjunto de sustancias extracelulares se denomina *matriz extracelular*, la cual está compuesta por *fibras* incluidas en una *matriz amorfa* que contiene líquido tisular. Las fibras del tejido conectivo se dividen en tres tipos, *fibras de colágeno*, *reticulares* y *elásticas*.

2.1. Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) es el medio a través del cual circulan, las sustancias nutritivas en tránsito hacia las células, y los productos de desecho hacia la sangre. En los mamíferos, los tejidos y órganos mantienen su organización espacial gracias a la presencia de los componentes de la MEC que, además de brindar sostén, mantienen unidas a las células tisulares especializadas.

Los componentes de la MEC (Figura 3) son sintetizados por las células inmersas en ella y, tanto su estructura molecular y microscópica como su función, varían de un tejido a otro (Toner y McCornick, 1992). Las principales macromoléculas constitutivas son: los *proteoglicanos*, las *proteínas fibrosas* y las *glicoproteínas de adhesión*. Los proteoglicanos forman un gel altamente hidratado en el que están embebidas las fibras conectivas.

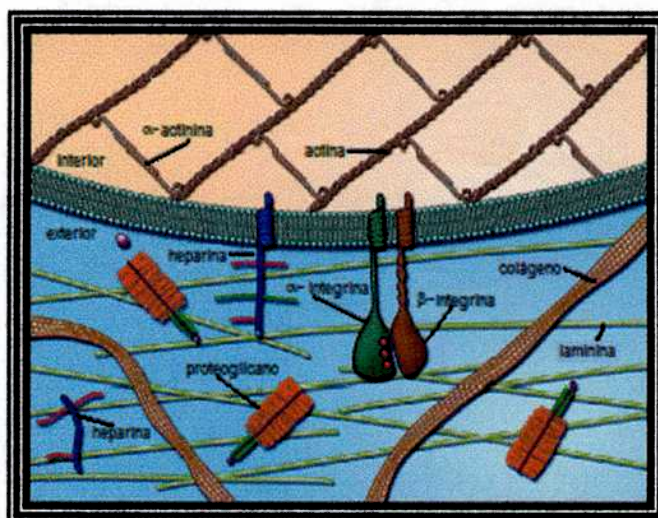


Figura 3:

Matriz Extracelular. Se distinguen las principales macromoléculas: proteoglicanos, proteínas fibrosas (Ej: colágeno) y glicoproteínas de adhesión (Ej: laminina) Tomada de Lehninger, 2000

2.1.a. Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son complejos macromoleculares de polisacáridos y proteína, constituidos por distintos tipos de cadenas de polisacáridos unidas a la proteína por enlaces covalentes. Su contenido en hidratos de carbono puede alcanzar hasta el 95%, a diferencia de las glucoproteínas que, como máximo, contienen el 60%; de este modo los PGs poseen más características de polisacáridos que de proteínas.

Las cadenas de polisacáridos se denominan glicosaminoglicanos (GAGs) y se disponen perpendicularmente a lo largo del eje proteico de modo que el PG resultante adopta una estructura tipo cepillo (Figura 4)

Los PGs se localizan, con preferencia, sobre la superficie celular. La rigidez de los GAGs proporciona integridad estructural a las células favoreciendo su migración. Por otra parte, la conformación lineal no-ramificada de los GAGs otorga alta viscosidad al medio extracelular, el cual actuaría como una barrera para la penetración de bacterias y otros microorganismos. Además, su baja compresibilidad confiere al medio la posibilidad de actuar como fluido lubricante ideal para las articulaciones.

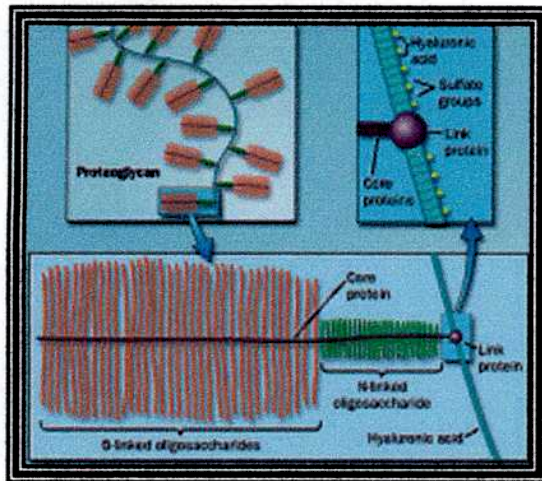


Figura 4:

Estructura tipo cepillo de un Proteoglicano. Se observa el cuerpo proteico y las cadenas de polisacáridos unidas a él.

Tomada de Lehninger, 2000

Los GAGs están constituidos por unidades repetidas de disacáridos (hexosaminas), entre los que pueden mencionarse N-acetilgalactosamina (NAc-Gal) ó N-acetilglucosamina (NAc-Glc), y un ácido urónico como el ácido glucurónico o el ácido idurónico (Figura 5).

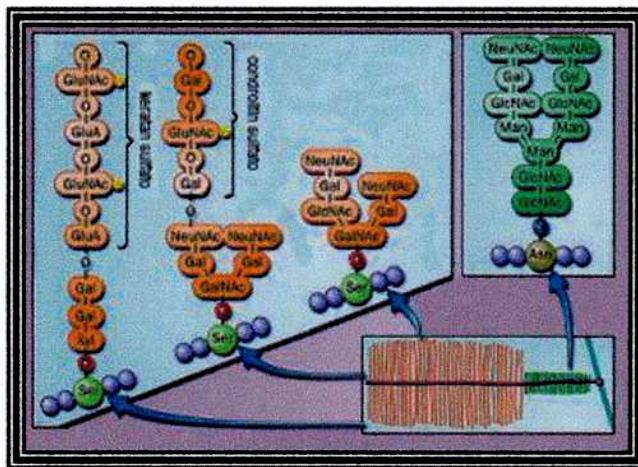


Figura 5:

Estructura de los GAGs. Se detallan las cadenas de oligosacáridos que los constituyen.

Gal=Galactosa, Xyl=Xilulosa,

Man=Manosa

Neu Ac=Ácido N-Ac o-neuraminico

Gal Nac=N-Ac-Galactosamina

Glu-Nac=N-Ac-Glucosamina

Tomada de Lehninger, 2000

Los GAGs son los heteropolisacáridos más abundantes en el organismo, y aquellos considerados de importancia fisiológica son: hialuronano o ácido hialurónico (AH), dermatán sulfato (DS), condroitín sulfato A (CSA), condroitín sulfato C (CSC), heparina (Hp), heparán sulfato (HS), y keratán sulfato (KS) (Figura 6).

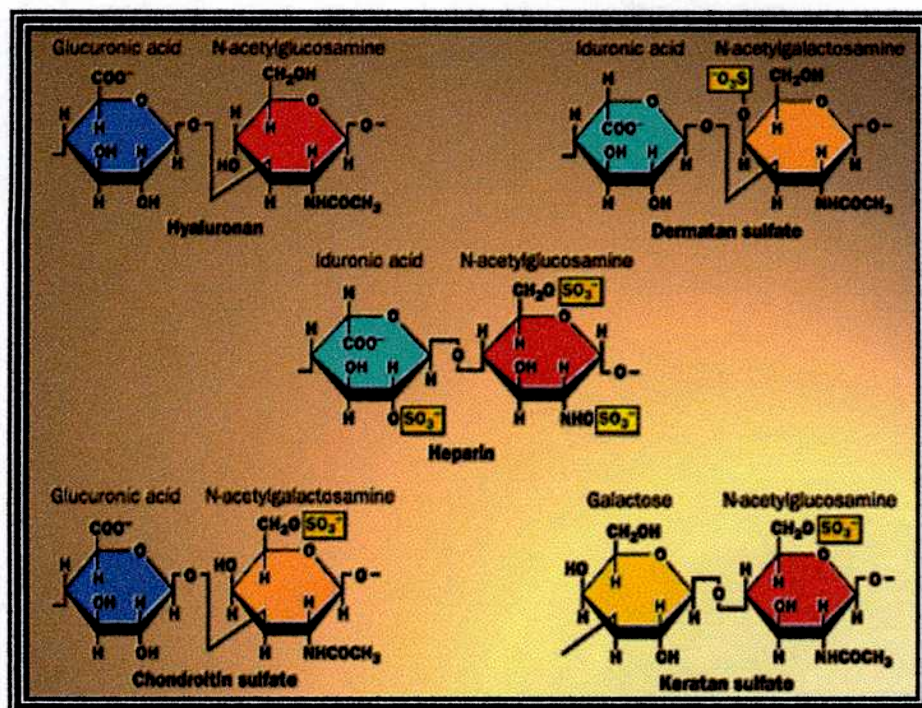


Figura 6:

Estructura de los cinco Glicosaminoglicanos más importantes. Pueden observarse las respectivas hexosaminas y ácidos urónicos que los conforman. Tomada de Lehninger, 2000

Los Condrotín sulfatos y el dermatán sulfato, se caracterizan por estar formados por una secuencia de 70 a 200 unidades sucesivas de (N-acetil-galactosamina sulfatada y ácido D-glucourónico o L-idurónico). La presencia de los sulfatos aumenta la densidad de cargas negativas, y su bajo peso molecular no impide la difusión de macromoléculas. Abunda en el tejido cartilaginoso, y es responsable de su elasticidad y de su resistencia a la compresión y a la tracción. El heparán sulfato está formado por una secuencia de 20 a 100 unidades sucesivas de (N- acetil-glucosamina sulfatada y ácido glucourónico o L-idurónico), mientras que el keratán sulfato está formado por la secuencia de un numero variable de unidades de (D-galactosa y N-acetil glucosamina sufatada).

Aunque cada uno de ellos posee un componente disacárido predominante, la heterogeneidad va a estar determinada por el tipo de azúcar constituyente del disacárido (Tabla I).

Tabla 1: Composición de los GAGs

GAG	Composición	Unión
<i>Hialuronato</i>	D-glucuronato + GlcNAc	$\beta(1,3)$
<i>Dermatán sulfato</i>	L-iduronato + GalNAc-4-sulfato	$\beta(1,3)$
<i>Condroitín sulfato (4- y 6-):</i>	D-glucuronato + GalNAc-4- ó -6-sulfato	$\beta(1,3)$
<i>Heparina y Heparán sulfato</i>	D-glucuronato-2-sulfato (o iduronato-2-sulfato) + N-sulfo-D-glucosamina-6-sulfato	$\alpha(1,4)$
<i>Keratán sulfato</i>	Gal + GlcNAc-6-sulfato	$\beta(1,4)$

Los GAGs poseen un alto grado de sulfatación, que le confiere a los PGs una fuerte carga negativa y su carácter hidrofílico, por ende favorece la unión de un gran número de cationes. El hialuronano es el único GAG que no contiene sulfato, y no se lo encuentra covalentemente unido a proteínas.

Los polímeros de AH son de alto PM (100 - 10.000 kDa) y pueden incorporar un gran volumen de agua. Por su riqueza en grupos ácidos está cargado negativamente y tiende a atraer cationes como el Na^+ que, al ser osmóticamente activos, atraen agua disponiéndose cada molécula de hialuronano como un ovillo laxamente plegado y altamente hidratado, que ocupa un volumen importante del espacio intercelular. Esta propiedad los hace excelentes lubricantes y absorbentes. Además, la presencia de ácido hialurónico en la matriz extracelular impide o dificulta la difusión de macromoléculas a su través. Por este motivo, se comporta como una eficaz barrera contra la difusión de macromoléculas.

Salvo en el tejido conectivo laxo, la cantidad de AH es escasa, pero su presencia es de importancia para la formación de los llamados *agregados de PGs*. Estos agregados son estructuras en las cuales las moléculas de PGs están unidas por enlaces no covalentes, a través de una proteína de unión, con un largo filamento de AH (Figura 7).

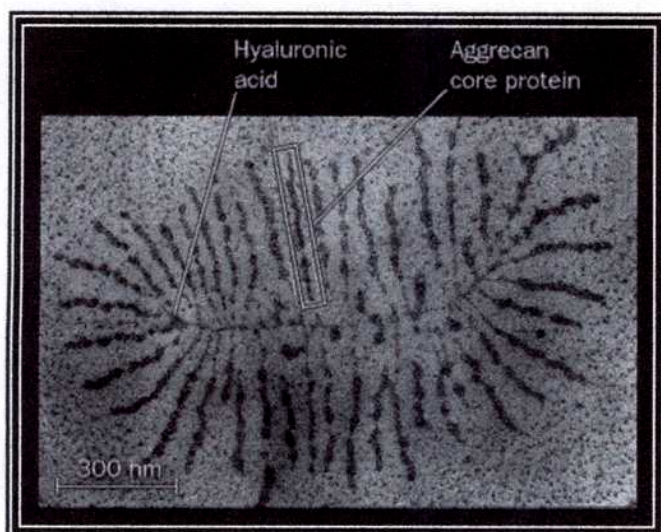


Figura 7:

Micrografía de un agregado de PGs (Agrecan), donde los PGs se une a un cuerpo de AH por uniones no covalentes.

Tomada de Lehninger, 2000

2.1.b. Proteínas Fibrosas

Estas proteínas se organizan para formar estructuras bien definidas de la matriz extracelular denominadas fibras, entre las que se pueden citar: las del colágeno, las reticulares y las elásticas. Las diferentes fibras están presentes en variadas proporciones, dependiendo del tipo de tejido.

Fibras de colágeno

Las fibras de colágeno son las más abundantes del tejido conectivo. Se distinguen por su birrefringencia bajo microscopio de luz polarizada, o por tinción con el colorante pirofucsina de van Gieson (Geneser, 2000 c). Su grosor es variable (1-10 μm) y con gran aumento (1000x) se observa que las fibras más gruesas están compuestas por fibras más delgadas denominadas fibrillas (0,2-0,5 μm de diámetro) que se mantienen unidas en paralelo mediante la matriz amorfa. Por microscopía electrónica se observa que las fibrillas están formadas por microfibrillas paralelas de un diámetro aproximado de 50 nm. Investigaciones acerca de la ultraestructura molecular de las microfibrillas demuestran que están constituidas por moléculas alargadas rígidas de tropocolágeno de unos 300 nm de largo y 1,5 nm de espesor. Cada molécula de tropocolágeno se compone de tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) arrolladas entre sí en una espiral triple (Figura 8). Estas cadenas α contienen una secuencia característica de aminoácidos, donde glicina (Gly) es siempre el tercer residuo, de manera que cada una está conformada por la secuencia -Gly-X-Y-, en la cual X e Y corresponden generalmente a prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Linsenmayer, 1991).

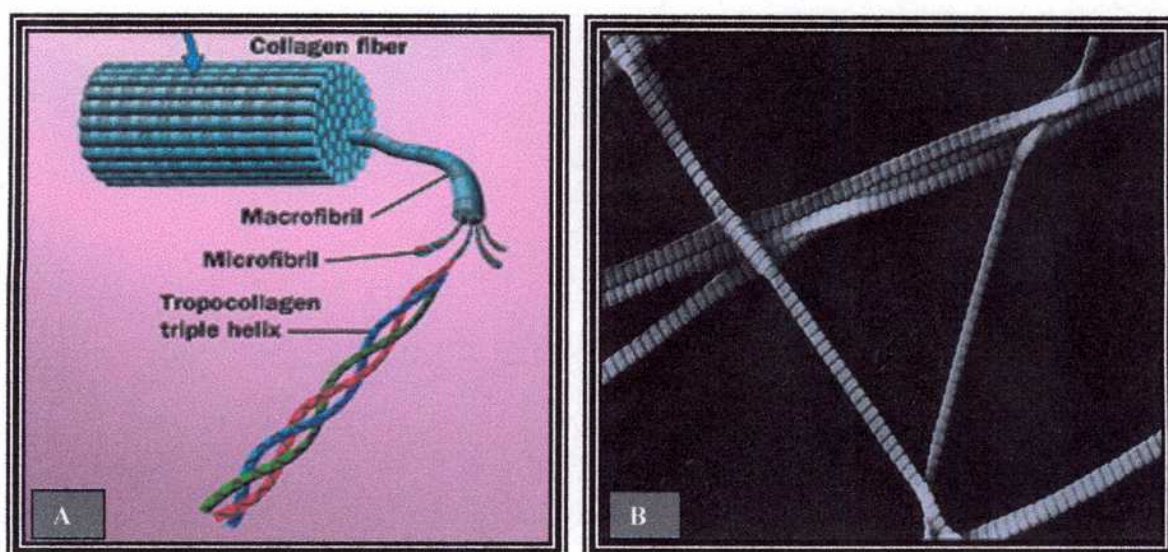


Figura 8:

A: Esquema de la ultraestructura de la fibra de colágeno, **B:** micrografía de la microfibrilla de colágeno. Tomada de Lehninger, 2000

Existen más de 30 tipos distintos de cadenas α codificadas por genes diferentes, las que se asocian y forman unos 20 tipos distintos de moléculas de colágeno, numerados del I al XX. Por lo general, las microfibrillas contienen más de un tipo de moléculas de tropocolágeno, tal es el caso de las microfibrillas de colágeno de la dermis las cuales contienen moléculas de tropocolágeno de tipo I y III (Geneser, 2000c)

Si bien el rol tradicional atribuido al colágeno es de tipo estructural, la función de las fibras de colágeno es, por sobre todo, la de fortalecer al tejido conectivo debido a la gran resistencia que estas ofrecen a la tracción en sentido longitudinal. Por otro lado, las características de flexibilidad de estas fibras, le confieren al tejido cierta movilidad.

Fibras reticulares

Las fibras reticulares son muy delgadas y no forman haces como las de colágeno, sino finas redes, de ahí su nombre. Están compuestas por escasas microfibrillas muy delgadas con la misma estructura periódica que el colágeno. Poseen una cubierta de PGs y se las encuentra muy relacionadas con las células, rodeando los adipocitos, las células musculares lisas y por debajo del endotelio de los capilares (Geneser, 2000 c). Las fibras reticulares brindan apoyo firme a los vasos capilares, a las fibras nerviosas y a las fibras musculares, asociadas estrechamente con la sección de tejido conectivo de las membranas basales.

Fibras elásticas

Las fibras elásticas se distinguen como hebras muy delgadas de 0,2 a 1 μm de diámetro, que se ramifican para formar una red. En fresco estas fibras presentan una tonalidad amarillenta que sólo se observa cuando aparecen en gran cantidad o son muy gruesas. Al microscopio óptico estas fibras son homogéneas y al microscopio electrónico se observa que contienen microfibrillas con un diámetro promedio de unos 10 nm, las cuales se disponen en haces incluidos en el material amorfo, compuesto por la proteína elastina. Las fibras elásticas se caracterizan por poder estirarse hasta casi el 150 % de su longitud original (Cormack, 1988).

2.1.c. Glicoproteínas de Adhesión

Las glicoproteínas de adhesión más importantes de la matriz extracelular son la *fibronectina* (FN) y la *laminina* (LN) las cuales, junto con otras proteínas extracelulares no-colágenas, cumplen una importante función en muchas de las interacciones de la superficie celular (Yamada, 1991). Estas glicoproteínas de adhesión se caracterizan por ser moléculas que presentan diversos dominios que les permiten interactuar simultáneamente, tanto con los componentes de la matriz extracelular como con las células del tejido conectivo. La FN, por ejemplo, se asocia a células, fibras y PGs del tejido conectivo (Figura 9), y la LN se asocia a células no conectivas en combinación con las macromoléculas de la lámina basal (Figura 10). Ambas glicoproteínas poseen sitios de unión a heparina y a colágeno (UCCh, 2003).

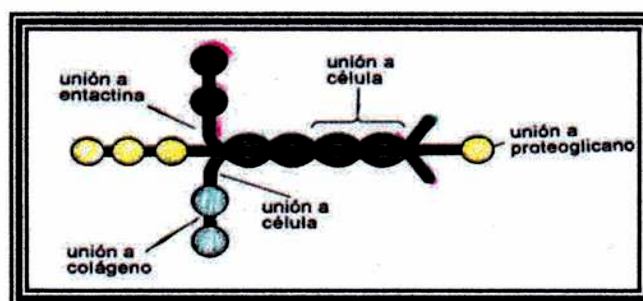


Figura 9:

Estructura de la Fibronectina donde se detallan los sitios de uniones específicas.

Tomada de:
UCCh, 2003

La FN puede encontrarse en el plasma como un dímero soluble producido por las células hepáticas, o bien como un dímero insoluble sintetizado por diversas células tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y ciertas células epiteliales. La FN insoluble se encuentra asociada a la matriz extracelular, induce la migración celular y la síntesis de fibras extracelulares, las cuales contienen colágenos y PGs (Wilson *et al.*, 2003).

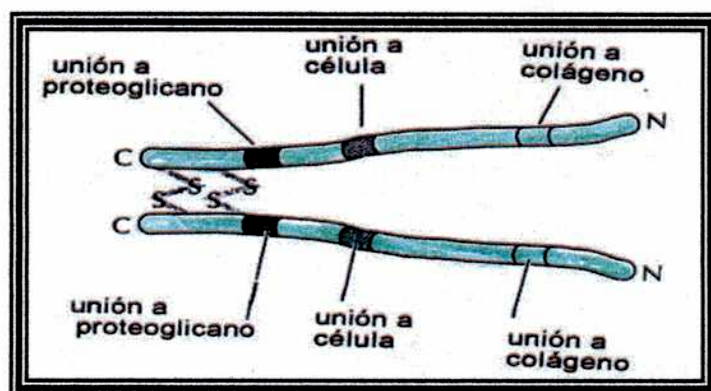


Figura 10:

Estructura de la Laminina y sus sitios de unión específicos. Tomada de: UCCh, 2003

La LN es una de las proteínas conocidas de mayor PM (1.000 kDa). A diferencia de FN, se encuentra exclusivamente en membrana basal y está presente en todos los sitios donde exista una lámina basal organizada. Su presencia sugiere un rol importante en la organización de la estructura de esta lámina, ya que promueve no sólo la adhesión sino también la diferenciación celular. Posee, además, capacidad de unión a colágeno tipo IV y a heparán sulfato. (Junqueira *et al.*, 2004).

2.2. Células

Las principales células que componen el tejido conectivo son los fibroblastos situados entre los haces de fibras colágenas (Figura 11). Otras células presentes en este tejido son: macrófagos, linfocitos, células cebadas, eosinófilos, etc. (Fawcett, 1987, UCCh, 2003).

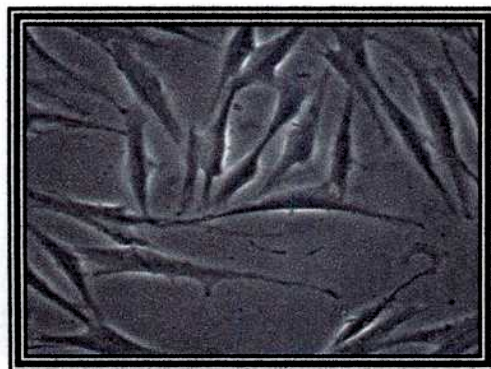


Figura 11:

Fibroblastos de dermis humana

Tomada de: UCCh, 2003

Los fibroblastos de animales adultos tienen generalmente forma de huso en corte longitudinal, con extremos alargados y una parte central que aloja el núcleo. Estas células, propias de los tejidos conjuntivos fibrosos, forman una estructura soporte alrededor de los tejidos y órganos, siendo su principal función sintetizar y mantener a la matriz extracelular propia del tejido.

De acuerdo a su actividad biosintética se pueden distinguir morfológicamente dos tipos celulares: los fibroblastos, que corresponden a la célula en estado de alta actividad (Figura 12), y los fibrocitos, que son las células poco activas o en reposo (Figura 13).

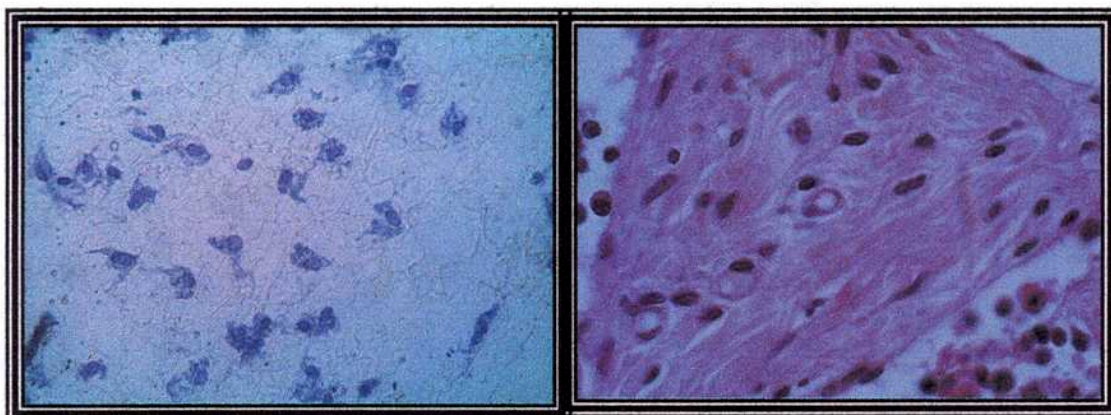


Figura 12:

Fibroblastos Tomada de: UCCh, 2003

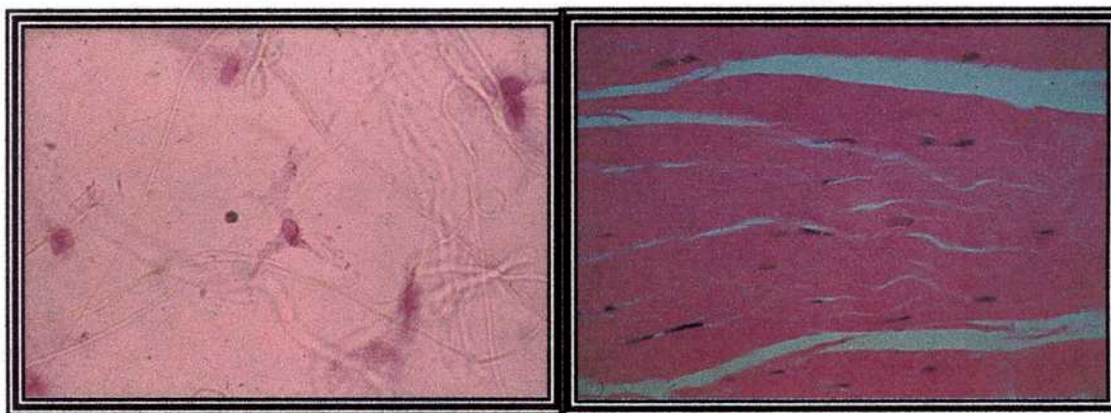


Figura 13:

Fibrocytos Tomada de: UCCh, 2003

Los fibroblastos poseen un abundante citoplasma basófilo; los fibrocitos, en cambio, son más pequeños y su citoplasma es suavemente acidófilo. Cuando los fibrocitos son estimulados adecuadamente, por ejemplo durante la cicatrización de una herida, se reactiva su actividad biosintética. En tales circunstancias, la célula reasume la morfología y apariencia de un fibroblasto activo. (Wilson *et al.*, 2003).

La organización ultraestructural de los fibroblastos refleja el compromiso que este tipo de células posee en la síntesis de las moléculas que forman la matriz extracelular. Poseen un retículo endoplásmico desarrollado, un aparato de Golgi perfectamente definido, escasas vesículas de secreción y organelas que se relacionan con la síntesis de moléculas precursoras del colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz extracelular. Los microtúbulos y microfilamentos de actina, implicados en procesos de motilidad celular, forman un citoesqueleto ampliamente desarrollado. Esta propiedad es importante en la cicatrización de heridas, ya que los fibroblastos tienen la capacidad de migrar hacia la zona lesionada, proliferar y producir los componentes de la matriz extracelular (UCCh, 2003).

ESTRUCTURA DE LA PIEL

Como se indicó al comienzo de esta introducción, la piel está compuesta principalmente por dos capas: *epidermis* y *dermis* (Figura 14).

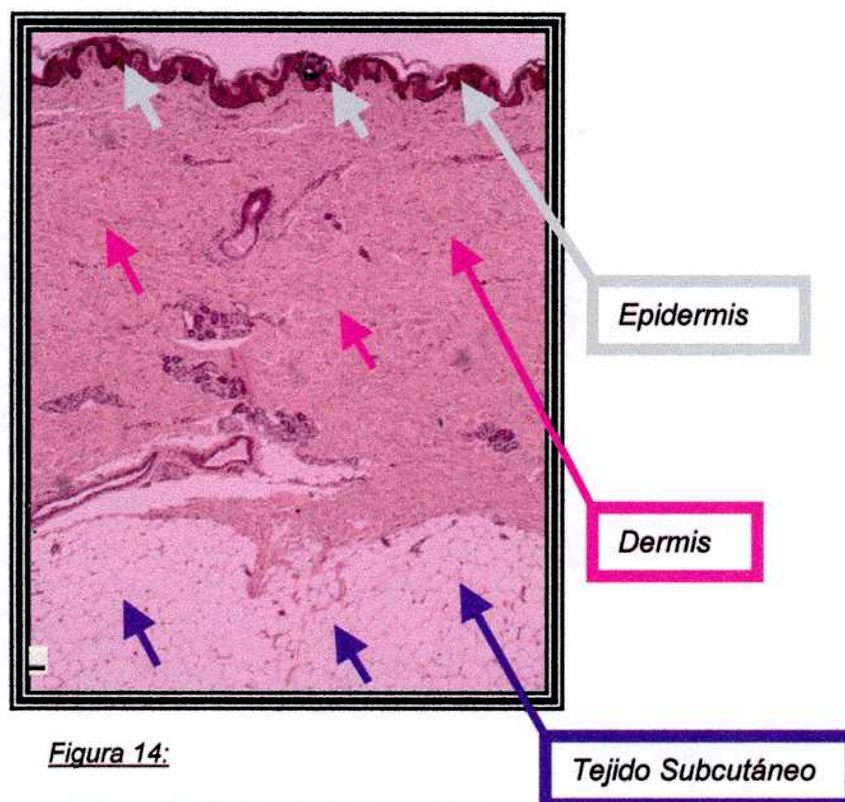


Figura 14:

Capas de la piel Tomada de: Geneser, 2000

Epidermis

La epidermis es un epitelio plano estratificado cuya función principal es la de proteger al organismo contra acciones lesivas del medio ambiente y contra la pérdida de líquido. Para ello, produce una membrana externa protectora -estrato córneo- compuesta por células aplanadas ricas en queratina, denominadas queratinocitos, el resto de las células son melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Los melanocitos producen el pigmento melanina el cual, junto con la hemoglobina y los carotenos, contribuye al color de la piel; las células de Langerhans son células presentadoras de antígeno, detectoras de la presencia de microorganismos en la epidermis y activadoras de los linfocitos T responsables de la respuesta inmune; las células de Merkel, en cambio, son mecanorreceptores sensoriales (Junqueira *et al.*, 2004).

La epidermis no posee sistema neurógeno ni circulatorio, por ende si se produce un daño en ella, éste no provoca dolor ni sangrado. La curación de la herida se efectúa por el desplazamiento de los queratinocitos hacia la superficie expuesta y posterior organización del tejido.

Dermis

La dermis es la capa gruesa de tejido conectivo a la que se fija la epidermis. En ella se insertan los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas. Las células mayoritarias de esta capa son los fibroblastos.

La dermis se compone a su vez de dos capas; el estrato papilar –más delgado– y por debajo el estrato reticular –más grueso–. El estrato papilar se compone de tejido conectivo laxo con delgadas fibras de colágeno, fundamentalmente de tipo III, mientras que el estrato reticular contiene gruesas fibras de colágeno, sobre todo del tipo I. Posee glucoproteínas y proteoglicanos que incluyen gran cantidad de condroitín sulfatos y, en menor medida, ácido hialurónico. Es en esta capa donde se encuentran los receptores del dolor y del tacto (Junqueira et al., 2004).

Por debajo de la dermis se encuentra el tejido celular subcutáneo –hipodermis– el cual, a su vez, se relaciona con las estructuras más profundas. Frecuentemente contiene adipocitos que varían en número y tamaño, dependiendo de la zona y el estado nutricional del organismo. Está compuesto por una red de colágeno y lípidos que ayudan a conservar el calor corporal y proteger el cuerpo contra lesiones, dado que amortigua los impactos.

Membrana basal

El epitelio está separado del tejido conectivo subyacente por una capa extracelular de sostén denominada membrana basal (Figura 15).

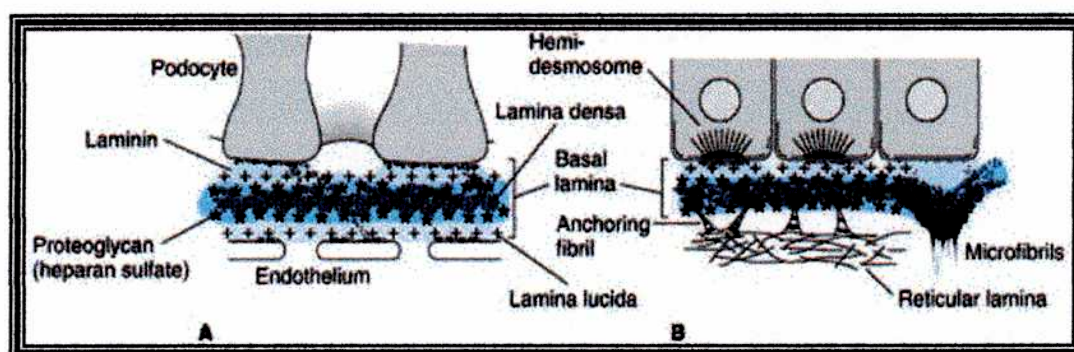


Figura 15:

A: Membrana basal formada por dos láminas basales. **B:** Membrana basal formada por una lámina basal y una reticular. Se observa la presencia de fibrillas de anclaje, las cuales unen la lámina basal al colágeno subyacente. También se observan las microfibrillas agrupadas en un haz que perfora la lámina basal, uniendo esta estructura con el sistema de fibras elásticas. Tomada de Junqueira et al, 2004.

Mediante la técnica de microscopía electrónica se logra observar que la membrana basal contiene varios componentes estructurales: la lámina basal –formada a su vez por la lámina lúcida y la lámina densa– y la lámina reticular. La membrana basal de la piel está formada por la fusión de una lámina basal y una reticular

Los principales componentes de la lámina basal, son el colágeno tipo IV, las glicoproteínas laminina y entactina, y proteoglicanos. La lámina basal está unida al tejido conectivo subyacente por fibrillas de anclaje constituidas por colágeno tipo VII y haces de microfibrillas que forman parte del sistema elástico de la dermis superficial (Figura 16).

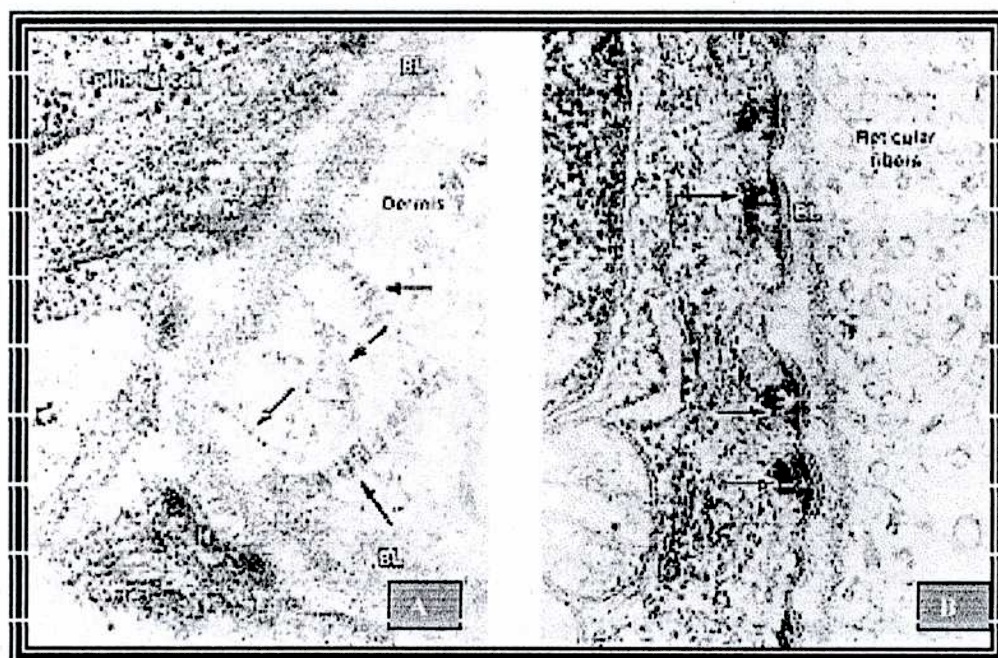


Figura 16:

A: Sección de piel humana, donde se muestran los hemidesmosomas (H) en la unión del tejido conectivo epitelial. Se observan la fibrillas de anclaje (flechas) que aparentemente se insertan en la lámina basal (BL) ($\times 54,000$). **B:** Sección de piel que muestra la lámina basal (BL) y los hemidesmosomas. Este es un ejemplo de membrana basal formada por una lámina basal y una lámina reticular ($\times 80,000$). Tomada de Junqueira et al, 2004.

Además, la lámina reticular está formada por fibras reticulares estrechamente asociadas con la lámina basal, estas fibras son producidas por las células de tejido conectivo.

La lámina basal actúa como sostén del epitelio permitiendo la fijación del mismo a los colágenos de la matriz extracelular, y como barrera de intercambio limitando el pasaje de macromoléculas entre tejidos. Además, la lámina basal influye sobre distintas características de las células adyacentes: organiza su polaridad, regula la proliferación y diferenciación por unión con factores de crecimiento; interviene en el metabolismo celular; participa en la organización de las proteínas de las membranas plasmáticas afectando la transducción de señales y favorece la migración. (McGee, 1992).

Epidermopoyesis

Las células basales, mitóticamente activas, tienen un ciclo que dura 200 a 400 h, con un promedio de 19 días. El proceso de diferenciación hasta capa granulosa (estrato córneo) abarca 2 semanas y las células córneas tardan otras dos semanas en desprenderse. El control de esta cinética depende de diversas moléculas estimuladoras e inhibidoras de la síntesis de ADN, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas.

Proliferación y diferenciación de Queratinocitos

Los queratinocitos de la epidermis, unidos firmemente entre sí por desmosomas, se encuentran distribuidos en diversas capas que se extienden desde la dermis hasta la superficie de la piel. Presentan diferentes estados metabólicos, los de las capas más profundas —estrato germinativo— son los más activos, mientras que los presentes en la capa superficial —estrato córneo— no presentan actividad y constituyen la capa de queratina.

Los queratinocitos del estrato germinativo, se dividen por mitosis, dando origen a una progenie que es continuamente desplazada hacia la superficie de la piel. En este proceso de diferenciación progresan hacia el estrato córneo, el cual consiste de queratinocitos depletados de organelas. Durante el desarrollo y diferenciación, las células sufren diversos cambios morfológicos: se vuelven aplanadas, acumulan filamentos de queratina en su citoplasma, pierden sus núcleos, la membrana plasmática se engrosa y se cubre con glicolípidos. Es aquí donde los queratinocitos pierden sus desmosomas y se produce la exfoliación (Wilson *et al.*, 2003, McCalmont, 2003).

LESIONES CUTÁNEAS

Estas lesiones se clasifican según su gravedad y naturaleza.

Abrasiones: se caracterizan por la pérdida de la parte superficial de la epidermis. El estrato germinativo no se pierde, por lo tanto el epitelio se regenera sin dejar cicatrices.

Incisiones y desgarros: aunque involucran ambas capas de la piel (epidermis y dermis) la pérdida del estrato germinativo es mínima. Un ejemplo son las incisiones quirúrgicas, las cuales después de la sutura, solo dejan un pequeño espacio a ser reparado.

Heridas profundas: se caracterizan por la pérdida de zonas extensas de la epidermis, incluyendo las células del estrato germinativo, que pueden comprometer también la dermis. La regeneración epidérmica debe producirse a partir de la migración de los queratinocitos de los bordes de la herida. Un ejemplo de éstas son las quemaduras.

Lesiones cutáneas por quemaduras

De los posibles daños que puede sufrir la piel, la quemadura es uno de los más traumáticos, y puede ser causada por energía térmica, eléctrica, química o electromagnética. Este tipo de lesiones se clasifican en quemaduras de *primero, segundo o tercer grado* (Benaim, 1968; 1970 & 1984) según la profundidad y severidad con que penetren la superficie de la piel (Figura 16).

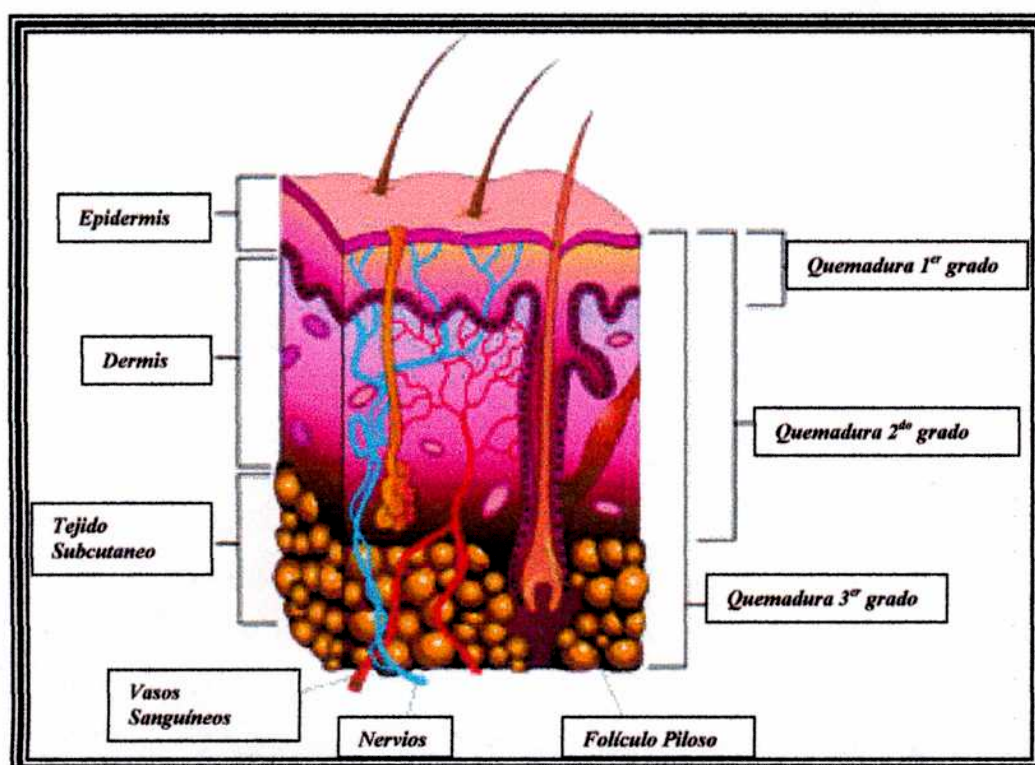


Figura 16:

Capas de la piel
y grados de
quemaduras.

Tomada de:
UCCh, 2003

Quemaduras de primer grado (superficiales): afectan sólo la epidermis y son dolorosas. Suelen epitelizar en un plazo de 10 a 15 días.

Quemaduras de segundo grado (de espesor parcial): afectan la epidermis y parte de la dermis, manteniéndose indemnes los folículos pilosos, glándulas sebáceas y conductos excretores de las glándulas sudoríparas.

Quemaduras de tercer grado (de espesor total): destruyen la epidermis y la dermis, y pueden dañar huesos, músculos y tendones.

El daño térmico destruye la piel -órgano fundamental de los sistemas de defensa- por ende la barrera cutánea se transforma en un medio propenso a la proliferación de gérmenes, la flora normal es destruida y el lecho vascular subyacente se trombosa. Esto último imposibilita que los otros sistemas defensivos (complemento, anticuerpos, leucocitos) lleguen al sitio de la lesión. Por lo tanto, el paciente con quemaduras de gran extensión es un individuo inmunosuprimido.

Además, los antibióticos administrados por vía sistémica tampoco tienen acceso a la quemadura y, si no se toman las medidas adecuadas, el paciente queda expuesto a todo tipo de complicaciones sépticas. Si se excluye el daño por inhalación, ésta es la principal causa de muerte en los servicios para quemados, con un 50-75 % de defunciones durante la internación.

FISIOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN

El proceso de cicatrización de úlceras y heridas tiene como objetivo la restitución del tejido lesionado hasta la recuperación de su función normal. Es un proceso fisiológicamente muy complejo que puede ser agrupado en dos etapas básicas, *cicatrización* y *epitelización* (López Corral & Fernandez Vico, 1993).

1. Etapa de Cicatrización

El desarrollo de nuevos tejidos en profundidad (conectivo y vascular) es llamado cicatrización, y consta principalmente de cuatro fases bien definidas:

Catabólica o Exudativa

Anabólica o Proliferativa

Reparativa

De Contracción

1.1. Fase catabólica o exudativa

Esta fase dura aproximadamente 72 h. (Hatz *et al.*, 1994), e incluye dos etapas clínicas sucesivas, la *activación del sistema de coagulación sanguíneo* y la *inflamación*.

1.1.a. Activación del sistema de coagulación sanguíneo: Cuando se produce una herida o úlcera, los vasos de la dermis resultan dañados y se activa el sistema de la coagulación (factor vascular). El coágulo formado protege la superficie expuesta y permite la reparación tisular mediada por la agregación de plaquetas. La secreción de mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos, induce la aproximación de elementos celulares (macrófagos, granulocitos, linfocitos) (Tabla II). Las enzimas liberadas por los granulocitos neutrófilos digieren los restos de tejido y los pequeños coágulos, los cuales finalmente son fagocitados por los macrófagos.

Tabla II: Factores que controlan la proliferación celular durante la cicatrización (Chandrasoma & Taylor, 2003)

<i>Factor</i>	<i>Origen</i>	<i>Efecto</i>
<i>Factores que estimulan el crecimiento</i>	Plaquetas, células endoteliales, macrófagos	Quimiotáctico para neutrófilos y macrófagos. Estimulación capilar y proliferación de fibroblastos.
<i>Factor de crecimiento epidérmico</i>	Tejido glandular múltiple	Estimula las células epidérmicas, sanguíneas y los fibroblastos
<i>Citoquinas (IL-1 y TGFβ)</i>	Células T activadas	Estimula el desarrollo de los capilares y fibroblastos. Recluta macrófagos
<i>Factor de crecimiento de fibroblastos</i>	Macrófagos	Estimula fibroblastos y células endoteliales
<i>Fibrina</i>	Proteína plasmática	Estimula el crecimiento del tejido de granulación hacia el interior
<i>Fibronectina</i>	Plasma, fibroblastos	Estimula la formación capilar. Quimiotáctico para fibroblastos

1.1.b. Inflamación: Durante las primeras 24 h, se produce migración de células inflamatorias (fundamentalmente granulocitos y monocitos), seguida de la aparición de fibroblastos, atraídos por sustancias quimiotácticas. Estas últimas pueden ser factores del complemento, citoquinas, y productos derivados de las bacterias y de la degradación del colágeno (Postlethwaite 1978; Albini & Adelman, 1985; Laskin, 1986). Se reducen los neutrófilos y aparecen los macrófagos. La FN se encuentra incrementada en los sitios de inflamación activa y durante la reparación de los tejidos y aparece de manera temprana, junto con los fibroblastos.

1.2. Fase anabólica o proliferativa

Mientras la inflamación continúa, al tercer o cuarto día comienza la llamada fase proliferativa, dependiente de los fibroblastos que han llegado a la zona. Esta fase a su vez comprende tres procesos: la *neoformación vascular*, el *crecimiento de fibroblastos en la herida* y la *formación del tejido de granulación*.

1.2.a. Neoformación vascular: A partir de los vasos sanguíneos deteriorados se forma una extensión de ramificaciones vasculares que restablece la irrigación sanguínea. Las células del endotelio vascular son las primeras en responder a los estímulos angiogénicos y comenzar a migrar, lo que provoca la proliferación endotelial, y posterior formación de los vasos sanguíneos.

1.2.b. Crecimiento de fibroblastos en la herida: Como consecuencia de la fase de neoformación vascular, comienza a producirse el nuevo tejido conectivo. Los fibroblastos sintetizan fibras finas de colágeno tipo IV y ácido hialurónico incluidos en una matriz o sustancia fundamental parecida a un gel (Fawcett, 1987). La hipoxia y acidosis producidas provocan la pérdida de la propiedad de retención de agua de las glucoproteínas.

1.2.c. Formación del tejido de granulación: El tejido necesario para que se produzca la reparación final de la herida es llamado tejido de granulación, de apariencia rojo viva. Está formado por tejido libre de detritus, altamente vascularizado, en el cual existen leucocitos, histiocitos, fibrocitos, fibroblastos, células plasmáticas, mastocitos, angioblastos y miofibroblastos.

1.3. Fase reparativa

La matriz extracelular forma un lecho en la herida en el que penetran los vasos sanguíneos, de esta forma la reparación comienza desde el interior hacia el exterior de la piel, y de una manera gradual. En relación con los procesos de cicatrización, la lámina basal actúa como sostén para la migración de células nuevas desde los bordes circundantes de la herida hasta la zona dañada. En esta fase se produce también la reorientación y organización de las fibras de colágeno, para permitir que el nuevo tejido alcance mayor solidez. Los fibroblastos se ordenan por tensión y se reorganiza el tejido reparador y tras esta fase se libera el condroitín sulfato de los proteoglicanos, surgiendo luego las fibras de colágenos gruesas.

1.4. Fase de contracción

Los miofibroblastos son los responsables de que la superficie de la herida vaya reduciéndose ya que contienen fibras contráctiles de actina y miosina, comparables a las células lisas musculares. Los miofibroblastos se unen mediante la FN a las estructuras del colágeno, de esta forma los bordes de la herida se van acercando a razón de 1-2 mm por día. En la fase de maduración existe un equilibrio entre la formación y degradación del colágeno, y gracias a su estructura reticular, la cicatriz resiste mejor las tensiones.

2. Etapa de Epitelización

El proceso de epitelización consiste en el desarrollo de un nuevo epitelio, proceso que comienza desde el momento en que se produce la herida. Ocurre en tres fases: *migración de las células del estrato germinativo (queratinocitos)*, *mitosis de queratinocitos* y *maduración de las nuevas células epiteliales*.

2.1. Migración de los queratinocitos

Cuando todas las capas de la epidermis han sido destruidas, la fase de epitelización comienza a partir de los bordes de la herida, ya que la pérdida de contacto entre los queratinocitos los estimula a moverse para unirse de nuevo. Estos se desplazan con un movimiento ameboideo por encima de la lámina basal o, si ésta ha sido destruida, por encima de una lámina temporal de fibronectina, colágeno tipo V y fibrina producidos por la propia célula.

2.2. Mitosis de los queratinocitos

La mitosis de los queratinocitos es inducida por la interleukina 1 la cual es sintetizada por macrófagos. De este modo, los queratinocitos se unen sin solución de continuidad para "rellenar el hueco".

2.3. Maduración de las nuevas células epiteliales

Una vez unidos entre sí los *queratinocitos*, comienza la etapa de diferenciación y maduración. Las células progresan y ascienden por los diferentes estratos de la epidermis, regenerando la piel.

TRATAMIENTO DE LAS LESIONES PRODUCIDAS POR QUEMADURAS

El tratamiento local de las quemaduras persigue varios objetivos: lograr la reepitelización de las zonas afectadas en el tiempo más corto posible, disminuir el dolor y las molestias que estas lesiones provocan, evitar infecciones que destruirían las células epiteliales remanentes profundizando la herida.

El tratamiento terapéutico no sólo abarca *el cuidado de las heridas*, sino que además debe considerarse la incorporación de fluidos y electrolitos por vía intravenosa, el tratamiento del dolor, las sesiones de fisioterapia y/o terapia ocupacional, la reconstrucción funcional y estética, y en los casos más severos *el trasplante de piel*.

1. Cuidado de las heridas

Al respecto, durante varios años, se han practicado las curas expuestas, oclusivas o mixtas con o sin aplicación de tópicos antibacterianos, y continúan empleándose con resultados variables según la rigurosidad de la técnica utilizada y la frecuencia de las curaciones (Artigas *et al.*, 1980).

La técnica de curación de heridas en ambiente húmedo ha demostrado una mayor eficacia clínica y una mejor relación costo / beneficio que las curas secas clásicas (GNEAUPP, 1998). Por ello, actualmente, tras la limpieza y debridamiento de la mayoría de las heridas, se utilizan *apósitos* que mantienen un ambiente húmedo. Este ambiente favorece la reepitelización y estimula la formación de tejido de granulación.

Se considera "ideal" un *apósito* que cumple con los siguientes requisitos: ser biocompatible; proteger la herida de agresiones externas, físicas, químicas y bacterianas; mantener el lecho de la úlcera continuamente húmedo y la piel que la rodea seca; eliminar exudados y tejido necrótico mediante su absorción, y dejar la mínima cantidad de residuos en la lesión.

Entre ellos, se pueden mencionar los *apósitos semipermeables de poliuretano basados en cura húmeda*, estos son permeables al oxígeno, al vapor y a otros gases, e impermeables al agua y a las bacterias. Los *apósitos de hidrogel* y los *apósitos hidrocoloides*, que poseen gran capacidad para absorber la secreción y exudado de la herida debido a su estructura, formada por redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos o hidrogeles poliméricos. Las *placas o cintas de alginatos*, que están formadas por polímeros hidrocarbonados de alto peso molecular con gran capacidad para absorber exudados y fluidos. Por último, cabe citar a los *apósitos hidrocelulares para cavidad*, los cuales están constituidos, por geles de espuma de poliuretano.

2. Transplante de Piel

Al margen de las lesiones accidentales –sobre todo las causadas por quemaduras– o las heridas quirúrgicas, la piel puede ser agredida por enfermedades dermatológicas o lesiones crónicas tales como las úlceras por presión, úlceras venosas y úlceras diabéticas.

De acuerdo a la gravedad del caso y a la calidad del tejido comprometido en la lesión, se pueden realizar diversos tipos de trasplantes que incluyen los *injertos de piel*, la *expansión de tejido* adyacente y el empleo de *sustitutos de piel*.

2.1. Injertos de piel

Una metodología eficaz para la curación de lesiones, particularmente las de mayor profundidad y extensión, es la aplicación de injertos de piel.

Existen dos tipos básicos de injertos: de grosor parcial y el de grosor total. El *injerto de grosor parcial* es utilizado comúnmente para tratar heridas por quemaduras y comprende sólo las capas de piel muy cercanas a la superficie. El *injerto de grosor total* es empleado para tratar heridas por quemaduras amplias y profundas, o bien para suplementar áreas previamente cubiertas por extensión de la piel próxima, que necesitan incorporar más piel para obtener movimiento.

Las posibilidades de tratamiento tradicionales para facilitar la regeneración del tejido dañado son el *autoinjerto* y el *aloinjerto*.

Los autoinjertos o injertos homólogos consisten, básicamente, en un parche de piel sana tomada de un área del cuerpo del paciente, denominada zona dadora, que se utiliza para cubrir el área de piel dañada. La sección de piel empleada puede incluir los vasos sanguíneos, la grasa y los músculos esenciales, cuando la zona lesionada no posee un buen suministro de sangre, debido al daño sufrido por los vasos sanguíneos. Este tipo de injerto posee la limitación que, en pacientes con grandes lesiones, el área de piel sana generalmente es pequeña.

En el aloinjerto se emplea usualmente piel de cadáveres o bien piel de donantes vivos consanguíneos, o que hubieran sido sometidos a cirugías estéticas o reparadoras. Si bien en este caso, la disponibilidad de piel es mayor, la aplicación de este tratamiento conlleva el riesgo de transmisión de enfermedades virales o parasitarias. Además, el paciente puede desarrollar reacciones inmunológicas adversas que originarían el rechazo del tejido trasplantado.

2.2. Expansión de tejido

Esta técnica es un proceso que aumenta la cantidad de tejido existente con fines reconstructivos. Permite el crecimiento de piel extra por estiramiento del tejido sano adyacente y, a menudo, es utilizada en combinación con el injerto de piel. La gran ventaja de este tipo de reparación es la disminución del riesgo de pérdida de la piel, ya que ésta permanece conectada a sus vasos y nervios originales.

2.3. Sustitutos de Piel

El gran esfuerzo desplegado en los centros de atención de quemados, orientado a mejorar el tratamiento terapéutico y la calidad de vida de los pacientes más graves, permitió en las últimas décadas centrar las investigaciones en la obtención de piel artificial. De este modo, cobró gran impulso el desarrollo y empleo de sustitutos de piel (Figura 17) tanto biológicos y sintéticos como mixtos (García Igarza & Losardo, 1977; Moserova & Behounkova-Houskova, 1979; 1984; Brown & Barot, 1986).

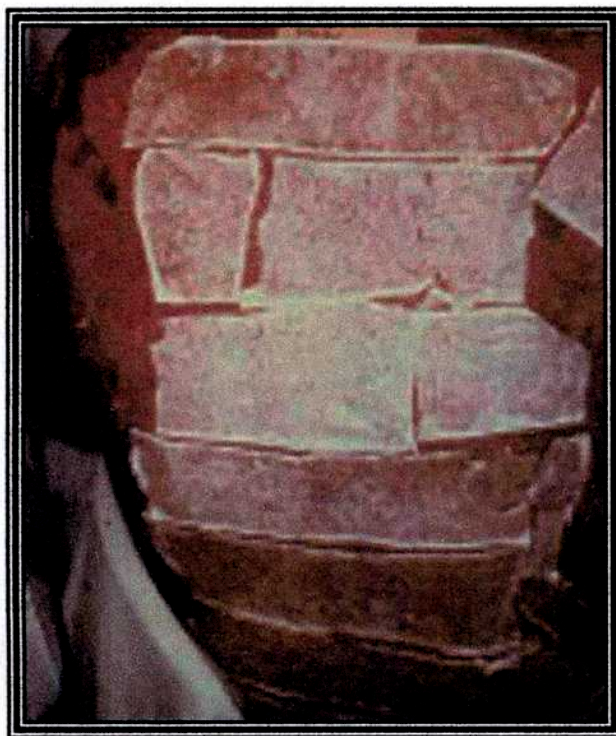


Figura 17:

*Sustituto de Piel
aplicado al dorso de
un paciente con
quemaduras de
segundo grado*

Tomada de: UCCh, 2003

Gracias al avance tecnológico, surgió una alternativa terapéutica interesante que involucra cultivos celulares de piel *in vitro*. Se trata de los llamados *injertos epidérmicos* los cuales consisten en el desarrollo y proliferación de células epiteliales autólogas multiplicadas *in vitro*.

Aunque estos cultivos sólo proporcionan epidermis, la ventaja de esta metodología es la utilización de una pequeña porción de piel del propio paciente como fuente de células epidérmicas. Sin embargo, el tratamiento resulta costoso y, por lo general, no responde con la rapidez que exige la atención de pacientes gravemente afectados (Eldad *et al.*, 1987).

Actualmente, se está ensayando el uso de epidermis universales desprovistas de antígenos de histocompatibilidad tipo II, así como polímeros biorreabsorbibles, cuyo componente principal es el ácido hialurónico, y películas portadoras de células epidérmicas que permitan transferir queratinocitos a la herida (Harding *et al.*, 2002).

Algunos sustitutos de piel combinan la aplicación de *dermis artificial* con *cultivos autólogos*, estos son conocidos genéricamente como *injertos dérmicos*. La función de la aplicación de la dermis es recubrir las heridas en forma inmediata, preservándolas así de infecciones comportándose como base o apoyo para la posterior aplicación del cultivo autólogo. El injerto resultante se irá absorbiendo poco a poco, constituyendo una matriz capaz de soportar la regeneración dérmica.

La dermis artificial puede estar compuesta por diversos constituyentes, un ejemplo es el *material bilaminado* formado por una película de nylon cubierta con una capa de silicona. Esta capa, a su vez, está revestida con péptidos porcinos derivados de colágeno tipo I, los cuales promueven el crecimiento de fibroblastos y endotelio vascular. Otro tipo de dermis artificial denominado *componente dérmico* incorpora una red de colágeno bovino tipo I entrecruzado con condroitín-sulfato C sobre una hoja de silicona.

Entre los injertos dérmicos también debe mencionarse aquel constituido por una lámina de *colágeno dérmico humano* sobre la cual se depositan fibroblastos alogénicos para su posterior proliferación.

Actualmente, se está evaluando el uso de biopolímeros de colágeno como estructuras de soporte para la administración de queratinocitos y fibroblastos, el uso de ácido poliglicólico y poliláctico sembrado con fibroblastos alogénicos con propiedades antibacterianas (de amplio uso quirúrgico), y el empleo de matrices de colágeno-elastina sembradas con células autólogas, ó matrices formadas por colágeno, quitosán y condroitín-sulfato C, que favorecen la penetración de las células del paciente. Entre los sustitutos más actuales, se encuentra un gel de colágeno bovino adicionado con fibroblastos y queratinocitos alogénicos cuya incubación produce tanto dermis como epidermis (Supp *et al.*, 2000).

De los sustitutos biológicos mencionados, el uso de la piel porcina (xenoinjerto) como elemento protector de superficies con quemaduras de profundidad parcial y de zonas dadoras de piel, ha sido exitoso en el tratamiento de distintas lesiones, tanto en el exterior (Salisbury, *et al.*, 1973; Rundle *et al.*, 1976) como en nuestro país (Sturla *et al.*, 1971; Garcia Igarza & Losardo, 1984). La *dermis porcina* se obtiene directamente de la piel del animal y, luego de ser sometida a diferentes procesos para su comercialización, puede ser aplicada en forma de parche ó lámina, ó sembrada sobre la herida como polvo. (Figura 18).

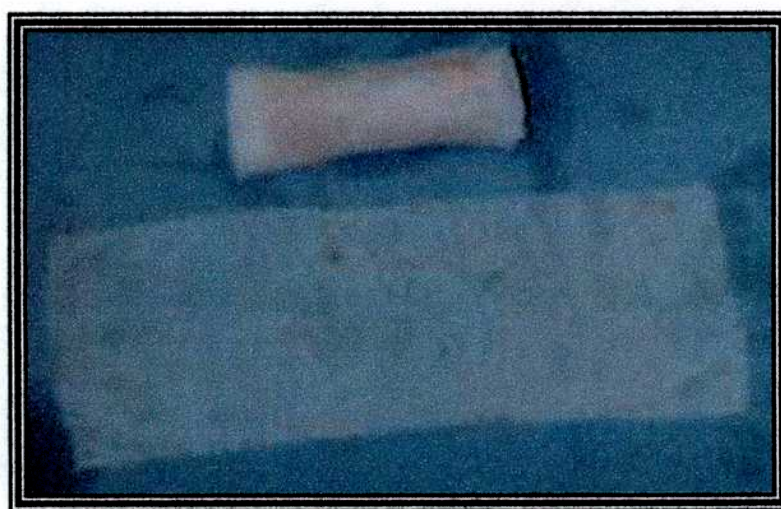


Figura 18:

Dermis Porcina en Lámina para Injertos

Estudios comparativos del comportamiento de diferentes pieles (piel humana homóloga fresca o conservada, piel proveniente de cadáveres o piezas operatorias (aloinjertos), y piel de origen porcino) en el tratamiento de diferentes patologías, demostraron que la piel porcina podía utilizarse exitosamente como sustituto cutáneo, con la ventaja de poseer un bajo riesgo de rechazo, y sin riesgo de transmisión de enfermedades humanas tales como Hepatitis B, HIV, etc. (Frank *et al.*, 1983; Brown & Barot, 1986).

La dermis porcina se utilizó con éxito en el tratamiento de úlceras varicosas traumáticas. Posteriormente, las dermis fueron mejoradas mediante la aplicación de un proceso de liofilización (Imai *et al.*, 1980) que facilitó su manipulación y permitió su aplicación en zonas dadoras de piel o áreas con pérdida de la cubierta epitelial.

En Argentina, *Laboratorios Genoma S. A.*, ha desarrollado ***Pel Cupron®***, un producto a base de dermis porcina, con el cual se consigue restaurar la función de barrera de la piel, en zonas donde hubo pérdida parcial o total de la misma. Este producto se obtiene sometiendo la dermis porcina a un procedimiento industrial que involucra el proceso de liofilización, el que permite conservar intacta la matriz extracelular. El laboratorio produce dermis porcina en forma de láminas liofilizadas y también como producto liofilizado pulverizado. Su acción terapéutica pudo ser comprobada en diversos trabajos clínicos. En quemaduras de segundo grado, el tratamiento local con la dermis en láminas, demostró que al primer día de la aplicación, el edema producido se atenuó y el dolor cesó; y al cuarto día el paciente pudo retirarse de la internación con indicaciones adecuadas. En el caso de heridas profundas, el relleno de la lesión con dermis pulverizada, mantuvo limpia la cavidad y separó las paredes de la misma, permitiendo que el tejido de granulación se forme desde la base y en sentido ascendente, cubriendo las depresiones.

La principal función de este producto es la de actuar como “barrera mecánica” debido a que su estructura fibrilar tridimensional permite a la fracción amorfa embeberse en agua hasta el límite de distensión de sus fibras (Buchans *et al.*, 1982; Pepper *et al.*, 1986). Esta función fue confirmada clínicamente, se observó que a las 24 h de haber sido colocado el producto liofilizado sobre una lesión, éste permaneció seco, a diferencia de lo que ocurre en la terapia convencional donde no se utilizan sustitutos dérmicos. Este producto provee también una estructura que favorece y colabora con la revascularización y restitución celular.

Dada la importancia de contar con un producto comercial de origen nacional con estas características, surge el interés científico y la necesidad tecnológica de profundizar el conocimiento acerca de la constitución del mismo. Es decir, conocer la acción biológica implicada en el poder restituyente de la piel definiendo los componentes activos y el mecanismo involucrado en dicha acción.



OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Caracterización de un sustituto de piel humana a base de dermis porcina liofilizada y comparación con el producto obtenido fresco, a fin de describir y evaluar calidad de los componentes mayoritarios, asociar luego el papel que cumplen estos componentes con la función del sustituto de piel en las patologías en que se los utiliza, y sentar bases científicas para mejorar en un futuro su acción terapéutica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollo de metodología específica para el aislamiento y caracterización de los componentes de la dermis involucrados en la reparación y regeneración tisular.

Identificación de aquellos componentes de la dermis porcina fresca que se conservan luego del proceso industrial al que se somete el producto para su comercialización.

Evaluación de la actividad biológica del producto en un modelo experimental *in vitro*, que involucra el cultivo de fibroblastos humanos.

CAPÍTULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA

Este primer capítulo comprende el desarrollo de la metodología necesaria para la caracterización de la dermis porcina.

Dado que no se contaba hasta el momento con las herramientas necesarias para aislar y caracterizar los componentes de un sistema tan complejo como la piel, uno de los objetivos de esta tesis fue desarrollar y/o modificar procedimientos que permitieran caracterizar cuali-cuantitativamente el producto.

Una vez evaluada y seleccionada la metodología, se procedió al aislamiento, identificación y cuantificación de los componentes, considerados de interés biológico, presentes en ambos tipos de dermis, fresca y tratada industrialmente para su comercialización. Se realizaron comparaciones cuali-cuantitativas de ambos productos para establecer si la dermis porcina tratada mantenía las características originales de la dermis fresca.

MATERIALES

Dermis Porcina

Se utilizó dermis de cerdo "**fresca**" y muestras de un producto farmacéutico a base de dermis porcina "**tratada**", en sus dos presentaciones: *polvo liofilizado* (uso odontológico o heridas profundas) y *parche ó lámina liofilizada* (uso como "toilette" quirúrgico)

Los "**cueros**" fueron obtenidos de cerdos blancos (3 a 6 meses de vida) que pesaron entre 10 y 15 kilos, fueron recolectados directamente de frigoríficos habilitados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

De los cueros se separó la dermis, se la preparó luego en láminas de 2 cm de ancho, e inmediatamente después se congelaron en nitrógeno líquido. Las láminas de dermis, así congeladas, se conservaron a -70°C en freezer Revco ULT 2586-3-V35, hasta el momento en que se realizaron los análisis.

Los productos farmacéuticos fueron ofrecidos por la empresa elaboradora "Genoma S.A.", quien efectúa sobre las pieles los procedimientos indicados a continuación:

- Separación de la dermis de los cueros porcinos
- Liofilización de las dermis
- Preparación en láminas de 140 cm^2 de superficie y 0,5 mm de espesor
- Pulverizado de las láminas (en el caso que así lo requiera)
- Envasado de las láminas o del producto pulverizado, en un doble film transparente apto para ser irradiado
- Esterilización por radiación gamma

Reactivos

El resto de los materiales y reactivos, utilizados en el desarrollo de la metodología de esta tesis, serán detallados cuando corresponda en cada una de las etapas que se describen a continuación.

METODOLOGÍA

ESQUEMA DE TRABAJO Y DENOMINACIÓN DE LAS DISTINTAS ETAPAS

Con el fin de estudiar los componentes de la dermis –fresca y tratada– y comparar ambos productos, se desarrolló un esquema de trabajo (*Esquema 1*) que incluyó las siguientes etapas:

1. *Caracterización de las Dermis a Partir del Contenido de sus Componentes Mayoritarios.*
2. *Preparación de Extractos Homogéneos y Aislamiento de los Componentes de Importancia Biológica de las Dermis.*
3. *Identificación y Cuantificación de Colágenos Tipo I y III en las Fracciones Correspondientes*
4. *Identificación y Cuantificación de las Proteínas (Fibronectina y Laminina) en las Fracciones Correspondientes.*
5. *Identificación y cuantificación de los GAGs en las Fracciones Correspondientes.*

A fin de facilitar la comprensión de la sistemática llevada a cabo, se individualizaron con la letra F a todas aquellas fracciones de análisis provenientes de la dermis porcina “*fresca*”. Paralelamente, a las provenientes de la piel porcina comercial, denominada como “*tratada*” (llámese “*parche*” o “*polvo*”), se las identificó con la letra T.

Los diferentes pasos de la metodología a la que fueron sometidas ambas dermis, fueron identificados con subíndices numéricos.

Etapas 1. Caracterización de las Dermis a Partir del Contenido de sus Componentes Mayoritarios

En esta etapa se procedió a la determinación del contenido de Humedad, Colágeno y Proteínas totales, tanto en la dermis fresca como en el producto tratado, con el objeto de establecer los niveles iniciales, y así poder evaluar sus modificaciones en las sucesivas etapas del esquema de trabajo.

a. Determinación del Porcentaje de Humedad

Se determinó la concentración de humedad en las dermis (Fresca y Tratada) por métodos gravimétricos según la descripción de Kolar (1992). El objetivo de este ensayo fue expresar los resultados de las diferentes etapas en base a porcentaje de tejido seco y poder hacer así, una apropiada comparación entre las dermis fresca y liofilizada.

Se define como porcentaje de humedad a la pérdida de masa obtenida luego del secado de las muestras a una temperatura de 102 ± 2 °C durante el tiempo necesario para alcanzar el peso constante. Para ello se pesó 1,000 g de muestra en cápsula de porcelana tarada de 10 cm de diámetro, se la colocó en estufa OVA 031 (SANYO Gallenkamp®) durante 20 h, y luego de enfriarla durante 30 min. en desecador Nro. 19554 (Kartell®) se la pesó en balanza Explorer (Ohaus®). Estos pasos se repitieron hasta conseguir peso constante de la muestra desecada.

Cálculo del porcentaje de humedad: $[(a - b) \times 100 / a]$

a = masa de la muestra fresca (g). b = masa de la muestra seca (g)

b. Determinación de la Concentración de Proteínas Totales

Se cuantificó el contenido de proteínas totales por el método de Kjeldahl (Price *et al.* 1994). Este método se utiliza para la determinación de la concentración de N y el valor obtenido es luego transformado en concentración de proteínas por un factor de corrección.

El método de Kjeldahl consiste en oxidar la muestra con ácido sulfúrico concentrado (Merck®), utilizando sulfato de cobre como catalizador (Anedra®) y sulfato de potasio (Anedra®) para aumentar el punto de ebullición del ácido. En estas condiciones el nitrógeno es convertido en amoníaco, el cual es primero destilado por arrastre con vapor de agua, y luego recogido en una solución de ácido bórico al 4 % (Anedra®). Con este fin, se utiliza un equipo semi-automático de determinación de nitrógeno (FOSS TECATOR®). El amoniaco recogido es luego titulado con ácido clorhídrico (Merck®) 0,2 N valorado con Bicarbonato de sodio (Anedra®). Paralelamente a las muestras, se ensayan dos blancos y una muestra estándar de concentración conocida de N-Acetanilida (Merck®).

Cálculo del % Nitrógeno = $(V \times N)_{(HCl)} \times 1,4007 / g$ de muestra, % Proteínas = % Nitrógeno $\times 6,25$

V = volumen de ácido clorhídrico utilizado. N = normalidad del ácido clorhídrico

c. Determinación de la Concentración de Colágeno Total

Como una medida indirecta de la concentración de colágeno total contenido en el tejido, se determinó la concentración de Prolina e Hidroxiprolina (aminoácidos característicos y mayoritarios de esa proteína) utilizando el método espectrofotométrico descrito por Kolar (1990).

La técnica para la determinación de colágeno consiste en hidrolizar la muestra con ácido sulfúrico 7N (Sintorgan®), en relación 1:10 en frascos Erlenmeyer semicubiertos con vidrio de reloj, a una temperatura de 105° C durante 14 h, para lo cual se utilizó una estufa OVA-031 (SANYO-Gallenkamp®). Luego de la digestión, los hidrolizados se filtraron a través de papel Whatman N° 41. La hidroxiprolina contenida en el filtrado fue oxidada al pirrol correspondiente, por el agregado de cloramina T (Anedra®). Una vez completada la oxidación, se le adicionó el reactivo 4-dimetilamino-benzaldehído (Anedra®) y se lo incubó durante 15 min. a una temperatura de 60 °C. La combinación de este reactivo con el pirrol produce un color rojo-púrpura que absorbe a 560 nm. La absorbancia fue medida en espectrofotómetro UV-VIS Lambda-Bio-20 (Perkin Elmer®). Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con una curva de calibración realizada bajo las mismas condiciones con un estándar de L-hidroxiprolina (BDH Chemicals®).

$$\text{Cálculo del contenido de Hidroxiprolina (H)} = H \text{ (g /100 g)} = (h \times 2,5) / (m \times V)$$

h = μg de hidroxiprolina obtenidos a partir de la curva de calibración.

m = peso de la muestra (g). V = volumen del filtrado utilizado (ml)

$$\text{Cálculo del contenido de Colágeno (C)} = C \text{ (g / 100 g)} = H \times 8$$

Etapas 2. Preparación de extractos homogéneos y Aislamiento de los Componentes de Importancia Biológica de las Dermis.

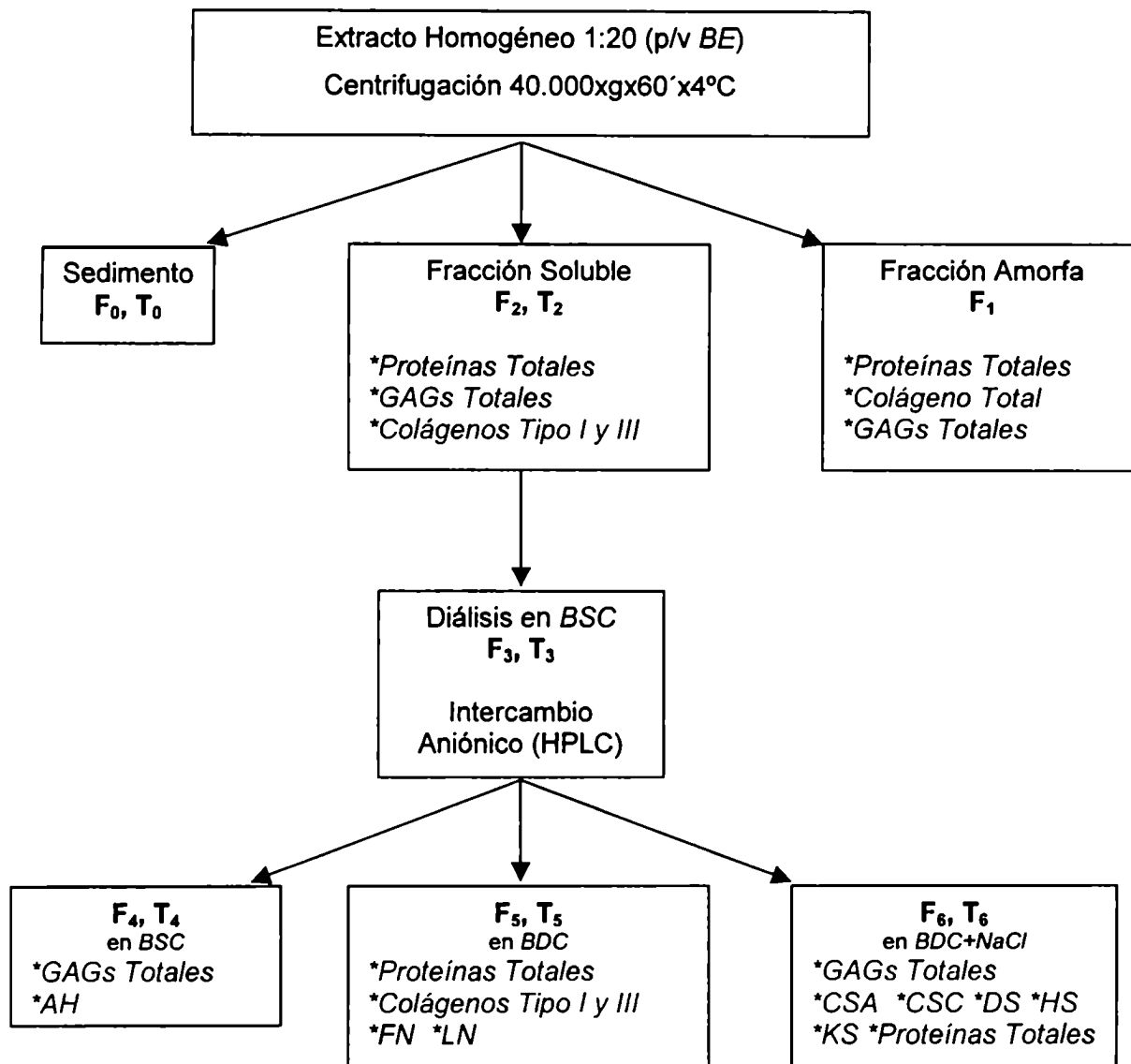
Dada la complejidad estructural de las muestras a analizar, fue necesario asegurar una correcta disgregación del tejido, y una adecuada solubilización y extracción de las macromoléculas a estudiar. Para cumplir con este objetivo, se utilizó una fuerza mecánica importante y un buffer con características disociantes.

En el caso de las muestras frescas, conservadas a -70 °C, se utilizaron porciones de aproximadamente 2 g de dermis. Estas porciones fueron pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido, mediante un sistema de émbolo y pistón metálicos de grandes proporciones, a fin de asegurar una magnitud de presión que permitiera el pulverizado completo. En el caso del producto tratado (en parche), éste fue primeramente congelado en nitrógeno líquido, y luego sometido al mismo tratamiento que la dermis fresca.

Los pulverizados así obtenidos, se resuspendieron, individualmente, en el Buffer de Extracción (BE) en una relación 1:20 (tejido:buffer), y luego se homogenizaron en un equipo Ultraturax - IKA® a una velocidad de 10.000 rpm en cinco intervalos de 10 seg. cada uno, mantenidos en baño de hielo (Carney, 1986). (Esquema 1).

BE: Acetato de Sodio (Anedra®) 0,05 M pH:5,8, Cloruro de Guanidina (Merck®) 4 M e inhibidores de proteasas: Benamidina 10 mM, Maleimida 1 mM, Pepstatina 0,1 mM, EDTA 0,05 M, Ácido Caproico 4 mM, PMSF 1 mM (Sigma®).

Esquema 1



La extracción de los componentes de interés (proteínas y PGs) a partir de los homogenatos, se llevó a cabo mediante agitación constante durante 18 h a 4 °C. Al finalizar la misma, el extracto se centrifugó a 40.000 x g x 60 min. a 4 °C en centrífuga refrigerada marca SIGMA 3K30.

Luego de la centrifugación, en la *piel fresca* se obtuvieron tres zonas bien definidas:

- Un sedimento de volumen pequeño (F₀).
- Un fracción de consistencia gelatinosa y volumen considerable (F₁), en la zona intermedia del tubo, que fue denominada fracción amorfa.
- Un sobrenadante (F₂) denominado fracción soluble.

En cambio en la *piel tratada*, tanto en “polvo” como en “lámina”, se encontraron:

- Un sedimento de volumen pequeño (T_0).
- Un sobrenadante (T_2).

En todos los casos el sedimento fue descartado ya que correspondía al tejido no disgregado. Las dos zonas restantes fueron aisladas y analizadas para sus componentes por separado.

Sobre la fracción F_1 se determinó, la concentración de proteínas totales por el método de Kjeldahl (Price *et al.* 1994), y la de colágeno por el método de Kolar (1990), además se cuantificaron los PGs mediante una técnica colorimétrica que utiliza el reactivo de Alcian Blue, el cual cuantifica los GAGs presentes (Whiteman, 1973).

Las fracciones solubles (F_2 y T_2), correspondientes a los sobrenadantes de la extracción, fueron reservadas para los análisis posteriores. Estas fracciones fueron procesadas y analizadas con el objeto de separar y estudiar los componentes de interés.

El método seleccionado para la separación de los componentes consistió en una cromatografía de intercambio aniónico (Antonopoulos, *et al.* 1974).

Primeramente, mediante el procedimiento de diálisis, se reemplazó el buffer de extracción por el Buffer de Siembra para Cromatografía (BSC). Esta se llevó a cabo a una temperatura de 4°C durante 24 h con dos cambios de solución buffer, utilizando una membrana D-9777 MW12.000 (Sigma®).

BSC: Tris-HCl 10 mM pH:8, Urea 7 M.

En una columna de intercambio aniónico (IA) tipo Mono Q HR 5/5 (Pharmacia Biotech Supelco®) montada en un equipo de HPLC (Shimadzu® 10A) se sembró una alícuota de cada una de las fracciones dializadas (F_2 y T_2). La columna de separación fue equilibrada previamente con el BSC.

Dado que el AH no posee grupos sulfato y no se encuentra unido a proteínas, este fue entonces eluido con el BSC y por lo tanto recolectado inmediatamente después de sembradas las muestras. Las fracciones de ambas dermis, fresca y tratada, fueron recogidas mediante el uso de un colector de fracciones Modelo 2110 (Bio Rad®) y denominadas F_4 y T_4 respectivamente. El resto de los componentes de interés biológico de la dermis en cambio, fue retenido en la columna de IA debido a sus características estructurales. Las proteínas de ambas fracciones fueron eluidas de la columna, al principio de la cromatografía, con el Buffer de Desarrollo de la Cromatografía (BDC), la separación de las proteínas de la matriz se produjo por el cambio de pH de 8 (BSC) a 4,5 (BDC). Estas macromoléculas fueron luego recogidas en el colector de fracciones y nombradas F_5 y T_5 .

BDC: Cítrico/Citrato 10 mM pH:4,5, Urea 7 M

Finalmente aquellos PGs que poseían grupos sulfato, fueron eluidos de la columna con la ayuda de un gradiente de Cloruro de Sodio 0-1,5 M, y las fracciones recolectadas se denominaron F₆ y T₆.

Todas las fracciones fueron dializadas contra buffer Tris-Acetato 0,05 M pH 6,0 utilizando una membrana D-9777 MW12.000 (Sigma®). Cabe destacar que luego de la diálisis se mantuvo la denominación original (F₄, T₄, F₅, T₅, F₆, y T₆) de las respectivas fracciones para evitar confusión.

Etapas 3. Identificación y Cuantificación de Colágenos Tipo I y III en las Fracciones Correspondientes

La identificación de los Colágenos del tipo I y III se llevó a cabo en las fracciones solubles F₂ y T₂ y en las fracciones proteicas F₅ y T₅ mediante la técnica de Inmunoblot, y la cuantificación de los mismos se ensayó a través de la técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) en las mismas fracciones.

Primeramente las fracciones F2 y T2 fueron dializadas contra Buffer de Diálisis (BD) con el fin de reemplazar el cloruro de guanidina utilizado para la extracción. La diálisis se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C durante 24 h con dos cambios de solución buffer, utilizando una membrana de diálisis D-9777 MW12.000 (Sigma®).

BD: Tris-HCl 10 mM pH:8, Urea 7 M

a. Identificación de Colágenos Tipo I y III Mediante la Técnica de Inmunoblot

Las muestras a analizar se desarrollaron en una electroforesis en condiciones disociantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), mediante la técnica propuesta por Laemmli (1970). El gel separador utilizado fue de 7,5 % y el concentrador de 4 %, incluyendo Urea 0,5 M en la preparación de los mismos (Broek *et al.*, 1985). Las fracciones fueron previamente sometidas a tratamiento térmico (5 min. a 100 °C) en el Buffer de Siembra (BS). En cada gel se sembraron aproximadamente 20 µg de proteínas de las diferentes fracciones y los patrones correspondientes. La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Lowry (1951).

BS: Buffer Fosfato 0,01 M, pH 7,2, SDS 0,2 %, Urea 5 M, Azul de Bromofenol 0,01 %,

La electroforesis se desarrolló en una cuba Mini Protean II vertical (BioRad®), conectada a una fuente de poder E-400V (Pharmacia®) a una corriente constante de 30 mA, durante aproximadamente 1 h. Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ (Sigma®) mediante el Buffer de Transferencia (BT) en un accesorio de electrotransferencia (Bio Rad®) a 100 V durante 1 h (Towbin, *et al.*, 1979). Luego, se llevó a cabo el proceso de inmunoblotting según la técnica descrita por Neale *et al.*, (1994), con modificaciones desarrolladas en el laboratorio e incluidas en esta tesis (a continuación se detalla brevemente).

BT: Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, Glicina 0,192 M, Metanol 20 %.

Las membranas fueron sumergidas en Buffer de Bloqueo (BB), durante 1 h a temperatura ambiente (TA). La siguiente incubación, también a TA y durante 1 h, se realizó en presencia de los correspondientes primeros anticuerpos: Anti-Colágeno tipo I y Anti-Colágeno tipo III, diluidos en BB en relación 1/10.000 y 1/4.000 respectivamente. Luego de efectuar 5 lavados de las membranas (30 segundos cada uno) con Buffer de Lavado (BL), éstas fueron incubadas durante 1h a TA en presencia del segundo anticuerpo Anti-IgG biotinilado de conejo, en una dilución 1/2.000 en BB, luego fueron lavadas en las mismas condiciones. Finalmente, se realizó una nueva incubación de 1h a TA en presencia de Peroxidasa (1/1.000 en PBS-BSA 1 %), seguido de 4 lavados con BB y un último lavado con el Buffer de Revelado (BR). Para el procedimiento de revelado se utilizó Diaminobencidina 0,2 % en HCl 0,5 M, (dilución 1/200 en buffer Tris 100 mM pH 7,2), y agregado de H₂O₂ 30 % (en dilución 1/3.000), en esta mezcla fueron sumergidas las membranas e incubadas a TA hasta obtener el color de fondo (2 a 3 minutos). La reacción se detuvo por lavado con agua destilada.

BB: 5 % de Leche en Polvo descremada y 0,02 % de Tween 20 en buffer PBS.

BL: PBS y 0,02 % Tween 20.

BR: Dietanolamina 10 % en agua, MgCl₂ 0,5 mM.

Una vez obtenida la coloración deseada, se secaron las membranas y se fotografiaron, para luego ser analizadas por densitometría en un equipo GS-800 (Bio Rad®) mediante el programa Quantity One.

b. Determinación Cuantitativa de Colágenos Tipo I y III Mediante el método de ELISA

Con el objeto de cuantificar ambos tipos de colágeno, y siguiendo el principio de la técnica de ELISA, se evaluó la metodología más adecuada para aplicarla en estas muestras en particular. Con este fin se propuso el modelo de inmunoensayo enzimático en fase sólida, no competitivo (Tijssen, 1985).

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos, fondo plano (Coming®), y estándares de colágeno porcino tipo I y tipo III (ICN®).

Las muestras dializadas, y los estándares se diluyeron en Buffer de Dilución para ELISA (BDE), y con los estándares se diseñaron las curvas de calibración correspondientes. Tanto las muestras como los estándares, se acoplaron primeramente al poliestireno, y se incubaron a TA durante 1 h. A continuación se lavaron en dos oportunidades con el BL, y se bloquearon los sitios libres del poliestireno con BB, durante 45 minutos a TA. Luego de lavar 4 veces con BL, se agregaron los primeros anticuerpos, Anti-Colágeno tipo I ó Anti-Colágeno tipo III (diluidos en BB 1/2.000 y 1/200 respectivamente), y se incubaron a TA durante 90 minutos. Seguidamente se lavaron los pocillos 4 veces con BL, se incorporó el segundo anticuerpo Anti Rabbit IgG biotinilado (diluido 1/1.000 en BB), para ser incubado a TA durante 1 h. Luego de lavar 4 veces con BL, se agregó Extravidina Fosfatasa Alcalina (dilución 1/2.000 en BB) con BSA 1 mg/ml, y se incubó 45 minutos a TA. Seguida de esta incubación, se lavó sucesivamente con BL y BR y se reveló con p-Nitrofenolfosfato (1 mg/ml en BR), incubando a TA y protegido de la luz, hasta aparición de color amarillo. La reacción se detuvo con NaOH 0,1 N y se procedió a la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Spectra Count (Packard®). La concentración de ambos tipos de colágeno se determinó por comparación de los valores obtenidos con las curvas de calibración, de los estándares correspondientes.

BDE: NaCO₃ 50 mM, Urea 4 M, pH 9,5

Etapas 4. Identificación y Cuantificación de las Proteínas (FN y LN) en las Fracciones Correspondientes.

En las fracciones F₅ y T₅ se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976). Luego se identificaron y cuantificaron las proteínas LN y FN, mediante las técnicas de Inmunoblot y ELISA.

Dada la especificidad de los anticuerpos utilizados para analizar estas proteínas, no fue necesario enriquecer estas fracciones (F₅ y T₅) en LN y FN con el fin de estudiarlas cualitativa y cuantitativamente.

a. FN**a.1. Identificación de FN Mediante la Técnica de Inmunoblot**

Con el objeto de obtener la separación de las proteínas presentes en las fracciones F₅ y T₅, éstas se sembraron y desarrollaron en una electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE) según la metodología descrita por Laemmli (1970), utilizando un gel separador de 7,5 % y uno concentrador de 4 %. El desarrollo de la electroforesis fue similar al descrito en el punto 3.a..

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 40 µm (Sigma®) mediante el accesorio de electrotransferencia Mini Trans Blot (Bio Rad®) a 100 V durante 1 h, en presencia del buffer BT (Towbin, *et al.* 1979).

Realizada la transferencia, se procedió a identificar la proteína mediante la técnica de Inmunoblot. Para ello, las membranas fueron sumergidas en BB durante 1h a TA, la incubación siguiente a TA (1 h) se realizó con el primer anticuerpo Anti-FN (conejo) diluido 1/300 en BB. Luego de 5 lavados con BL, éstas fueron incubadas (1h, TA) con el segundo anticuerpo Anti-IgG Biotinilado (conejo), en una dilución 1/2.000 en BB. Los pasos siguientes fueron similares a 3.a.. Luego se realizó una incubación de 1h a TA con la enzima Peroxidasa (1/1.000 en PBS-BSA 1 %), y se continuó con los lavados como en 3.a.. Para el revelado se utilizó diaminobencidina 0,2 % en HCl 0,5 M (1/200 en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,2) + H₂O₂ 30 % (1/3.000), se incubaron las membranas a TA hasta observar color de fondo (2 a 3 minutos). La reacción se detuvo por lavado con agua destilada.

Una vez obtenida la coloración deseada, se secaron las membranas y se fotografiaron, para luego ser analizadas por densitometría en un equipo GS-800 (Bio Rad®) mediante el programa Quantity One.

a.2. Determinación Cuantitativa de FN Mediante el Método de ELISA

Dada las características de adhesión de esta proteína se probaron distintos tipos de soportes para realizar la reacción inmunológica. Se demostró que la reacción no podía llevarse a cabo en placas de poliestireno, ni aún activadas con glutaraldehído, ya que el porcentaje de adhesión fue escaso.

En cambio, el mejor soporte resultó ser la membrana de nitrocelulosa, la cual fue insertada en una placa desarmable de 96 pocillos adosada a una bomba de vacío.

Se utilizó para este ensayo un estándar de FN (suero porcino), el cual fue previamente purificado en una columna de Gelatina-Sefarosa (Ruoslahti, *et al.*, 1982). La concentración del estándar purificado se determinó por el método de Bradford (1976).

Las muestras F_5 y T_5 se diluyeron previamente 1/50 en *BDE*, el estándar de FN se diluyó en el mismo buffer de manera de abarcar el rango de 0,6 a 24 ng, luego, la totalidad de las diluciones se incluyó en las tiras de nitrocelulosa ancladas a la placa desarmable.

Luego de aplicar vacío durante un par de minutos, la placa se desarmó y se retiró la membrana de nitrocelulosa conteniendo las muestras ya fijadas. Una vez identificadas las zonas de siembra sobre la membrana, fueron recortadas y colocadas en tubos de vidrio individuales donde se llevó a cabo la reacción enzimo-inmunológica. Esta comenzó mediante la incubación de las membranas en *BB* durante 30 min a TA, de aquí en más se continuó con la técnica de ELISA tradicional descrita en **a.3.**

Los anticuerpos utilizados fueron Anti-FN de cabra (1/4.000) como primer anticuerpo, y Anti IgG biotinilado (1/1.000) de cabra como segundo anticuerpo.

Una vez finalizada la reacción, una alícuota de 200 μ l de cada uno de los tubos se transfirió a placas de poliestireno para proceder a la lectura de la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Spectra Count (Packard®).

b. LN

Se evaluó tanto la presencia como la calidad de LN mediante la técnica de inmunoblot en las fracciones F_5 y T_5 . En este caso sólo se realizó un estudio semi-cuantitativo donde se compararon las concentraciones relativas de esta proteína en ambas fracciones.

b.1. Identificación de LN Mediante la Técnica de Inmunoblot

Las muestras a analizar, F_5 y T_5 , fueron sembradas y desarrolladas en una electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970), utilizando un gel separador de 7,5 % y uno concentrador de 4 %. El desarrollo de la electroforesis fue similar al descrito en la **Etapas 3.a.**

Una vez concluida la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma®) como se describió en la **Etapas 3.a.** Luego de esto, se llevó a cabo la técnica de inmunoblot, similar a la descrita para FN.

Los anticuerpos utilizados fueron Anti-LN (1/300) de conejo como primer anticuerpo y Anti-IgG biotinilado (1/2.000, conejo) como segundo anticuerpo. Una vez obtenida la coloración deseada, se secaron las membranas, se fotografiaron, y luego fueron analizadas por densitometría, en un equipo GS-800 (Bio Rad®) mediante el programa Quantity One.

b.2. Determinación Cuantitativa de LN Mediante el Método de ELISA

Se realizaron varios intentos para preparar una curva de calibración en el sistema de enzimoimmunoanálisis que permitiera cuantificar la LN y pocos fueron los resultados favorables. A pesar de que el ensayo previo de inmunoblot resultó exitoso, no se logró el mismo resultado en la placa de poliestireno donde se utilizaron cantidades crecientes del estándar. En cambio sí se logró desarrollar una metodología que permitiera realizar comparaciones semicuantitativas de las fracciones provenientes de dermis fresca y tratada.

Así, las fracciones F₅ y T₅ se diluyeron primero 1/50 en BD y luego se sembraron en tiras de nitrocelulosa ancladas a la placa desarmable y se continuó luego con la técnica descrita en **b.1.2**. Se utilizó Anti-LN (conejo, 1/4.000) como primer anticuerpo y Anti IgG biotinilado de conejo (1/1.000) como segundo anticuerpo. La enzima utilizada para el revelado fue Extravidina Fosfatasa Alcalina (1/1.000) y el procedimiento fue similar al descrito en **a.3**. Luego de obtenido el color deseado, se transfirió una alícuota de 200 µl de cada tubo de reacción a placas de poliestireno, con el objeto de realizar la lectura de absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Spectra Count (Packard®).

Etapas 5. Identificación y cuantificación de los GAGs en las Fracciones Correspondientes.

a. Determinación Cuantitativa de los GAGs Totales en las Fracciones Correspondientes.

Los GAGs totales fueron evaluados en las fracciones F₂, T₂; F₄, T₄ y F₆, T₆ mediante la técnica del reactivo Alcian-Blue (Whiteman, 1973) con el objeto de realizar comparaciones cuantitativas.

a.1. Determinación Cuantitativa de AH en las Fracciones Correspondientes.

La concentración de AH se determinó en las fracciones F₄ y T₄ mediante una técnica espectrofotométrica (Bitter & Muir, 1962; Dische, 1947) que utiliza carbazol como sustrato.

a.2. Determinación Cuantitativa de HS, CSA, CSC y DS en las Fracciones F₆, T₆

Para la determinación de la concentración de estos compuestos se recurrió a hidrólisis con enzimas específicas (Karamanos *et al.* 1994). Las enzimas utilizadas fueron Condroitinasa ABC (Sigma®), Condroitinasa AC (Sigma®), Heparitinasa (Sigma®) y Hialuronidasa de Streptomyces (Calbiochem®). La metodología consistió en determinar la concentración de los GAGs presentes antes y después de la hidrólisis mediante la técnica de Alcian Blue.

Dada la diferente susceptibilidad de los GAGs a estas enzimas, se obtendrán en cada caso productos cualitativamente diferentes, y mediante un sistema de ecuaciones se determinará la concentración de cada uno de los compuestos analizados.

Para este ensayo se tomaron 4 alícuotas de cada una de las fracciones F_6 y T_6 , conteniendo aproximadamente 2 μg de GAGs (determinación de GAGs totales **Etapla 5.a.**).

A las alícuotas, se les agregó 0,05 U de Condroitinasa ABC, ó 0,05 U de Condroitinasa AC, ó 0,5 U de Heparitinasa (diluidas en buffer Tris Acetato 0,5 M pH 7,5), ó 0,5 U de Hialuronidasa (diluida en buffer Acetato 0,2 M, pH 6). Luego de una incubación de 3 horas a 37° C, las reacciones se frenaron congelando las alícuotas, y sobre ellas se determinó la concentración de GAGs remanentes.

a.3. Determinación Cuantitativa de KS en las fracciones F_6 y T_6

La determinación de la concentración de KS se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA, siguiendo un modelo de inmunoensayo enzimático en fase sólida, no competitivo (Tijssen, 1985).

Para este fin, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos fondo plano (Corning®), las cuales fueron activadas previamente con glutaraldehído con el objeto de aumentar la adhesión del KS a la superficie de reacción. El tratamiento consistió en adicionar a todos los pocillos, 100 μl de glutaraldehído 0,25% en PBS, incubar 1 h. a 37°C, y realizar dos lavados con PBS, finalmente las placas se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

PBS: KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 8 mM, pH 7,4 $\pm$ 0,2

Se realizó una curva de calibración en el rango de 10 a 200 ng , con un estándar de KS (Sigma ®) preparado en BDE. Una vez activadas las placas, tanto las muestras a analizar como las correspondientes a la curva de calibración, fueron acopladas a la misma mediante incubación de 1 h a TA. Se continuó con lavados sucesivos con BL, y posterior bloqueo con BB durante 1 h a TA. Luego de otra serie de lavados con BL, se adicionó el primer anticuerpo Anti KS (*ratón*, diluido 1/500 en BB), y se incubó 1 h más a TA.

Seguidamente se lavó la placa con BL, y se agregó el segundo anticuerpo Anti IgG (*ratón*) Biotinilado (diluido 1/500 en BB), para ser incubado a TA durante 1 h. Luego de nuevos lavados con BL se agregó Extravidina Fosfatasa Alcalina (dilución 1/1.000 en BB + BSA 1 mg/ml), e incubó 1 h a TA. El revelado se realizó con el reactivo p-Nitrofenolfosfato (1mg/ml) en BR, incubando a TA y protegido de la luz, hasta aparición de color amarillo. La reacción se detuvo con NaOH 0,1 N, y se registró la absorbancia leída a 405 nm en un lector de microplacas Spectra Count (Packard®).

CAPÍTULO I

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA

Etapas 1. Caracterización de las Dermis a Partir del Contenido de los Componentes Mayoritarios

a. Determinación del Porcentaje de Humedad

El contenido de humedad de los productos tratados, tanto en láminas como en polvo, resultó *no detectable*, mientras que el contenido de humedad en dermis porcina fresca (g / 100 g tejido fresco) fue alto.

% Humedad	Dermis
30,30 ± 1,99	Fresca
ND	Tratada

ND: no detectable

Este resultado sugiere que el proceso de liofilización al que fueron sometidas las dermis fue eficiente, logrando extraer completamente la humedad de las mismas. Además, confirma la necesidad de considerar estos valores para expresar los parámetros a determinar en ambas dermis (frescas y tratadas) en función de la cantidad de tejido seco (valores corregidos por el contenido de humedad), con el fin de hacer una comparación cuantitativa correcta de los componentes presentes.

b. Determinación de la Concentración de Proteínas Totales

Los valores de proteínas totales, expresados en g / 100 g de tejido seco, se muestran en la siguiente tabla:

% Proteínas Totales	Dermis
80,9 ± 2,2	Fresca
79,0 ± 2,2	Tratada

Estos resultados indican que el contenido de nitrógeno total determinado por la técnica de Kjeldahl (Price *et al.* 1994) no es significativamente diferente en ambas dermis ($p > 0,05$), por lo tanto se puede inferir que el contenido de proteínas totales en las dermis tratadas no fue alterado luego del tratamiento industrial aplicado.

c. Determinación de la Concentración de Colágeno Total

Los valores de colágeno, expresados por 100 g de tejido seco, se presentan en la siguiente tabla:

% Colágeno Total	Dermis
59,6 ± 1,6	Fresca
59,0 ± 1,6	Tratada

El análisis estadístico de los valores obtenidos establece que el contenido de esta proteína en ambas dermis no es significativamente diferente ($p > 0,05$). Este resultado permite asegurar que el proceso industrial al que fueron sometidas las mismas no alteró las concentraciones de Prolina e Hidroxiprolina. Si bien la concentración de estos dos aminoácidos es la que efectivamente se determina mediante el método de Kolar (1992) (Materiales y Métodos), a nivel internacional (J. AOAC) se acepta que Prolina e Hidroxiprolina se relacionan directamente con la concentración de colágeno total, por ende se puede inferir que la concentración de esta proteína en las muestras tratadas no fue modificada.

Conclusiones Etapa 1

- El tratamiento aplicado (que incluye liofilización) logra extraer completamente la humedad del tejido dérmico fresco.
- El porcentaje de humedad de la dermis fresca y tratada resultó significativamente diferente. En consecuencia a efectos comparativos, se decide expresar los análisis futuros como porcentaje de tejido seco.
- Tanto la concentración de colágeno (Prolina e Hidroxiprolina) como de proteínas (Nitrógeno Total) fue similar en ambas dermis (fresca y tratada), sugiriendo que el tratamiento aplicado no altera estos parámetros analizados.

Etapa 2. Preparación de Extractos Homogéneos y Aislamiento de los Componentes de Importancia Biológica de las Dermis.

Independientemente de las modificaciones realizadas durante el procedimiento de extracción de los componentes, luego de la aplicación de la centrifugación se obtuvieron, en ambas dermis dos fracciones: sedimento (F_0 , T_0) y soluble (F_2 , T_2), y sólo en la dermis fresca una tercera fracción de consistencia gelatinosa que se denominó fracción amorfa (F_1) (Esquema 1).

El sedimento (de volumen pequeño) se descartó dado que correspondía a tejido no disgregado. En la fracción amorfa obtenida de dermis fresca, se determinó la concentración de proteínas (Price *et al.* 1994), colágeno (Kolar, 1990) y GAGs (Whiteman, 1973).

Los resultados obtenidos fueron:

Proteínas Totales:	3,4 %
Colágeno Total:	2,3 %
GAGs Totales:	ND

Del total de proteínas del tejido fresco (80,9 %) la fracción amorfa contenía el 3,4 %, y del total del colágeno presente (59,6 %) esta fracción contenía el 2,3 %. Dado que en la composición de esta fracción se encontró casi exclusivamente el colágeno (68 %), se decidió no incluirla en los estudios posteriores y continuar sólo con la fracción soluble.

Aunque ha sido utilizado una gran variedad de solventes en la extracción y dispersión de los diferentes colágenos de los tejidos, los más comúnmente utilizados fueron las soluciones de sales neutras (0,15-2,0 M NaCl) o 0,5 M Ácido Acético, los que utilizados a bajas temperaturas, disocian las fibras de colágeno en moléculas monoméricas nativas. En contraste, el uso de agentes desnaturalizantes resulta generalmente en la extracción de largos agregados difíciles de resolver técnicamente (Miller *et al.*, 1982).

Debido a las condiciones empleadas (Urea 6 M; Guanidina HCl 4 M) en esta etapa para la extracción de los componentes de la dermis, es factible que se hubieran formado este tipo de agregados, separándose del resto de los componentes y generando la denominada fracción amorfa, la que, como fue demostrado, se componía casi exclusivamente de colágeno.

Las fracciones solubles (F₂, T₂), correspondientes a los sobrenadantes de la extracción, fueron reservadas para los análisis posteriores. En ellas se esperaba encontrar la totalidad de los componentes de importancia biológica de las dermis, debido a las condiciones disociantes empleadas y a los resultados de los estudios previos.

Una vez seleccionadas las fracciones de estudio, se procedió a evaluar el rendimiento de los posibles métodos de extracción. Con ese fin, se calculó el porcentaje de recuperación de los componentes de la dermis en función de la concentración de los GAGs presentes en la fracción soluble.

En el primer ensayo de preparación de los extractos homogéneos, se utilizó el buffer de extracción Acetato 0,05 M pH 5,8 en presencia de Urea 6 M como agente disociante, y un equipo de homogenización a una velocidad de 15.000 rpm. En estas condiciones se extrajo 0,2% de GAGs en la fracción soluble, siendo este rendimiento relativamente bueno.

Sin embargo, se llevó a cabo un ensayo posterior donde se reemplazó la Urea por Cloruro de Guanidina 4 M, y además se utilizó un equipo de homogeneización de mayor potencia (22.000 rpm), lográndose extraer en estas condiciones, un 1 % de los GAGs en esta misma fracción.

Sajdera y Hascall (1969) demostraron que la Urea era menos efectiva que el Cloruro de Guanidina en la extracción de los PGs, este resultado explicaría la mayor eficiencia obtenida en la segunda extracción donde la concentración de PGs se evaluó en forma indirecta mediante la determinación de la concentración de los GAGs. Los autores establecieron que a concentraciones 4 M o mayores este agente era capaz de disociar las estructuras formadas por agregados de PGs y permitir que los monómeros de PGs, proteínas de unión y AH difundan fuera del tejido. Por otro lado, Carney (1986) indica que al restablecerse las condiciones asociativas estos podrían reagregarse y formar la estructura de origen.

Habida cuenta de la complejidad estructural de la dermis, la cual presenta una red proteica perfectamente organizada que incluye a los proteoglicanos en su interior, se infiere que metodológicamente se torna dificultoso desorganizar esa estructura y obtener sus componentes en forma aislada. Si se considera además, que la concentración de proteoglicanos en piel humana es de aproximadamente 0,2 % expresada en tejido seco (Willen *et al.* 1991), es posible estimar que una extracción de 1 % de PGs (medida indirectamente por cuantificación de los GAGs) de la dermis porcina es óptima y en consecuencia se decidió aplicar el segundo método de extracción en los ensayos futuros.

Considerando que las condiciones de extracción podrían provocar cierto grado de proteólisis, particularmente de la secuencia corta no helicoidal de ambos extremos terminales NH_2/COOH (Chandrakasan *et al.*, 1976), el buffer de extracción utilizado fue adicionado con inhibidores de proteasas. Algunos de los utilizados con este fin fueron inhibidores de metaloproteasas (EDTA), de serina-proteasas (PMSF), de sulfidril-proteasas (NEM) y carboxil-proteasas (pepstatina).

Una vez definidas las condiciones de la extracción, se procesaron y analizaron las fracciones F_2 y T_2 con el objeto de separar y estudiar los componentes de interés.

En un primer ensayo de separación se aplicó la técnica de cromatografía de intercambio aniónico, con este fin las fracciones F_2 y T_2 fueron suspendidas en buffer Tris-HCl 10mM pH 8, Urea 7 M, sembradas luego en una columna Mono Q (Pharmacia 5/5) equilibrada con el mismo buffer y procesadas en un equipo HPLC.

Inmediatamente después de la siembra, se eluyeron los componentes más débilmente retenidos con metil-piperazina a pH 4,5 en presencia de Urea 7M, y los compuestos fuertemente retenidos en la columna se eluyeron con un gradiente de LiCl 0-1,5 M.

A diferencia de lo esperado, el cromatograma obtenido (Figura 1) mostró un único pico en la zona del gradiente.

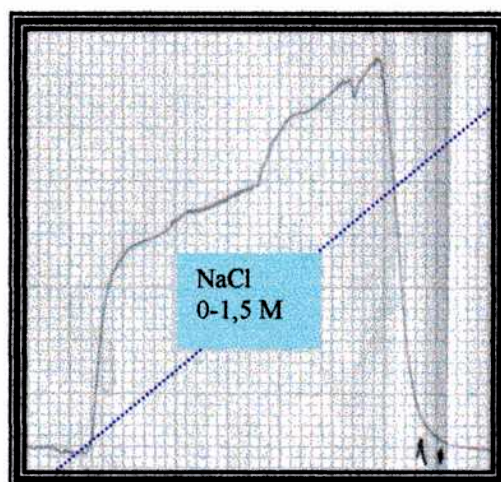


Figura 1:

Cromatograma obtenido del análisis de la Fracción F_2 mediante HPLC (intercambio aniónico).

Por las condiciones utilizadas se estimaba en cambio, que este procedimiento separaría algunos componentes en el primer eluido y en forma gradual se irían separando otros componentes con el gradiente. La fracción que incluyó este único pico fue colectada y analizada, mostrando la presencia de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), GAGs (Whiteman, 1973) y Ácidos Nucleicos (Absorbancia 260 nm). Esta metodología se consideró en consecuencia no satisfactoria, ya que no logró separar estos compuestos.

En función de estos resultados poco favorables, en los que no sólo no se separaron los componentes (PGs, Proteínas, Ácidos Nucleicos, etc.) entre sí, sino que además los posibles PGs eluyeron todos juntos, se decidió aplicar el método de electroforesis en geles de poliacrilamida-agarosa con el fin de aislar los PGs del resto de los componentes y resolverlos entre sí. De esa manera, las fracciones solubles F_2 y T_2 , fueron dializadas contra Urea 4 M previo a ser analizadas mediante la electroforesis.

Los geles utilizados contenían 2 % de poliacrilamida, 1 % de agarosa (Seakemgold), 0,4% de Tritón X-100 y Urea 4 M. La electroforesis se desarrolló en buffer Tris-Acetato 0,04 M, Sulfato de Sodio 1 mM pH 6,8 y Urea 4 M, durante 5 h a 85 V. El gel fue teñido con una solución de Alcian Blue (0,3 mg/ml) en Ácido Acético (7 %) y $MgCl_2$ (50 mM), para luego ser decolorado con Ácido Acético 3 %.

Esta técnica es considerada una herramienta muy útil en la separación y evaluación cualitativa de los PGs o en la detección de sus alteraciones. McDevitt y Muir (1971) formaron geles estables incluyendo agarosa en una concentración de 0,5-1 % logrando así mantener su rigidez y obtener un tamaño de poro tal que permitiera la inclusión de los PGs. En esta matriz los PGs poseían densidad de carga similar y por lo tanto se movían a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño molecular.

El resultado obtenido mediante este sistema tampoco fue exitoso (Figura 2), ya que en la electroforesis no se obtuvo la resolución esperada, y no se logró la cuantificación relativa de los distintos PGs. Es posible que esta dificultad se deba a la diversidad y a la cantidad de GAGs unidos a la proteína, los cuales no permiten una buena separación de los PGs.

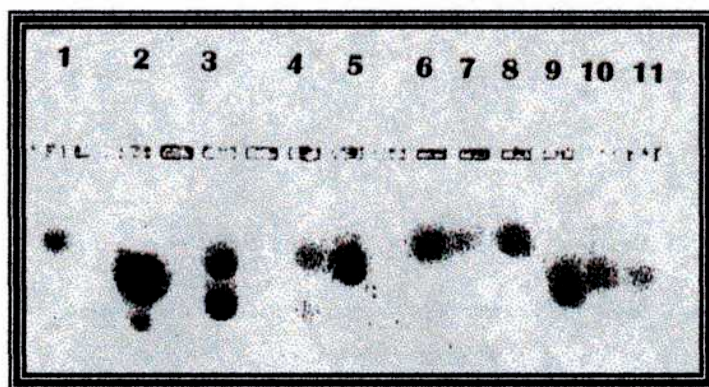


Figura 2:

Electroforesis en gel de Agarosa de las fracciones solubles F_2 y T_2 . Las líneas del 1 al 6 corresponde a estándares de Pgs enriquecidos en los GAGs siguientes: HA, KS, HS, CSC, CSA, DS ; L7: F_6 ; L8: T_6 ; L9: F_2 ; L10: T_2 (15 ug); L11: T_2 (7 ug)

Nuevamente se presentó la necesidad de proponer una técnica diferente a fin de separar los compuestos incluidos en estas fracciones. El método finalmente seleccionado (Materiales y Métodos), consistió en una nueva cromatografía de intercambio aniónico (mediante HPLC) llevada a cabo bajo otras condiciones. De este modo, las fracciones se sembraron en buffer BSC (Tris-HCl 10 mM, pH 8, Urea 7 M), la cromatografía se desarrolló en buffer BDC (Cítrico/Citrato 10 mM pH 4,5 + Urea 7M) y los componentes fuertemente adheridos a la columna se eluyeron luego utilizando un gradiente de NaCl 0-1,5 M.

La aplicación de esta metodología mejoró notablemente los resultados, los PGs pudieron ser aislados perfectamente de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

El cromatograma (Figura 3) mostró tres picos bien definidos en cada uno los extractos analizados, los cuales fueron denominados: F_4 y T_4 ; F_5 y T_5 ; F_6 y T_6 , según el orden de elución.

Es importante destacar que si bien esta metodología permite separar y aislar PGs, es objetivo de esta etapa de la tesis lograr cuantificar los GAGs presentes en las dermis, en forma individual o en conjunto, a fin de estudiar la contribución de este constituyente mayoritario de los PGs en la acción del sustituto dérmico como agente terapéutico. Por lo tanto, en las tres fracciones colectadas de la cromatografía se determinaron además de Proteínas Totales (Lowry, 1951), los GAGs totales (Whiteman, 1973).

Se comprobó en las fracciones F_4 , T_4 , F_6 y T_6 la presencia de GAGs, y en las fracciones F_5 , T_5 , F_6 y T_6 la presencia de proteínas, sin embargo la concentración de proteínas correspondiente a las fracciones 6, fue considerada despreciable en comparación con el resto de los componentes. Ninguna de estas fracciones contenía cantidades apreciables de ácidos nucleicos.

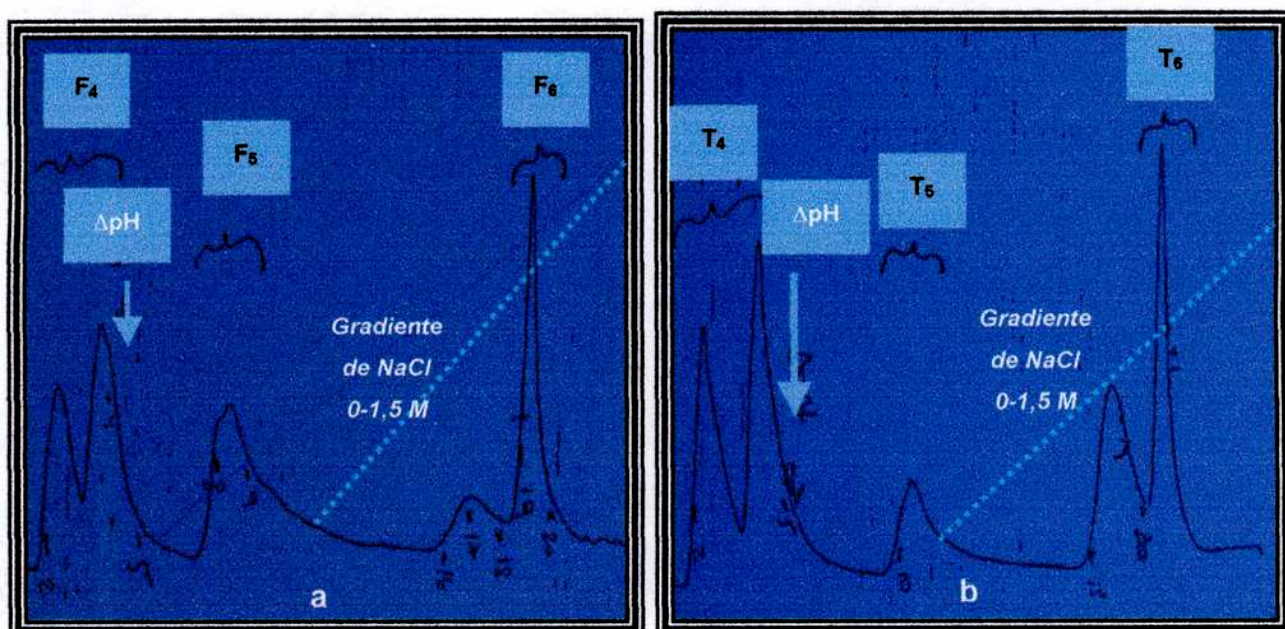


Figura 3:

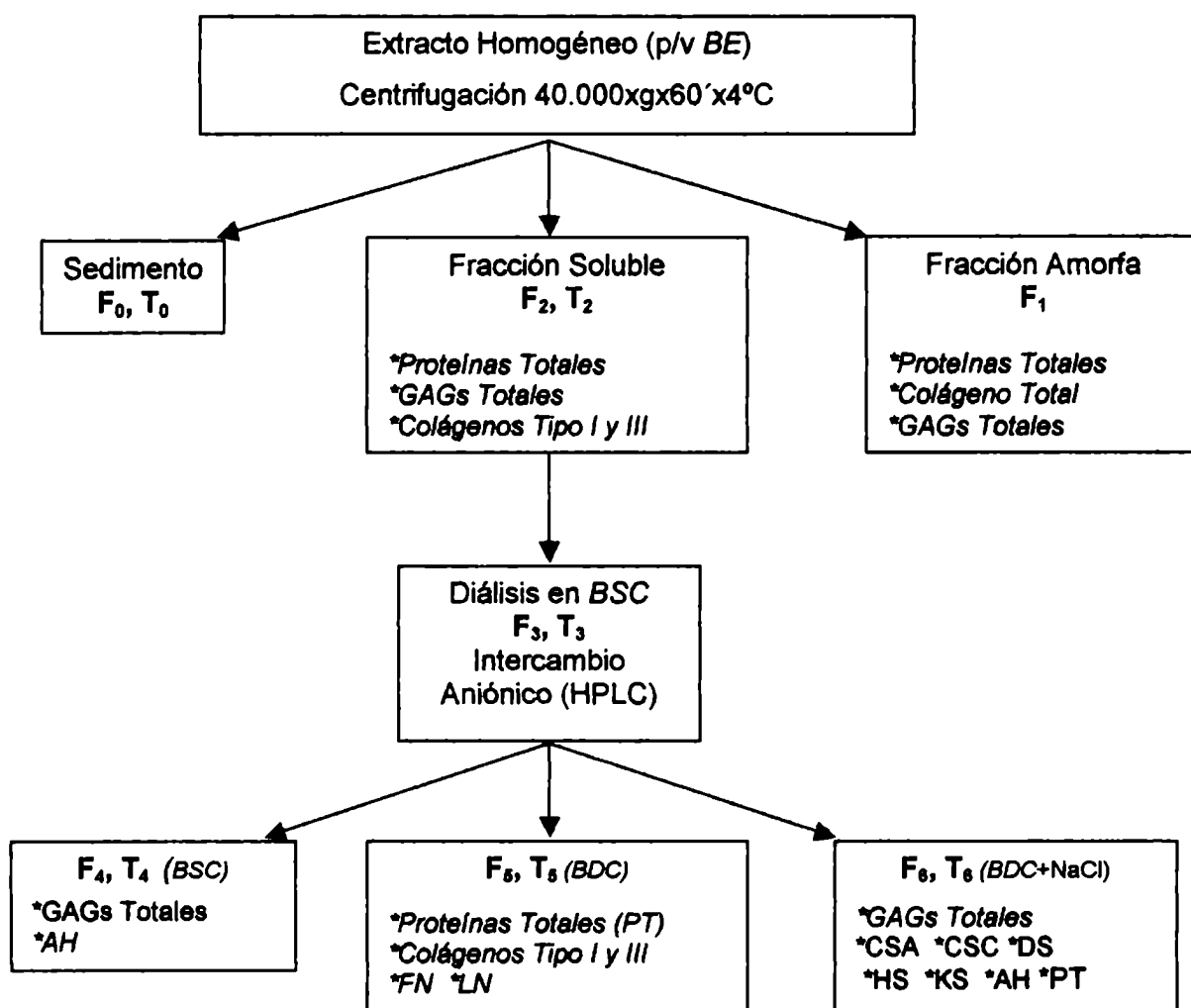
Perfiles de elución de la cromatografía de intercambio aniónico, **a**: dermis fresca, **b**: dermis tratada. Se indican los cambios de buffer (ΔpH), y el gradiente de NaCl.

Este perfil cromatográfico fue coincidente con el de Antonopoulos (1974). En él se describe que, las fracciones que eluían con el buffer de siembra de pH 8 (F_4 , T_4 en esta tesis) correspondían a moléculas no cargadas (por ej. PGs que no poseen grupos sulfatos como el AH) y por ende no pueden ser retenidos en la columna; las fracciones que se eluían al modificar el pH del buffer a 4,5 (F_5 , T_5 en esta tesis) correspondían a moléculas que poseen una densidad de carga negativa relativamente baja a pH 8 (proteínas varias), las cuales son retenidas débilmente. Las últimas fracciones eluidas (F_6 , T_6 en esta tesis) incluirían, entre otras posibles moléculas, a los PGs, los cuales por su alta concentración de grupos carboxilo y sulfatos son fuertemente retenidos en la columna de intercambio y por lo tanto requieren de un gradiente de sales para ser eluidos.

En general la cromatografía de intercambio es considerada un valioso método de purificación de PGs, particularmente cuando son extraídos de tejidos con una proporción de PGs a proteínas totales relativamente baja. Otra técnica de purificación, como por ejemplo la centrifugación por gradiente de densidad isopícnico ha presentado problemas en la correcta separación de las proteínas contaminantes las cuales estarían asociadas a PGs mediante interacciones no covalentes (Yanagishita y Hascall, 1983).

Los resultados obtenidos en esta etapa de la tesis, con la aplicación de la cromatografía de intercambio aniónico, muestran que se obtuvo una excelente separación de los componentes mayoritarios de la dermis, por lo tanto el esquema de aislamiento propuesto (Esquema 1) fue considerado exitoso, y a partir de allí se continuó con el análisis de cada uno de los componentes presentes en las diferentes fracciones.

Esquema 1



Conclusiones Etapa 2

- Se estableció la metodología a aplicar para la preparación de los extractos homogéneos de la dermis (Materiales y Métodos).
- Se optó por la aplicación de cromatografía de intercambio aniónico por HPLC, y posterior elución de los compuestos por cambio de pH y gradiente de NaCl 0-1,5 M para lograr la separación de los componentes mayoritarios.
- Se delineó el esquema final de extracción y aislamiento de los componentes mayoritarios de la dermis porcina (Esquema 1).

Etapa 3. Identificación y Cuantificación de Colágenos Tipo I y III en las Fracciones Correspondientes

El colágeno es la proteína más abundante de origen animal, en general comprende el 30% de la proteína total de los tejidos. Esta proteína confiere fundamentalmente integridad estructural a la MEC. Si bien existen al menos 19 variantes de colágenos denominadas tipo I a XIX, los tipos más abundantes encontrados en tejido dérmico son el tipo I y III (Linsenmayer, 1991; Geneser, 2000c).

El tipo I se encuentra en todo tejido conectivo, es un heterotrímero formado por dos cadenas $\alpha 1$ y una $\alpha 2$, compuesto mayoritariamente por Glicina, bajas cantidades de Tirosina e Histidina y no contiene Triptofano o Cisteína (Muyonga *et al.*, 2004)

El colágeno tipo III, es un homotrímero compuesto por cadenas $\alpha 1$ unidas entre sí por uniones puente disulfuro, posee un alto contenido de Hidroxiprolina, Glicina y Cisteína (Linsenmayer, 1991).

La concentración de ambos tipos de colágenos fue analizada en las fracciones solubles (F_2 y T_2) y en las eluidas con buffer pH 4,5 de la columna de intercambio (F_8 , T_8), la identificación y cuantificación de los diferentes tipos de colágenos fue realizada mediante las técnicas de inmunoblot y ELISA respectivamente. Debido a la alta especificidad de las técnicas utilizadas, no fue necesaria la separación previa de los colágenos entre sí, ni del resto de los posibles compuestos contaminantes presentes en las fracciones.

a. Identificación de Colágenos Tipo I y III Mediante la Técnica de Inmunoblot

En la Figura 4, correspondiente al análisis del colágeno tipo I, se observa que este tipo de colágeno está efectivamente presente en las fracciones F_2 y T_2 , y que la concentración en ambas es similar (cuantificación posterior por la técnica de ELISA).

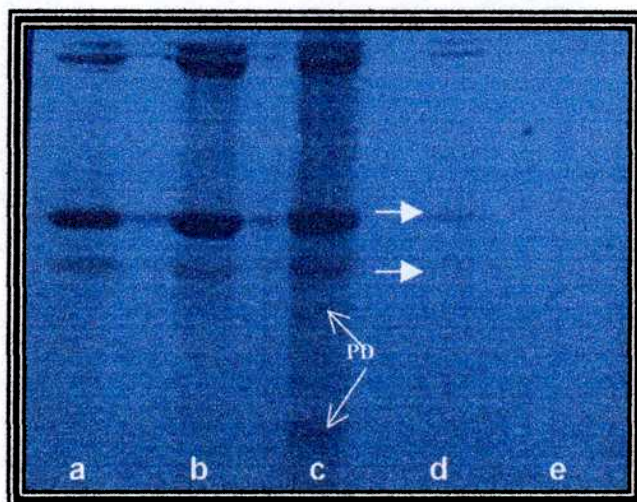


Figura 4:

Resultado del Inmunoblot de Colágeno tipo I.

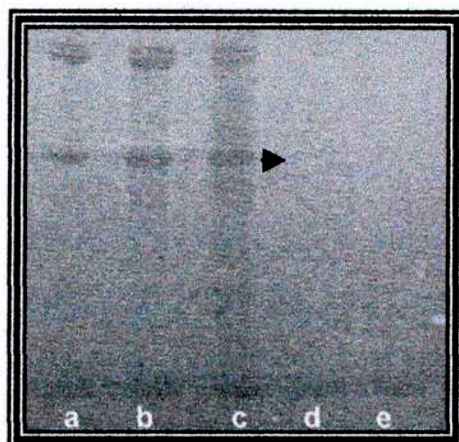
a: estándar de colágeno tipo I, b: F_2 , c: T_2 , d: F_5 , e: T_5 (PD: productos de degradación.)

Al comparar con las bandas características del estándar, se observa en el caso de T_2 (dermis tratada) una serie de bandas de PM intermedios, las cuales se consideran productos de degradación (PD) del colágeno. Presumiblemente dicha degradación se debió al efecto del tratamiento aplicado a la dermis.

El análisis de las fracciones recolectadas como fracciones proteicas (F_5 y T_5) en la separación cromatográfica, indica que prácticamente no hay diferencias entre los perfiles de sus bandas, y tampoco se detectaron PD.

Estos resultados sugieren, primeramente, que el colágeno tipo I está presente en ambas dermis (fresca y tratada) y además que el proceso al que fue sometida la dermis tratada, produjo posiblemente degradación de parte del colágeno. Esta degradación no se hizo evidente en una fracción más purificada (F_5 y T_5), posiblemente porque los productos de degradación fueron excluidos durante el proceso de extracción / purificación.

La Figura 5, muestra la presencia de colágeno tipo III tanto en las fracciones solubles F_2 y T_2 como en las fracciones proteicas F_5 y T_5 . En el primer caso ambas fracciones solubles dieron perfiles similares entre sí y al estándar correspondiente, y las concentraciones no mostraban ser diferentes (cuantificación posterior por la técnica de ELISA). En el caso de las fracciones F_5 y T_5 , si bien se detectó la presencia de colágeno tipo III, la bajísima intensidad de las bandas sugiere una muy baja concentración de este colágeno, indicando que el procedimiento utilizado para la obtención de las fracciones (F_5 y T_5) produjo pérdida de esta proteína.

**Figura 5:**

Resultado del Inmunoblot de Colágeno tipo III.

a: estándar de colágeno tipo III, b: F_2 , c: T_2 , d: F_5 , e: T_5 .

b. Determinación Cuantitativa de Colágenos Tipo I y III mediante el Método de ELISA

La determinación cuantitativa de los colágenos en las fracciones F_2 y T_2 ; y F_5 y T_5 , se muestra en la siguiente tabla, en la cual los resultados se expresan por 100 g de tejido seco.

% Colágeno Tipo I	% Colágeno Tipo III	Fracción
$10,73 \pm 1,80$	$48,68 \pm 6,50$	F_2
$7,49 \pm 1,80$	$38,40 \pm 6,50$	T_2
$0,31 \pm 0,02$	$3,40 \pm 0,50$	F_5
$0,16 \pm 0,02$	$1,60 \pm 0,50$	T_5

En las fracciones solubles F_2 y T_2 , puede observarse que para un mismo tipo de colágeno (I o III), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la dermis fresca y la tratada. Este mismo resultado se observó en la fracción más purificada F_5 y T_5 . Sin embargo, en todas las fracciones se evidencia una tendencia (no estadística) a encontrar menor concentración de ambos colágenos en la piel tratada. Esta tendencia corrobora lo hallado en el punto a. (Inmunoblot), donde se postula una probable acción negativa del tratamiento al que fueron sometidas las dermis comerciales, sobre la estabilidad estructural de la molécula.

Por otro lado, al comparar ambos tipos de colágenos entre sí en todas las fracciones analizadas, se observa que el de mayor concentración corresponde siempre al colágeno tipo III.

La aplicación de los procedimientos descriptos en Materiales y Métodos para purificar las fracciones proteicas F_5 y T_5 , produjo una pérdida importantísima de ambos tipos de colágeno, manteniéndose no obstante las proporciones entre ambos (fracción 2 vs fracción 5).

Estos resultados corroboran en parte lo encontrado al identificar ambos colágenos por la técnica de inmunoblot.

Al utilizar estos resultados para el cálculo de la proporción de colágeno de las fracciones F_2 y T_2 en relación con la cantidad de colágeno total en la dermis, se evidencia que prácticamente todo el colágeno total (*Etapas 1.c.*) detectado en la dermis (59,6-59,0 %) corresponde exclusivamente a los dos tipos de colágeno analizados: tipo I (10,73 %) + tipo III (48,68 %) para dermis fresca, y tipo I (7,49 %) + tipo III (38,4 %) para dermis tratada.

La menor proporción de colágeno (I + III) en la dermis tratada puede deberse al postulado proceso de degradación, el cual debió interesar las zonas de reconocimiento del anticuerpo y por ende no se logró cuantificar en su totalidad en esta fracción; así como también a que los productos de degradación fueran excluidos durante el procedimiento de purificación utilizado. Por otro lado se considera también que la técnica de Kolar (1990), que hace una evaluación del colágeno total basándose en su contenido de Hidroxiprolina, no es capaz de establecer si hubo o no desnaturalización o degradación de la proteína. Estos resultados evidencian que para una misma dermis, la diferencia cuantitativa encontrada entre ambos tipos de colágeno es notoria, siendo el de tipo III mayor que el de tipo I.

Este hallazgo es coincidente con el de Lindsay *et al.* (2004), donde se indica que el tipo de colágeno mayoritario en dermis porcina es el III. Además Fleischmajer *et al.* (1990), confirman, mediante análisis estructural en distintos tipos de tejidos, que el colágeno tipo III es el componente principal de las fibras estriadas de ciertas matrices del estroma como la dermis, y que está presente junto al colágeno del tipo I (en menor proporción) formando parte de las llamadas fibras colágenas.

Conclusiones Etapa 3

- Las fracciones solubles (F_2 y T_2) y las proteicas (F_s y T_s) aisladas por HPLC, contienen ambos colágenos, tipo I y III.
- En T_2 la presencia de fragmentos de bajo PM del colágeno tipo I sugiere una degradación del mismo inducida por el tratamiento industrial.
- En ambas dermis, la mayor proporción corresponde al colágeno tipo III.
- Las diferencias encontradas (no estadísticas) en la cantidad de colágeno entre ambas dermis (fresca y tratada), validan los resultados obtenidos mediante la aplicación de la técnica de inmunoblot que sugieren presencia de productos de degradación.
- La cuantificación por el método inmunológico de ELISA valida los resultados obtenidos por el método colorimétrico de Kolar (1990) ensayado en la *Etapas 1.*

Etapas 4. Identificación y Cuantificación de las Proteínas (FN y LN) en las Fracciones Correspondientes.

Tanto FN como LN y otras proteínas extra celulares no colágenas son importantes por la función que cumplen en muchas de las interacciones de la superficie celular. En particular, FN es una proteína celular multifuncional interactiva presente en una gran variedad de matrices extracelulares, en las que se destaca por su actividad y contribución a la adhesión y migración celulares (Yamada, 1991).

La LN (glicoproteína de alto PM), es el componente mayoritario de la membrana basal y está implicada en procesos biológicos tales como adhesión, migración y diferenciación celular (Yurchenco *et al.*, 1990).

En consideración de la función fundamental que estas últimas proteínas parecen cumplir en los procesos de reparación de la dermis, solamente fueron analizadas FN y LN en las fracciones F_5 y T_5 donde se midieron altas concentraciones de proteínas. Teniendo en cuenta las buenas características inmunogénicas de estas proteínas se decidió utilizar directamente las técnicas de inmunoblot y ELISA para identificarlas y cuantificarlas inmuno-químicamente en las fracciones semipurificadas.

a. FN

a.1. Identificación de FN Mediante la Técnica de Inmunoblot

La Figura 6 muestra los resultados del inmunoblot de FN realizado en las fracciones citadas. En ella se evidencia la presencia de FN tanto en dermis fresca como tratada. En el caso particular de la dermis fresca (F_5), se destaca la presencia de una banda bien definida de bajo PM que no se visualiza en la fracción proveniente de la dermis tratada. Es posible que la misma corresponda a un producto de degradación/fragmentación producido biológicamente in situ (en la materia prima). Fragmento que no se detecta en la dermis tratada porque el proceso al que es sometida podría ocasionar la pérdida total del epítipo.

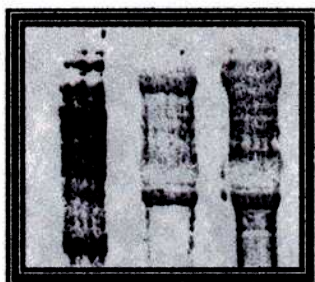


Figura 6:

Resultado del Inmunoblot de FN. a: estándar de FN; b: T_5 ; c: F_5 .

a.2. Determinación Cuantitativa de FN Mediante el Método de ELISA

A efectos de realizar una comparación entre todas las fracciones obtenidas tanto en dermis fresca como tratada, se realizó un análisis semicuantitativo mediante la técnica de "dot blot" Figura 7, incluyendo las fracciones F_2 , T_2 .



Figura 7:

Resultado del dot-blot de FN. a: F_2 , b: T_2 , c: F_5 , d: T_5 .

Esta figura muestra en todos los casos una menor concentración de FN en las fracciones provenientes de la dermis tratada (T_2 , T_5) al compararla con las fracciones provenientes de dermis fresca (F_2 , F_5).

Por otro lado, si comparamos las fracciones 5 vs. 2, se evidencia que la 5 corresponde a una fracción enriquecida en esta proteína, dada la señal de mayor intensidad obtenida, resultado que corrobora lo exitoso del proceso de purificación aplicado para esta proteína.

Los resultados de la determinación cuantitativa de FN, por el método de ELISA, se muestran en la siguiente tabla (expresados como porcentaje de proteína por 100 g de tejido seco):

% FN $\times (10^{-2})$	Fracción
$2,60 \pm 0,15$	F_5
$0,30 \pm 0,15$	T_5

La observación de la tabla indica que la cantidad de FN presente en la dermis tratada es significativamente menor ($p < 0,05$) que la encontrada en dermis fresca, corroborando lo obtenido por el método de dot blot. Este resultado sugiere también que el proceso al que fueron sometidas las dermis tratadas induciría una intensa degradación de la proteína que incluiría el sitio activo, por lo tanto no puede ser detectada ni en el inmunoblot, ni en la reacción de ELISA.

En relación con este resultado, Ruoslahti *et al.* (1982) demostraron que FN es muy sensible a la proteólisis y que los fragmentos monoméricos resultantes se los encuentra presentes en muchas muestras biológicas. Los fragmentos grandes tienen la capacidad de reaccionar con los anticuerpos antiFN y son indistinguibles de la forma intacta, mientras que los fragmentos cortos no reaccionan o lo hacen en mucho menor grado.

Es importante destacar que la concentración de esta proteína en las dermis es muy baja comparada con la del colágeno y contribuye poco a la cantidad total de proteínas del tejido.

b. LN

b.1. Identificación de LN Mediante la Técnica de Inmunoblot

La Figura 8 muestra los resultados de aplicación de la técnica de inmunoblot de LN en las fracciones F_5 y T_5 .

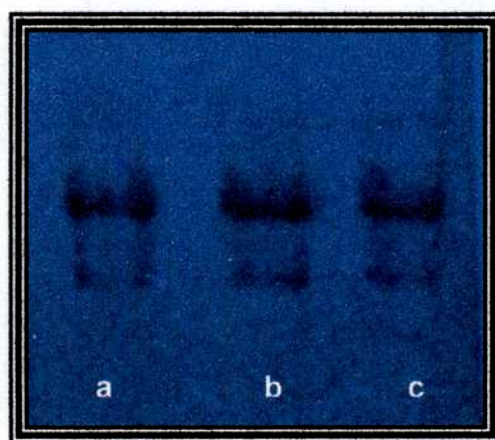


Figura 8:

Resultado del Inmunoblot de LN. **a:** estándar de LN, **b:** F_5 , **c:** T_5 .

Se observa en ambas dermis, que las bandas correspondientes a LN se encuentran inalteradas, con lo cual se puede inferir que la proteína se mantiene conservada luego del tratamiento aplicado.

b.2. Determinación Cuantitativa de LN Mediante el Método de ELISA

LN no pudo determinarse en forma cuantitativa debido a las complicaciones metodológicas descritas en Materiales y Métodos (*Etapas 4.b.2.*), sin embargo se logró realizar un análisis semicuantitativo-comparativo de la proteína presente en ambas dermis mediante los métodos de dot blot y ELISA.

Mediante el método de ELISA se analizaron las fracciones F_5 y T_5 , cuyos resultados se describen en la siguiente tabla.

Relación LN	Fracción
$3,2 \pm 0,2$	F_5
$1,0 \pm 0,2$	T_5

La Relación LN se expresa como $UA(F_5)/UA(T_5)$, donde UA indica Unidades de Absorbancia.

El análisis de las concentraciones relativas de LN indica que, esta proteína se encuentra en una proporción 3 veces mayor en dermis fresca que en el producto tratado. Este resultado contrasta con el de la técnica de inmunoblot (**Etapá 4.b.1.**) donde los perfiles obtenidos fueron análogos para ambas dermis, infiriéndose que las proteínas no sufrieron modificación por el tratamiento.

Sin embargo, se puede avanzar en la discusión sugiriendo que esta proteína, o bien se conserva estructuralmente luego del tratamiento industrial, o bien sufre una degradación tal que la zona afectada incluiría la zona immuno-reactiva y por consiguiente sus fragmentos no se podrían ser evidenciados por esta técnica.

Dado que la técnica de ELISA detectó una menor concentración en piel tratada (a diferencia del procedimiento de inmunoblot), se podría sugerir que efectivamente parte de la proteína fue degradada durante el tratamiento aplicado, y que sus fragmentos posiblemente no pudieron ser detectados en el inmunoblot porque involucró la zona reactiva de la molécula.

El ensayo semicuantitativo mediante la técnica de "dot blot", incluyó la comparación entre dermis fresca y tratada en todas las fracciones obtenidas (Figura 9).



Figura 9:

Resultado del dot-blot de LN. **a:** F_2 , **b:** T_2 , **c:** F_5 , **d:** T_5 .

El resultado de este análisis muestra que la concentración de LN en el tejido fresco (F_2 , F_5) es consistentemente mayor que en el tratado (T_2 , T_5). Además, como producto de la etapa de purificación, se observa un enriquecimiento de esta proteína en las fracciones 5 comparadas con las solubles (2).

Conclusiones de la Etapa 4

- LN y FN están presentes tanto en dermis fresca como tratada.
- La concentración de ambas proteínas es mayor en la dermis fresca, posiblemente debido a degradaciones producidas por el tratamiento comercial aplicado, ocasionado degradación y disminuyendo la cantidad de proteína intacta detectable.

Etapas 5. Identificación y cuantificación de los GAGs en las Fracciones Correspondientes.

Luego de la aplicación de la cromatografía de intercambio aniónico (*Etapas 2*), se comprobó la presencia de GAGs en las fracciones F₄, T₄, F₆ y T₆. Por ende se procedió a cuantificar e identificar los GAGs presentes en todas y en cada una de estas fracciones.

a. Determinación Cuantitativa de los GAGs Totales en las Fracciones Correspondientes.

Como se describió en la Introducción, los PGs son macromoléculas complejas que contienen una proteína central con una o más cadenas de GAGs unidas covalentemente. Los GAGs son polímeros lineales de disacáridos que contienen una molécula de hexosamina y ésteres de carboxilato o sulfato o ambos (la forma mas común). Esta descripción simple permite entender la gran y compleja estructura de los agregados de PGs que involucra diferentes proteínas centrales, diferentes tipos de GAGs, y diferentes largo y número de cadenas de GAGs individuales. Esta diversidad en la estructura contribuye a la gran variedad de funciones biológicas. Estos compuestos se han encontrado dentro de la célula o en la superficie celular o en la MEC, y cumplen importantes funciones relacionadas con aspectos de la biología celular, como la organización y propiedades de los tejidos, y eventos moleculares tales como proliferación, migración y adhesión celular (Wight *et al.*, 1991). Si bien las fracciones 4 y 6 aisladas por intercambio iónico en un equipo HPLC contenían PGs, el objetivo de esta tesis fue analizar cuali-cuantitativamente los GAGs asociados a ellos, debido a que estos compuestos (dado su número y diversidad) tienden a dominar las características bioquímicas de los PGs. La función biológica de los PGs dependiente de los GAGs puede dividirse en dos clases, las biofísicas y las bioquímicas. La primera depende de sus propiedades físicas, es decir la capacidad de ocupar espacio, unir y organizar moléculas de agua, y de repeler moléculas cargadas negativamente. Las bioquímicas en cambio, son aquellas mediadas por la unión específica de los GAGs a otras moléculas, particularmente proteínas, como por ejemplo su participación en el desarrollo y fisiología celular y tisular (motivo de esta tesis) (Prathiba & Gupta, 2000)

La cuantificación de los GAGs totales por colorimetría, empleó en un primer ensayo la técnica que utiliza "Stain All" (*ver detalle de la técnica más abajo*) como reactivo de color. Se encontró que alguno de los reactivos utilizados en la extracción de estas fracciones interfería en la determinación de los GAGs, por ejemplo el EDTA aumentaba los valores de absorbancia obtenidos para el AH y el CSA. Por esta razón, se probaron técnicas alternativas basadas en la formación de complejos con un número dado de GAGs sulfatados y no sulfatados bajo condiciones apropiadas, como por ejemplo los reactivos de: Alcian Blue, Azul de Toluidina y Azul de Dimetilo (Farndale *et al.*, 1986).

De todos estos, el colorante de Alcian Blue fue el único que no presentó modificaciones en presencia de los reactivos de la extracción, por lo que esta técnica de tinción fue considerada la más adecuada y seleccionada para ensayos futuros. El Alcian blue (Whiteman, 1973) es un colorante catiónico que se une a GAGs bajo diferentes condiciones, sin embargo la máxima reacción se logra con pH de 5,8 en presencia de bajas concentraciones de sal (50 mM MgCl_2). La cuantificación depende de la carga del polianión más que de la constitución del tipo de GAG. Además, este colorante es capaz de unirse a los GAGs en estado insoluble aislándolo de proteínas y ácidos nucleicos, esta ventaja permite detectar el complejo coloreado formado por el GAG insoluble y el colorante una vez solubilizado con detergentes.

Método de Stain All: el reactivo color 1-etil-2-[3-(1-etilnafto-[1,2d] bromuro de tiazolio forma complejo con GAGs en solución. La formación del complejo produce un aumento de la absorbancia proporcional a la concentración de los GAGs (λ_{max} HA: 650 nm y λ_{max} GAGs sulfatados: 480 nm).

El porcentaje de GAGs totales determinado en las fracciones, se muestra en la siguiente tabla (g / 100 g de tejido seco):

% GAGs $\times (10^{-2})$	Fracción
$2,32 \pm 0,11$	F_4
$1,80 \pm 0,11$	T_4
$5,80 \pm 0,20$	F_6
$4,40 \pm 0,20$	T_6

Se observa que la diferencia encontrada entre ambas dermis es significativa ($p < 0,05$), siendo menor en el producto tratado, posiblemente debido a pérdidas de alguno o varios de los GAGs presentes en la dermis fresca durante el proceso aplicado para su comercialización. Por otro lado, se puso de manifiesto la diferente concentración de GAGs totales entre las fracciones 4 y 6, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) la concentración de GAGs en las fracciones 6 (eluidas de la cromatografía con el gradiente de NaCl) que en las fracciones 4 (no retenidas en la columna cromatográfica).

a.1. Determinación Cuantitativa de AH en las Fracciones Correspondientes.

De acuerdo a las condiciones en que las distintas fracciones fueron eluidas de la columna de intercambio aniónico, se decidió determinar la concentración de AH en las fracciones F_4 , T_4 donde se espera encontrar GAGs no cargados.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de AH presente en las fracciones citadas, determinado por el método que utiliza Carbazol como sustrato (Bitter & Muir, 1962; Dische, 1947). Este método es específico para ácido urónico, siendo la molécula de AH el más reactivo de los GAGs.

% AH $\times (10^{-2})$	Fracción
$2,20 \pm 0,11$	F_4
$1,68 \pm 0,11$	T_4

El análisis de los resultados de las fracciones F_4 y T_4 muestra que el AH detectado en ellas corresponde prácticamente al 100 % de los GAGs totales detectados en la **Etapa 5.a.** en estas mismas fracciones (F_4 : 2,32; T_4 : 1,80). También se indica que el AH presente en la dermis tratada es significativamente menor ($p < 0,05$) que el detectado en el producto original, infiriéndose en consecuencia que el tratamiento al que fueron sometidas las dermis produciría alteración y consecuente disminución de la cantidad detectable de AH.

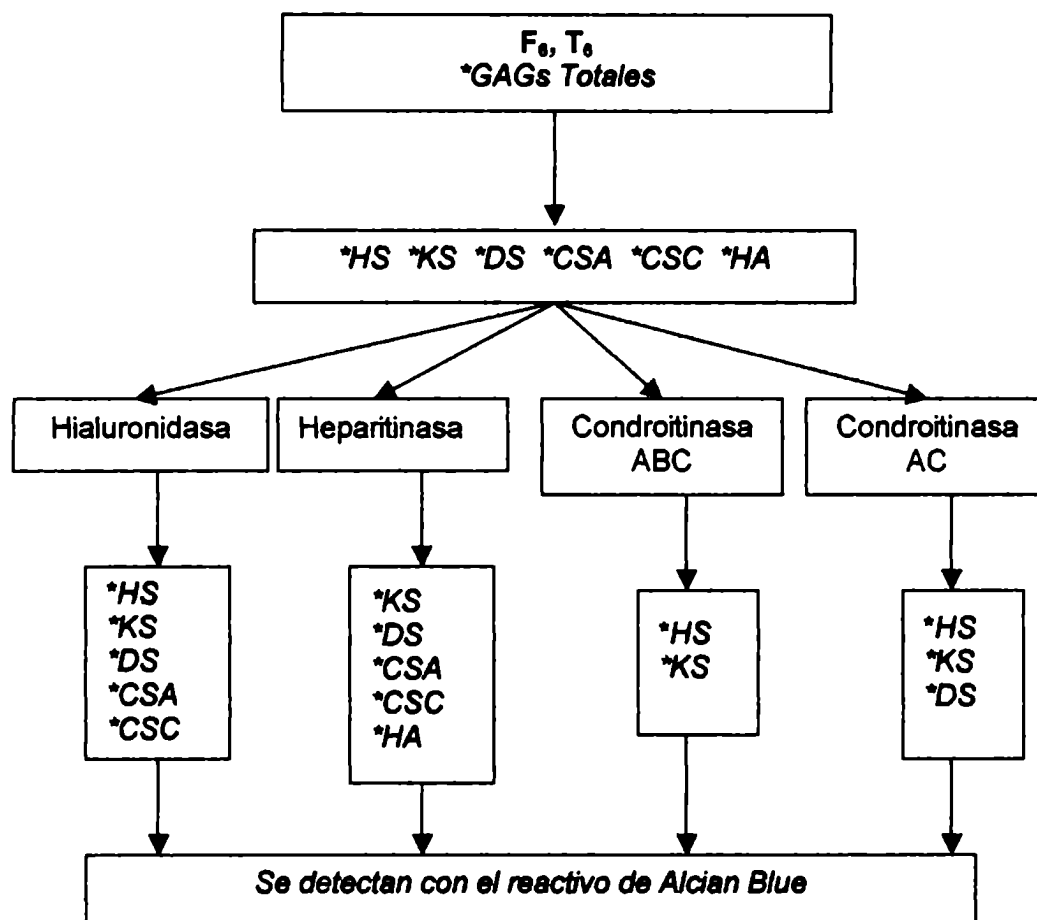
Es interesante hacer notar que la cantidad medida de AH ($2,20 \times 10^{-2}$ %) en dermis porcina es prácticamente igual a la encontrada en dermis humana ($2,52 \times 10^{-2}$ %), Lebwohl *et al.*, 1995) este resultado corrobora la conocida similitud entre ambas pieles y la amplia utilización de las pieles de cerdo y/o sus componentes en tratamientos terapéuticos en humanos.

a.2. Determinación Cuantitativa de HS, CSA, CSC y DS en las Fracciones F_6 , T_6

El análisis de las concentraciones de los GAGs-no AH se llevó a cabo en las fracciones F_6 y T_6 , donde debido a las condiciones de elución se esperaban encontrar en ellas los compuestos con carga (sulfatados). Con este fin se realizó una hidrólisis diferencial mediante incubación con enzimas específicas en diferentes etapas. Posteriormente, los GAGs remanentes en cada uno de los extractos hidrolizados fueron cuantificados mediante la técnica que utiliza el reactivo Alcian Blue (Esquema2)

En el caso de KS, su concentración no pudo ser determinada en las condiciones descritas para el esquema de hidrólisis enzimática, en cambio este GAG fue analizado mediante la aplicación del método de ELISA utilizando anticuerpos específicos (**Etapa 5.a.3.**)

Esquema 2



La presencia de AH se evidencia por degradación del compuesto con Hialuronidasa. La Condroitinasa ABC digiere los CSs y AH, luego de la digestión con Condroitinasa AC, a diferencia de la anterior, los GAGs remanentes son HS, KS y DS (Karamanos, *et al.*, 1992, 1994) La enzima Heparitinasa degrada específicamente HS (Volpi, 1994).

Los resultados de la cuantificación de los GAGs en los distintos hidrolizados, se incluyeron en un sistema de ecuaciones (ver página 71) que permitió calcular las concentraciones de cada uno de los GAGs presentes en la muestra.

Los resultados obtenidos de las hidrólisis (expresados como g / 100 g tejido seco) se muestran en la siguiente tabla:

%AH x (10 ⁻²)	% HS x (10 ⁻²)	% CSA+CSC x (10 ⁻²)	% DS x (10 ⁻²)	Fracción
2,56 ± 0,43	ND	1,42 ± 0,80	1,20 ± 0,30	F ₀
1,85 ± 0,25	ND	1,32 ± 0,80	0,66 ± 0,30	T ₀

ND: no detectable

Dado que no se dispuso de las enzimas específicas para obtener la concentración de CSA y el CSC en forma separada, la concentración detectada corresponde a la suma de ambos compuestos.

La concentración del HS presente en las dermis no pudo ser detectada por la técnica utilizada, posiblemente porque su concentración se hallaba por debajo del límite de detección de la misma.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las concentraciones halladas para CSA+CSC, DS, y AH en ambas dermis. Sin embargo, es de destacar que la concentración de los distintos GAGs en la dermis fresca es consistentemente mayor que en la tratada. Si se considera el análisis estadístico, se infiere que el tratamiento aplicado a la dermis para su comercialización no la afectó de manera tal de reducir significativamente la concentración de los GAGs.

El sistema de ecuaciones indica también la presencia de AH en estas fracciones, inclusive en concentraciones superiores a los otros GAGs. Aunque estas fracciones (F_6 y T_6) corresponden en la práctica a aquellos GAGs con carga (eluidos de la cromatografía con ayuda del gradiente salino), no es ilógico encontrar AH entre ellos, dado que éstos podrían provenir de los "agregados de proteoglicanos" remanentes luego de la extracción bajo condiciones disociantes, los cuales están compuestos por un largo cuerpo de AH al que se adhieren diferentes proteoglicanos mediante "proteínas ligadoras" (Geneser, 2000c).

Es importante hacer notar, a efectos de evaluar la acción terapéutica de la dermis porcina, que la concentración de DS detectada en la dermis fresca ($1,20 \times 10^{-2} \%$) fue menor que la descripta para piel humana (adulto = $2,83 \times 10^{-2} \%$) (Lebwohl *et al.*, 1995).

a.3. Determinación Cuantitativa de KS en las fracciones F_6 y T_6

Dado que no fue posible contar con enzimas específicas para digerir los extractos para determinar luego la concentración de KS en el hidrolizado, fue necesario recurrir a alguna técnica que respondiera con alta sensibilidad y especificidad de manera de llevar a cabo la cuantificación de KS directamente en las fracciones. Entre las técnicas candidatas están los ensayos colorimétricos del ácido urónico, sin embargo esta no puede aplicarse para determinar la concentración de KS dado que carece de este compuesto, y la técnica del Alcian blue que detecta GAGs totales. La determinación de la concentración (como único fin) mediante equipos HPLC es costosa y demandante de tiempo.

La disponibilidad de los anticuerpos permitió el desarrollo de técnicas inmunológicas altamente sensibles que permiten detectar bajas cantidades en presencia de otros compuestos (Yoon *et al* 2002), en consecuencia se decidió aplicar la técnica de ELISA descripta en Materiales y Métodos para cuantificar el KS en las fracciones semipurificadas.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos expresados en g / 100 g tejido seco.

% KS $\times (10^{-2})$	Fracción
$0,30 \pm 0,08$	F_0
$0,23 \pm 0,08$	T_0

Estos valores muestran que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de KS entre ambas dermis, indicando que la concentración de este GAG no fue alterada por el tratamiento aplicado.

Sistema de Ecuaciones

Datos:

ELISA	$\Rightarrow$	KS = X1
HIALURONIDASA	$\Rightarrow$	HS + KS + DS + (CSA+CSC) = X2
HEPARITINASA	$\Rightarrow$	KS + DS + (CSA+CSC) + HA = X3
CONDROITINASA ABC	$\Rightarrow$	HS + KS = X4
CONDROITINASA AC	$\Rightarrow$	HS + KS + DS = X5

Resolución:

- I. KS = X1
- II. HS = X4 - X1
- III. DS = X5 - X4
- IV. CSA + CSC = X2 - X5
- V. HA = X3 - X1 + X4 - X2

Resultados Generales de la Etapa 5

Concentración de GAGs en g/100g de tejido seco $\times (10^2)$

GAGs	F_0	T_0	F_0/T_0	F_4	T_4	F_4/T_4
Totales (colorimetría)	5,80	4,40	1,32	2,32	1,80	1,29
CSA + CSC	1,42	1,32	1,10	—	—	—
DS	1,20	0,66	1,80	—	—	—
KS	0,30	0,23	1,40	—	—	—
AH	2,56	1,85	1,40	2,20	1,68	1,31
HS	ND	ND	—	—	—	—
CSA+CSC+DS+KS+AH+HS	5,48	4,06	1,35	—	—	—

ND: no detectable

El 94,5 % de los GAGs totales detectados por colorimetría en la **Etapá 5.a.** se corresponde exactamente con la suma de las concentraciones de CSA, CSC, DS, KS y AH detectados en las etapas posteriores por otras técnicas (**Etapá 5.a.1.,2., 3.**). La diferencia del 5,5 % se debe a las diferentes técnicas empleadas para la detección de los GAGs en las etapas citadas. En ese porcentaje es posible que esté incluida la concentración de HS (si no está ausente) que no pudo ser detectada en las condiciones de trabajo utilizadas.

La concentración de GAGs fue menor en el producto tratado que en el fresco en todas las fracciones analizadas, aún cuando esa diferencia no esta avalada estadísticamente.

La concentración de GAGs totales en las fracciones 6 es mayor que en las 4, sin embargo el único GAG que incluyen las fracciones 4 es AH, mientras que las fracciones 6 están compuestas por varios de estos compuestos (CSA, CSC, DS, KS) inclusive el AH.

El único GAG que resultó *significativamente* menor en piel tratada (vs. Fresca) fue el AH de la fracción 4. Posiblemente al encontrarse en su forma "libre" (no formando agregados) resultó más expuesto y por ende más labil frente a los efectos producidos por el tratamiento al que se sometió la dermis.

Independientemente de los resultados obtenidos en el análisis estadístico, la relación F/T indica que la concentración de todos y cada uno de los GAGs presentes en la dermis es mayor en el tejido fresco (en promedio entre 30-40 %) que en el tejido sometido a tratamiento para su comercialización.

No se detectó presencia de HS en las dermis, no se comprobó si su ausencia se debió a que la concentración estaba por debajo del límite de detección o efectivamente no estaba presente en las fracciones analizadas.

Conclusiones de la Etapa 5.

- Se detectó la presencia de CSA, CSC, DS, AH y KS en ambas dermis.
- Aparentemente el AH en estado "libre" aislado en la fracción 4, fue el único GAG que sufrió alteraciones por el tratamiento aplicado en la dermis.
- Aún cuando la concentración de los GAG-sulfatos medida en la dermis tratada no fue menor –desde el punto de vista estadístico– que en dermis fresca, se hace evidente que deben existir diferencias en la cantidad de alguno/s de los GAGs en esta dermis ya que la concentración de GAGs totales (detección colorimétrica) hallada en dermis tratada es significativamente menor ($p < 0,05$) que en la fresca.

Resultados Generales del Capítulo I

La pérdida de masa de un órgano resultante de un trauma o cirugía conlleva a la pérdida masiva de la función fisiológica y requiere de un rápido y exitoso tratamiento que permita la posterior reparación fisiológica o quirúrgica de ese órgano. Si el órgano de referencia es la piel, los métodos terapéuticos más utilizados incluyen el heterotransplante, autoinjertos, síntesis in vitro, y la aplicación de apósitos temporarios de diferentes características y funciones.

Existen desarrollos de estos apósitos en países de avanzada como USA y UK. (Salisbury, *et al.*, 1973; Rundle *et al.*, 1976) y también en nuestro país (Sturla *et al.*, 1971; Garcia Igarza & Losardo, 1984). Sin embargo nuestro país ha sido uno de los primeros en comercializar un producto dérmico de origen porcino utilizado con éxito en la reparación de la dermis de pacientes con quemaduras extensas, aplicado tanto en la zona agredida como en la zona dadora de piel en el caso de autoinjertos.

El estudio realizado por el Dr. Freddi y sus colaboradores (1993) mostró que si bien las quemaduras superficiales y abrasiones evolucionan espontáneamente hacia la curación sin necesidad de injerto, se ha de observado que el epitelio crece más rápidamente debajo de la dermis porcina que de cualquier otro apósito convencional. Esto permite una serie de ventajas, tales como la facilidad del recambio en las curaciones, la movilización precoz del paciente, un menor tiempo de internación, la disminución del dolor de la herida y la mejorar en la profilaxis bacteriana de la herida.

El empleo de este apósito dérmico y de la dermis pulverizada, en pacientes que presentaban heridas profundas que interesaban el tejido celular subcutáneo (úlceras traumáticas, por decúbito y por necrosis química), logró reducir el período de cicatrización a la vez que mejoró la calidad de la herida durante el proceso (Tuny, *et al.*, 1997)

El éxito clínico de este producto se extendió también a pacientes odontológicos, ya que la dermis porcina en polvo fue utilizada como medio hemostático en pacientes post-extracción simple o múltiple y en el tratamiento de hemorragias (Flores *et al.*, 1993). El resultado de este estudio mostró que el producto fue efectivo en reducir en forma importante el tiempo de la hemostasia, a la vez que poseía la característica de ser de fácil y simple aplicación, prevenir el contagio de enfermedades como el HIV, la Hepatitis, etc. y de reducir los costos hospitalarios de tratamiento.

Dada la importancia clínica-terapéutica de este producto, comprobada durante la última etapa de aprobación por los organismos oficiales nacionales, se consideró relevante extender esta investigación al estudio de las características bioquímicas del producto y a la evaluación de los componentes constitutivos responsables de la acción biológica del mismo. Esta información permitiría en un futuro sugerir procedimientos terapéuticos alternativos con vistas a mejorar el tratamiento de los pacientes, o sugerir la modificación de las características bioquímicas de los apósitos temporarios a fin de facilitar y reducir el tiempo que demora el proceso de re-epitelización.

El desarrollo de esta tesis incluyó parte de los estudios programados, concretamente se concentró en obtener metodología específica que permitiera el aislamiento y caracterización de sus componentes; así como en la comparación de las características y propiedades de las dermis tratada y recién extraída (materia prima) a fin de establecer si el tratamiento aplicado para su comercialización afectó negativamente alguno/s de los componentes involucrados en la actividad biológica. Además, incluyó el desarrollo de un "sistema modelo *in vitro*" con el fin de comprobar el efecto de la dermis en polvo y/o de alguno de sus componentes sobre el proceso de epitelización.

El estudio de caracterización de los componentes mayoritarios de la dermis estableció que, la única diferencia hallada entre ambas fue el porcentaje de humedad, siendo este punto una validación importante de la eficiencia de la liofilización como mecanismo de extracción de agua del tejido.

Este estudio sugiere además que el tratamiento utilizado para comercializar la dermis no alteró significativamente la cantidad de colágeno ni de proteínas totales, sin embargo se destaca que los ensayos utilizados para esta primera parte involucran técnicas indirectas por lo tanto se requirió una validación de este resultado mediante técnicas más específicas. Luego de diferentes y sucesivos ensayos se estableció un protocolo de técnicas que permitió el aislamiento y caracterización de aquellos componentes de la dermis (PGs, Colágenos, Proteínas no colágenas) considerados biológicamente activos en relación con sus funciones terapéuticas clínicamente comprobadas. Si bien se han postulado metodologías específicas más exitosas para aplicar en la extracción de estos mismos componentes en forma individual (Ruoslahti *et al.*, 1982; Timpl *et al.*, 1982; Carney, 1986; Linsenmayer, 1991;), el propósito de esta tesis fue aislarlos en forma conjunta a fin de conservar la relación cuali-cuantitativa de los mismos, a la vez de mantener las interacciones entre ellos.

El esquema final de trabajo consistió en una extracción exhaustiva en condiciones disociantes de manera de lograr la completa desorganización de la compleja estructura de la dermis. Este procedimiento permitirá solubilizar proteínas y proteoglicanos, entre otros componentes, e inducir la desagregación de alguno de los componentes entre sí, como por ejemplo la disociación de agregados de PGs, a fin de obtener sus correspondientes monómeros (Carney, 1986). El uso de Guanidina-HCl probó ser eficaz en la extracción de todos los compuestos de interés con altos rendimientos.

El análisis de la fracción soluble (resultante de la extracción y posterior centrifugación) identificó la presencia de Proteínas (colágenas y no-colágenas). Se encontró que aproximadamente el 80 % del total de la dermis estaba integrada por proteínas, de ese porcentaje el 60 % correspondía a proteínas colágenas. El 82 % de esa cantidad de colágeno correspondió a colágeno del tipo III y el resto al colágeno tipo I.

Al aplicar la cromatografía por intercambio iónico en un equipo HPLC a la fracción soluble, se detectaron tres fracciones perfectamente resueltas producto de las condiciones de siembra y elución utilizadas. En la primera de ellas se identificó la presencia de GAGs (proveniente de PGs), en la segunda de Proteínas y en la última Proteínas y GAGs (la concentración de las proteínas se consideró despreciable frente a la de los GAGs).

Un análisis posterior, con técnicas más específicas, de las fracciones obtenidas mostró que no se encontraron diferencias significativas en la concentración de los colágenos tipo I y III en ambas dermis, y se comprobó también que el colágeno tipo III era el compuesto mayoritario. La presencia de fragmentos de bajo peso molecular de colágeno tipo I detectados en el inmunoblot de la dermis tratada, y la menor concentración de colágenos (no avalada estadísticamente) hallada en esta misma dermis, sugieren algún tipo de degradación ocurrida durante el proceso industrial aplicado que afectó la concentración de colágeno.

Las proteínas colágenas son consideradas un importante componente del tejido conectivo de la piel y le provee a la misma la tensión característica. En piel humana aproximadamente el 70-80 % (peso seco) consiste en colágeno, y el tipo más abundante corresponde a los tipos I y III, el primero contribuye con el 80% del total y el último con el 15 %. El otro componente, aunque minoritario, es el colágeno tipo IV (Oikarinen, 2004). Cabe destacar la alta coincidencia hallada entre la piel humana y la dermis porcina en cuanto al contenido de colágeno y en cuanto a definir cuáles son los colágenos mayoritarios (tipos I y III).

El estudio de la dermis señaló también la presencia de Laminina y Fibronectina, siendo la concentración de ambas proteínas significativamente menor en dermis tratada. La cantidad de estas dos proteínas (dos órdenes de magnitud menor que la unidad) hallada en ambas dermis, sugiere que no son contribuyentes significativos al 20 % de proteínas no colágenas (PNC) detectadas en la fracción soluble. Es probable que este porcentaje de PNC incluya en parte a proteínas provenientes de los PGs, así como a otras proteínas no estudiadas en esta tesis.

El uso de técnicas tanto colorimétricas como inmunológicas para la cuantificación de los GAGs, estableció que la concentración de GAGs totales fue significativamente menor en dermis tratada, siendo el AH el único GAG estadísticamente menor. Si bien, la comparación individual de las cantidades de CSA, CSC, DS y KS no mostró diferencias significativas entre ambas dermis, es importante hacer notar que sistemáticamente se detectó una menor concentración de éstos en dermis tratada. Es relevante recordar que estas concentraciones fueron determinadas por técnicas diferentes existiendo una muy buena correlación en los resultados hallados.

En otros estudios se encontró que aproximadamente el 0,10-0,30 % del peso seco de la piel humana correspondía a GAGs (Oikarinen, 2004; Loewi, 1961). En esta tesis se halló que estos compuestos están presentes en dermis porcina en aproximadamente un 0,08 % (peso seco). Debe considerarse que, en virtud de mantener la proporción entre los componentes mayoritarios presentes en la dermis, se seleccionó un método de extracción que permitiera obtener los componentes de interés todos juntos. Esta elección se realizó en desmedro de técnicas previamente descriptas como más específicas, las cuales permiten obtenerlos en forma aislada y con mayores rendimientos, en consecuencia es probable que la cantidad extraída no represente el 100 % de su proporción en piel. Aún cuando se tenga en cuenta esta última consideración, se hace evidente que la concentración de los GAGs en dermis porcina es menor que en piel humana.

Breen *et al.* (1970) demostró que los GAGs mayoritarios en piel humana eran AH y DS, mientras que los condroitin sulfatos se encontraban en menor concentración y los KS estaban asociados primariamente a la epidermis. Los resultados de esta tesis, en relación con estos compuestos, son similares a los hallados en piel humana, ya que el GAG mayoritario resultó ser el AH seguido de los CSs, DS y finalmente en muy poca concentración el KS. El DS es el único GAG que muestra diferencias destacables entre ambos estudios, representa una proporción del 30 al 40 % de los GAGs totales de la piel humana (Silver *et al.*, 2003), en cambio en dermis porcina el DS alcanza sólo el 15 % del total de los GAGs presentes.

La similitud hallada en el tipo y cantidad de muchos de los componentes de las pieles de estas dos especies refuerza la sugerencia de utilizar apósitos temporarios de dermis porcina como sustitutos de piel humana para tratar pacientes que sufren daño de la piel por diferentes patologías.

Una de las importantes propiedades tanto de los PGs como de los GAGs, es la capacidad de unir agua hasta 1.000 veces su volumen, contribuyendo así significativamente a la reparación celular y a las propiedades estructurales de la piel reparada (Burton & Eblin, 1986). AH es el componente mayoritario del tejido de granulación temprano que se sintetiza luego de producirse un daño en la piel, y es el responsable de generar el ambiente que permite el movimiento de las células produciendo la expansión del espacio extracelular (Clark, 1993). Durante la maduración de este tejido de granulación, disminuye este GAG y se incrementan los CSs y el DS, estos últimos estarían involucrados en la formación de las fibras de colágeno. En general los GAGs se sobre-expresan durante la etapa temprana, y llegan a niveles normales durante la fase de remodelado del tejido. El entrecruzamiento entre dos de los compuestos mayoritarios, el colágeno y los GAGs, le da a la piel la tensión final que requiere (Prathiba & Gupta, 2000).

Aún cuando no fue detectado en las dermis el HS es muy probable que este compuesto esté presente, aunque en concentraciones no detectables por los métodos utilizados, ya que se ha demostrado que el HS se halla unido a los PGs asociados a matrices peri-celulares y a membranas celulares, donde cumpliría importantes funciones tales como el control del crecimiento celular, y la adhesión de células entre sí y a la matriz (Kjellén & Lindahl, 1991). Además, se demostró que el HS estaría involucrado en distintas etapas de la restauración de las heridas, como en las etapas de re-epitelización y crecimiento de la epidermis (Prathiba & Gupta, 2000). Más específicamente se describió la presencia de HS asociado a diferentes PGs obtenidos de cultivo de fibroblastos de piel humana (Schmidtchen & Fransson, 1992).

El desarrollo de la ingeniería tisular se ha concentrado en la búsqueda de biomateriales que actúen como "soportes" o "andamios" para facilitar la regeneración de tejidos y órganos favoreciendo la restauración de la continuidad anatómica y funcional de los mismos. Se han preparado y evaluado "soportes" combinando los distintos componentes mayoritarios de la MEC tales como colágenos, elastina y GAGs/PGs, así como otros componentes que si bien se encuentran en menor proporción poseen funciones biológicas específicas. De esta forma se incluyeron compuestos tales como colágeno tipo I, con importantes propiedades de adhesión; GAGs con propiedades de hidratación y captación de efectores moleculares (factores de crecimiento y citoquinas); elastina que confiere elasticidad; PGs con propiedades mecánicas y de proliferación, adhesión y migración celular, etc. (Daamen *et al.*, 2003; Prathiba & Gupta, 2000).

Estos modernos soportes sin embargo, no han sido hasta el momento todo lo exitosos que se esperaba. En ciertos tratamientos han provocado reacciones adversas de histocompatibilidad y en otros no lograron reducir significativamente los tiempos de la curación (Pontz, *et al* 1970; Yannas *et al.*, 1980), y además tienen asociado otro inconveniente, el alto costo del tratamiento.

Estas consideraciones avalan aun más la importancia del estudio encarado en esta tesis y los resultados obtenidos, ya que se demostró que la dermis porcina posee una interesante similitud con la piel humana tanto en el tipo como en la proporción de sus componentes (los mayoritarios y los biológicamente activos). Además se demostró que el tratamiento industrial aplicado, para efectivizar la comercialización de este producto, no produjo grandes modificaciones, ya que sólo algunos de los componentes se encontrarían en menor proporción posiblemente debido a la degradación/fragmentación inducida por él. Sin embargo, es probable que esta menor proporción no afecte las propiedades biológicas de la dermis, ya que a nivel fisiológico no son necesarias altas concentraciones para ejercer una función biológica. Se plantea entonces que esta similitud bioquímica podría ser mejor aprovechada si se describieran el/los componentes que poseen alguna responsabilidad en el desarrollo del proceso de reepitelización, y la función específica que cumplirían en este proceso.

Además, se hace indispensable comprobar si efectivamente las pequeñas diferencias halladas entre la dermis porcina fresca y tratada no afectarían sus cualidades terapéuticas.

Con este fin se encaró la segunda parte de esta tesis, que involucra el desarrollo de un modelo de cultivo *in vitro* para el estudio de algunos aspectos de la actividad biológica de la dermis porcina.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el propósito de evaluar algunos aspectos relacionados con la actividad biológica del sustituto de piel porcina, se procedió a ensayar el efecto del agregado del producto liofilizado y pulverizado sobre un cultivo de fibroblastos humanos, elegido como modelo de cultivo in vitro.

*Este segundo capítulo se dividió en dos secciones; una primera sección que involucra la **optimización del microambiente de cultivo** necesario para establecer un modelo in vitro, y una segunda sección de **ensayos de actividad biológica**, en la que se estudia el efecto del producto, a base de dermis porcina, sobre el modelo in vitro optimizado.*

1. OPTIMIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE DE CULTIVO

1.1. Soluciones, Medios y Reactivos

a) Medio de Cultivo Básico MEM

Se utilizó MEM "Hepes Modification" (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma®), medio de cultivo que contiene sales de Earle, L-glutamina 2 mM, glucosa 5,6 mM, HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio 26 mM.

El medio fue reconstituido con agua desionizada y el pH final ajustado a $6,9 \pm 0,3$. Una vez esterilizado, el medio fue fraccionado en botellas estériles y conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

En los ensayos que así lo requirieron, el medio de cultivo básico fue suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gen® S.A.) estéril.

Con el objeto de prevenir la contaminación bacteriana del medio de cultivo se adicionó el volumen necesario de una solución comercial (PAA Laboratories GMBH®) de penicilina-estreptomina, de manera de obtener una concentración final en el medio de 1.000 U/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomina.

b) Buffer fosfato salino (PBS)

Para el lavado y resuspensión de las células se utilizó una solución salina isotónica con pH regulado con un buffer de fosfatos (KCl 2,7 mM; NaCl 137 mM; KH_2PO_4 1 mM; Na_2HPO_4 8mM; pH $7,4 \pm 0,2$). Todas las sales empleadas fueron de grado analítico, marcas Merck o Mallinckrodt.

c) Solución de Tripsina

Solución de reserva: Para desprender las células de la superficie de la placa de cultivo, se utilizó una solución con la siguiente composición: tripsina (Difco®) 1,5 g/l, NaCl 274 mM, KCl 10,8 mM, Glucosa 11,2 mM, HNaCO_3 6,4 mM, EDTA 1,0 mM (todos estos reactivos de grado analítico, Mallinckrodt®), Rojo fenol 0,0005 % (Anedra®). La solución fue esterilizada, fraccionada y conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución de trabajo: En el momento de su utilización una alícuota de la solución de reserva fue descongelada y diluida al medio con agua desionizada estéril.

d) Medio de Congelamiento

Con el propósito de disponer de células de reserva con un número bajo de generaciones, se procedió al congelamiento y conservación de una cierta cantidad de células en nitrógeno líquido para utilizarlas en ensayos posteriores. Se utilizó para este procedimiento, un medio de congelamiento con las siguientes características: MEM 5X 20%, SFB 20 %, dimetil sulfoxido 10 %, antibióticos (concentración final: penicilina 1.000 U/ml y estreptomina 1 mg/ml). El pH del medio fue ajustado a pH: 7,2-7,4 con solución de HNaCO_3 10 %.

e) Otros Reactivos

Apósito Temporario Hemostático Intralveolar (ATHI) uso odontológico (**Pel Cupron®**). El ATHI es elaborado por Laboratorios *Genoma* a partir de dermis porcina liofilizada, pulverizada y esterilizada por radiación gamma. Para todos los ensayos en los cuales se utilizó el ATHI, se preparó una suspensión en medio de cultivo básico.

Condroitin Sulfato A (**Proquimio®**), Condroitin Sulfato B (Dermatan Sulfato) (**Sigma®**), Condroitin Sulfato C (**CalBiochem®**), Ácido Hialurónico (**Herstellung von Naturextrakten GmbH®**). Se prepararon soluciones de estos GAGs, al 0,1 % en el medio de cultivo utilizado y se esterilizaron mediante filtración a través de membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm.

f) Agua Desionizada

Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivo se utilizó agua ultrapura de 18,2 MΩ de resistividad específica (**Milli-Q, Simplicity 185, Millipore®**).

1.2. Condiciones de Esterilidad y Bioseguridad

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de ésteres de acetato de celulosa con diámetro de poro de 0,22 µm, empleando presión positiva de nitrógeno o de aire, según el volumen de cada solución.

Los materiales empleados en los ensayos de cultivos celulares fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave (121 °C, 1 atmósfera, 30 minutos) o por radiación gamma, dependiendo de las características de los mismos.

Las operaciones que requirieron la manipulación de cultivos primarios de fibroblastos humanos fueron realizadas con guantes de látex, previamente rociados con etanol 70 %, en cabina de seguridad biológica clase II. La superficie exterior de todos los materiales y equipos a ser utilizados dentro de la cabina, fueron desinfectados por rociado con etanol 70 %.

Todo elemento que hubiera estado en contacto con algún material biológico –células, medios, SFB, soluciones proteicas– fue tratado durante 2 h con una solución de hipoclorito de sodio 10.000 ppm, antes de proceder a su limpieza o su descarte como residuo patogénico (ECACC, 2001).

1.3. Células

Se trabajó con fibroblastos humanos aislados a partir de biopsias de piel de prepucio de individuos sanos. El material de biopsia fue obtenido por circuncisión en el Centro de Estudios Médicos e Investigaciones Clínicas (CEMIC), cultivado como explanto y enriquecido en fibroblastos durante las 4-8 primeras generaciones. El cultivo primario, constituido por células diploides no inmortalizadas fue gentilmente cedido por profesionales del laboratorio de CEMIC en la generación número 10.

Los fibroblastos son células adherentes y su cultivo requiere el crecimiento sobre una superficie rígida. Para ello, luego de ser suspendidos en un medio líquido apropiado, se siembran dentro de una botella o placa de cultivo donde proliferan hasta cubrir el área disponible o bien hasta consumir los nutrientes del medio. En este momento deben ser subcultivados para prevenir su muerte celular, procedimiento que involucra una etapa de desprendimiento de la célula de la superficie de cultivo utilizando la enzima proteolítica tripsina (ver *Tripsinización*) y, a continuación, la resuspensión en medio fresco (Davis, 1994).

Este proceso combinado es denominado "pasaje celular". Los cultivos primarios de fibroblastos sólo pueden ser mantenidos *in vitro* por no más de 22-25 pasajes, durante los cuales conservan las características de las células cuya diferenciación ha ocurrido *in vivo*.

Con el objeto de evitar variaciones experimentales, cada cambio de medio fue rigurosamente registrado como un pasaje o subcultivo y, consecuentemente, las células fueron descartadas luego del pasaje número 21.

Tripsinización

Procedimiento

- Eliminar el medio de cultivo de la botella.
- Lavar la monocapa dos veces con 2 ml de PBS estéril, con el objeto de eliminar la mayor cantidad de SFB, ya que éste inhibe la acción de la tripsina.
- Agregar cantidad suficiente de solución de Tripsina para cubrir la monocapa (aprox. 1 ml).
- Llevar a estufa a 37 °C durante aproximadamente 4 minutos y verificar el desprendimiento celular en un microscopio invertido. Si el número de células despegadas de la superficie es escaso, colocar la placa nuevamente a 37 °C.
- Una vez observado el desprendimiento de la totalidad de las células, agregar 1-2 ml de PBS estéril para diluir la solución de tripsina.
- Retirar la suspensión celular de la botella de cultivo y transferirla a tubos de centrifuga. Diluir al medio con PBS.
- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a 25 °C, (centrifuga HERMLE® Z323K).
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 1-2 ml de medio de cultivo básico.
- Efectuar el recuento celular en cámara de Neubauer.

Una alícuota de las células correspondiente a los pasajes 10 a 13 fue criopreservada de manera de mantener inalteradas las características del cultivo primario (ver *Criopreservación*).

El desarrollo y la expansión de los fibroblastos fue efectuado en botellas de poliestireno (TPP®) con área de cultivo de 25 cm² ó 75 cm². En cambio, para los diferentes ensayos de actividad biológica se seleccionaron policubetas de poliestireno de 24 pocillos (Corning®, superficie de cultivo: 1,9 cm²), o bien placas de 35 mm de diámetro (superficie de cultivo: 9,6cm²).

Criopreservación

Procedimiento:

- Examinar la botella de cultivo con microscopio invertido para verificar la densidad celular y la ausencia de contaminación.
- Desprender las células por Tripsinización y resuspender en medio de cultivo.
- Efectuar un recuento y determinar la viabilidad celular¹.
- Centrifugar 5 minutos a 1000 rpm y a 25 °C y remover el medio de cultivo.
- Resuspender en Medio de Congelamiento (ver 1.1.d.) a razón de $2 \cdot 10^6$ - 10^7 células / ml.
- Distribuir en criotubos de 1,8 ml.
- Colocar los crioviales en un recipiente para congelar (Sistema Mr Frosty, Nalgene®) que contiene alcohol isopropílico.
- Llevar a -70 °C durante 12 h².
- Transferir a tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Descongelamiento

Procedimiento:

- Descongelar rápidamente por inmersión del criotubo en baño de agua a 37 °C
- Transferir las células a tubo de centrifuga y diluir el Medio de Congelamiento³ con Medio de Cultivo suplementado con 10 % de SFB manteniendo una relación de volúmenes 1:5.
- Centrifugar a 1.000 rpm x 5 minutos a 25 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 1-2 ml de Medio de Cultivo.
- Determinar el recuento y la viabilidad celular

Notas

1) Luego de la tripsinización la viabilidad debe ser mayor que 90 % para que el rendimiento del descongelamiento sea óptimo.

2) La disminución de la temperatura debe ser gradual y a razón de 1 °C por minuto.

3) El medio de congelamiento contiene DMSO que puede resultar tóxico para las células.

1.3.1. Mantenimiento

El mantenimiento de los cultivos primarios de fibroblastos fue llevado a cabo en medio MEM (Eagle, 1959) suplementado con suero fetal bovino, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento, ambos importantes para el desarrollo celular.

Las células fueron cultivadas en estufa (REVCO®) a 37 °C y en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO₂. El crecimiento celular se examinó por microscopía óptica con aumento de 200x o 400x, utilizando un Microscopio invertido con Contraste de fase (ZEISS® Axiovert 135).

1.3.2. Recuento y viabilidad celular

El recuento se realizó simultáneamente con la evaluación de la viabilidad celular tras efectuar una dilución al medio de la suspensión celular en Azul Tripán 4 g/l en NaCl 9 g/l (ICN Biomedicals). La propiedad de permeabilidad selectiva de la membrana plasmática de las células vivas, impide el ingreso del colorante, por lo tanto las células permanecen brillantes e incoloras (Phillips y Terryberry, 1957). Por el contrario, las células muertas pierden esta propiedad de modo que el colorante penetra en el citoplasma y lo tiñe de color azul opaco. El recuento diferencial se efectuó en cámara de Neubauer dentro de los 15 minutos de efectuada la dilución, y luego se calculó el número de células por mililitro de la suspensión. La viabilidad se expresó como porcentaje de células vivas y siempre osciló entre 92 y 98 %. A efectos de minimizar el error en el recuento, el número de células contadas nunca fue inferior a 400 y cada recuento se efectuó por cuadruplicado.

1.3.3. Concentración Óptima de Suero Fetal Bovino

Con la finalidad de establecer cuál es la concentración de SFB que permite el mejor desarrollo del cultivo de fibroblastos, el Medio de Cultivo Básico se suplementó con distintos porcentajes de suero.

Se examinaron concentraciones crecientes de SFB: 2,5, 5, 10, 15 y 20 %. Paralelamente se incluyeron controles sin SFB. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado en placas de 24 pocillos en cada uno de los cuales fueron depositadas 50.000 células en un volumen total de 1 ml.

A las 48 h de cultivo, las células fueron separadas de la placa por tripsinización y transferidas a un tubo de microcentrífuga de 2 ml de capacidad. Luego de una breve centrifugación (1.000 rpm, 5 minutos, 25 °C) el sobrenadante fue removido y reemplazado por el mínimo volumen de PBS que logra suspender las células para efectuar luego su cuantificación en cámara de Neubauer.

1.3.4. Optimización del Número de Células

Con el objeto de determinar el número de células más adecuado que permitiera la inspección microscópica del cultivo para establecer diferencias por comparación visual del desarrollo celular en distintas condiciones experimentales, se ensayaron cultivo con diferentes inóculos iniciales. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado en placas de cultivo de 24 pocillos de 1,9 cm² de área de cultivo, en ausencia y en presencia de 10 % de SFB con una variación en el número de células entre 50 y 200.000.

Las placas fueron incubadas durante 72 h, período en el cual se evaluó el crecimiento mediante observaciones microscópicas periódicas.

2. BIOENSAYOS PARA LA EVALUACION DE LOS EFECTOS DE LA DERMIS PORCINA Y/O SUS COMPONENTES SOBRE UN MODELO DE CULTIVO IN VITRO DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para desarrollar el cultivo control de fibroblastos, se diseñaron diferentes experimentos con la finalidad de evaluar ciertos aspectos de la actividad biológica de la dermis porcina en el cultivo celular elegido como modelo.

2.1. Morfología Celular

Con el objeto determinar el efecto de la dermis tratada sobre el desarrollo y la viabilidad de las células humanas, se cultivaron células fibroblásticas en presencia de dermis porcina liofilizada en el medio de cultivo.

El *comportamiento* del cultivo en presencia y ausencia de la dermis liofilizada se estudió mediante observaciones microscópicas periódicas y sus correspondientes registros fotográficos.

Con este fin se agregaron 100 ul de una suspensión de dermis porcina liofilizada de 1 mg/ml en cada pocillo (80 ug de proteínas). Paralelamente se realizaron ensayos control del cultivo celular sin el agregado del producto.

Para evaluar el *comportamiento* de los fibroblastos frente al agregado de dermis pulverizada, se diseñó un ensayo en el cual se sembraron inicialmente en una placa desde 50 hasta 50.000 células por área de cultivo de 1,9 cm². Se cultivaron las células durante 9 días en las condiciones óptimas del cultivo, y al cabo de ese tiempo se les agregó suspensión de la dermis en medio MEM. A los 2, 5, 11 y 15 días de adicionada la suspensión se registraron las observaciones microscópicas del desarrollo celular.

2.2. Proliferación Celular

Se evaluó la *proliferación* celular mediante cuantificación de las células cosechadas en el tiempo. El desarrollo del cultivo se llevó a cabo en las mismas condiciones que para el estudio del comportamiento celular.

Se realizó el análisis cuantitativo de células generadas a distintos tiempos, en cultivos con y sin el agregado de la dermis en polvo. Dado que se trata de un análisis cuantitativo, se eligió un bajo número de células iniciales (500 células por pocillo) con el fin de seguir su evolución durante tiempos largos y no permitir que el cultivo alcanzara tempranamente la confluencia.

A los 9, 13, 16, 21 y 23 días, se despegaron las células adheridas a la superficie de cultivo por tripsinización y se cuantificaron las suspensiones celulares bajo el microscopio en cámara de Neubauer.

2.3. Acción de los GAGs

En el primer capítulo de esta tesis se estableció que los GAGs mayoritarios de la dermis eran CSA, DS, CSC y AH. Consecuentemente, se diseñó en este segundo capítulo un ensayo de cultivo de fibroblastos (análogo al 2.1.), con el objeto de estudiar el efecto del agregado de estos GAGs sobre el desarrollo celular.

Para tal fin, se prepararon soluciones madre individuales de CSA, DS, CSC y AH al 0,1% en medio de cultivo y se esterilizaron mediante filtración a través de membrana de nitrocelulosa de 0,22 μm . A cada pocillo se le agregó una cantidad de cada GAG equivalente a la encontrada en la masa de dermis tratada utilizada en el ensayo del punto anterior (2.1 y 2.2). Es decir, se adicionaron CSA: 6.51 ng, DS: 6.6 ng, CSC: 6.51 ng, y AH: 18.5 ng.

Paralelamente se practicaron dos ensayos control, uno de ellos con fibroblastos en el medio de cultivo sin el agregado de ningún componente exógeno, y el otro con fibroblastos adicionados de 100 μg de dermis tratada suspendida en el medio de cultivo. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Se diseñaron dos series de experimentos, la serie A consistió en el agregado de las concentraciones indicadas de los respectivos GAGs al cultivo de los fibroblastos. La serie B incluyó, además de los GAGs, 100 μg de dermis tratada.

En ambas series, se efectuaron observaciones microscópicas a las 48 hs de iniciado el cultivo y posteriormente se realizó la cuantificación de las células cosechadas.

2.4. Migración Celular

Los componentes descritos en la caracterización de la dermis (capítulo I) están involucrados, entre otras funciones, en su actividad quimiotáctica. Por lo tanto, con el fin de evaluar el efecto que la dermis tratada produce sobre la migración celular, se diseñó un ensayo para establecer si los fibroblastos son capaces de migrar y ocupar el espacio de la placa donde previamente fue removido parte del cultivo celular.

En la placa se colocaron 250 células/mm², y se cultivaron durante 7 días (hasta confluencia). Al día 8 se aspiró el medio de cultivo, y con la ayuda de un rastrillo (scraper BD Falcon® Cell Scrapers) de 2 mm de ancho se removió parte de la capa celular (2 diámetros perpendiculares). Las células remanentes se lavaron dos veces con medio de cultivo, para remover el debris celular. A la mitad de la placa (12 pocillos) se le agregó medio de cultivo fresco (control), mientras que a la otra mitad (tratado) se le agregó una suspensión de la dermis tratada en medio de cultivo (80 µg de proteína). La placa así preparada fue incubada durante 12, 18 y 24 hs en las condiciones de cultivo habituales. Una vez transcurridos estos tiempos, se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 200 µl de PBS. Luego, se fijaron las células con 500 µl metanol (Merck®) durante 20 min a 4 °C y se tiñeron con 300µl de Cristal Violeta (Sigma®) 0,5% en una mezcla de metanol-agua (20:80) durante 10min. Al cabo de ese tiempo, las células se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se dejaron secar.

El frente de migración celular se diferenció respecto del frente original porque se tiñó más tenuemente. La distancia de migración se determinó con la ayuda de una escala graduada adaptada al ocular del microscopio.

2.5. Adhesión Celular

Los fibroblastos son células adherentes y esta capacidad está directamente relacionada con su viabilidad, en consecuencia se propuso practicar un ensayo de adhesión celular como paso preliminar al estudio del Ciclo Celular.

Este ensayo consistió en examinar la adhesión de los mismos a la superficie de la placa de poliestireno en un medio de cultivo mínimo (sin el agregado de SFB). Para esta prueba se sembraron 100, 250, 500, y 1000 células/mm² en una placa de 24 pocillos por triplicado. La evolución del cultivo fue inspeccionada microscópicamente a las 48 y 72 h de iniciado el ensayo.

2.6. Ciclo Celular

Para estudiar el ciclo celular de los fibroblastos por citometría de flujo, las células fueron arrestadas en un medio de cultivo mínimo (ausencia de SFB). Esta etapa tuvo como finalidad normalizar el estado del desarrollo celular, obteniendo las células en una misma fase.

Para ello se utilizaron placas de poliestireno de 35 mm de diámetro (Falcon®), en las que se sembraron 1×10^6 células suspendidas en medio MEM adicionado de antibióticos. Las células fueron cultivadas durante un período de 72 h, transcurrido el cual se inició el ensayo por agregado de 10 % de SFB. Sólo a las placas denominadas "tratadas" se le adicionaron, además, 100 µl de la suspensión de dermis porcina

El diseño de este estudio consistió en realizar un cultivo por un lapso de 30 h, efectuando mediciones cada 3 h tanto en las placas *control* como en las *tratadas*. Además, se incluyó una placa para ser utilizada como "testigo" del ensayo (Control a tiempo 0).

El fundamento de esta metodología consiste en marcar los núcleos con fluorocromos, los cuales se unen estequiométricamente a los ácidos nucleicos intercalándose en la doble hélice, por ende la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en el núcleo. Se evalúa así el contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular (Watson & Erba, 1992). El fluorocromo más frecuentemente usado es Ioduro de Propidio, el cual se excita a una longitud de onda de 488 nm y tiene afección por ARN y ADN. Por lo tanto, es necesario eliminar el ARN incubando la suspensión celular con RNAsa antes de la tinción con el fluorocromo (*ver Citometría de Flujo*).

La suspensión celular bien homogeneizada se sitúa en el compartimento presurizado del citómetro de flujo y es luego impelida a una cámara de flujo. Las partículas de la suspensión se sitúan en el centro del flujo y pasan una a una a velocidad constante por la fuente de excitación, que es un láser de Argón. El haz de luz se dispersa al ser interceptado por las partículas y se produce la excitación del fluorocromo. Varios filtros ópticos dejan pasar determinadas longitudes de onda. Las señales luminosas son recogidas por fotodetectores colocados en el eje de la luz en posición ortogonal para medir los ángulos de dispersión de la luz y la intensidad de la fluorescencia. Las señales son luego amplificadas y transformadas a la forma digital en una computadora. Una vez colectadas esas señales, el análisis de las mismas se realiza mediante el programa WinMDI 2.8.

Citometría de Flujo**Procedimiento:**

- Arrestar las células, en MEM con antibióticos y sin suero, en placas de 35 mm durante 72h en estufa a 37 °C en presencia de 5% CO₂.
- Reemplazar el medio por MEM con 10% de SFB.
- A las placas tratadas agregar 100 µl (80 µg de proteína) de la suspensión de dermis porcina en medio de cultivo.
- Incubar a 37°C en presencia de 5% de CO₂.
- Durante 30 h y cada 3 h, retira una placa control y una placa tratada con dermis porcina.
- Lavar las células 2 veces con 0,5 ml de PBS.
- Despegar las células con 0,7 ml de tripsina diluida al 1/5.
- Agregar 0,7 ml de PBS.
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos a 25 °C.
- Descartar el sobrenadante y lavar nuevamente con 1 ml de PBS.
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos a 25 °C..
- Resuspender las células en 100 µl de PBS.
- Pasar las células a tubos de centrifuga de 1,5 ml conteniendo 1 ml de metanol frío (fijación).
- Mantenerlas congeladas a – 20 °C hasta el momento del análisis por citometría (pueden ser varias semanas)
- El día de la medición sacar las células del congelador y lavar 2 veces con PBS por centrifugación.
- Agregar 4 µl de Ribonucleasa A (de páncreas bovino, Sigma®) en PBS (10 mg/ml).
- Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 1.000rpm a 25 °C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los valores de tendencia central de los resultados se expresan como valores promedios. La dispersión se expresa como desviación estándar del promedio.

Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron realizadas al nivel de significación $p=0,05$. Se emplearon: el método de ANOVA y el test de "t". Para los recuentos celulares se utilizó la prueba de "U" de Mann-Whitney.

CAPÍTULO II

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OPTIMIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE DE CULTIVO

1.1. Características morfológicas generales del cultivo primario de fibroblastos

De las células presentes en la dermis, los fibroblastos (células de tejido conectivo) participan activamente en el proceso de reparación de los tejidos lesionados, de allí que fueron seleccionados para realizar los ensayos biológicos incluidos en el trabajo experimental.

El establecimiento de un cultivo primario de fibroblastos es laborioso y sólo puede ser mantenido *in vitro* por un lapso limitado. Aun cuando en el comienzo un cultivo primario derivado de piel humana es heterogéneo, al cabo de varios repiques comienzan a predominar los fibroblastos. Durante su vida media *in vitro*, relativamente corta, las células mantienen muchas de las características diferenciales que poseen *in vivo*.

El cultivo primario de fibroblastos de piel escogido para las diversas pruebas de actividad biológica incluidas en este capítulo de la tesis, fue preparado luego de la disociación del tejido por digestión enzimática. Las generalidades morfológicas de las células en pasaje 10 fueron luego establecidas por observaciones microscópicas seriadas (ver fotos al final del capítulo). Estas observaciones indican que, los fibroblastos poseen la propiedad de crecer adheridos a la superficie de cultivo *in vitro*, propiedad que le confiere características morfológicas específicas. La más relevante, es que, en general, mantienen la forma de huso con extremos alargados y núcleo grande (Foto 3-296). Cada fibroblasto emite prolongaciones citoplasmáticas con el fin de establecer interconexiones con las células vecinas (Foto 7-299). Esta particularidad influye sobre la morfología celular e imprime leves modificaciones a la línea fusiforme, por lo tanto la célula adopta diversas figuras geométricas sencillas (Fotos 3-296, 2-295, 4-297). Cuando la densidad celular es baja, el aspecto del cultivo es desordenado y se distinguen células orientadas en todas las direcciones (Foto 2-295). Sin embargo, en cultivos con mayor tiempo de evolución donde también aumenta la densidad celular, los fibroblastos se distribuyen en forma paralela, con contactos muy estrechos entre células adyacentes (Foto 12-304). Las divisiones mitóticas se reconocen fácilmente, aún a bajo aumento (200x), ya que en esa fase la membrana citoplasmática es muy refringente (Fotos 6-298 con zoom y 4-297 con zoom). Aparentemente, el proceso comienza con una retracción del citoplasma debido a la cual la célula adopta una conformación más redondeada y voluminosa, pero sin desprenderse de las zonas de unión a la superficie de cultivo. La membrana nuclear pierde nitidez y se hace visible la cromatina (ver zoom de Foto 6-298). Luego de la división nuclear se produce la división citoplasmática, en la Foto 4-297 puede observarse el detalle de un fibroblasto en el cual ha culminado el proceso de división del núcleo y ha comenzado la división del citoplasma para generar dos nuevas células. La adhesión a la superficie de la placa de cultivo no se pierde durante este proceso.

Las características morfológicas iniciales observadas en este estudio son análogas a las descritas en la literatura para este tipo de células (UCCh, 2003). Sin embargo, experiencias llevadas a cabo por otros investigadores muestran que estas características se conservan en el tiempo, aun hasta dos semanas posteriores al inicio del cultivo (Pieper *et al.*, 1999; Daamen *et al.*, 2003).

1.2. Concentración Óptima de Suero Fetal Bovino

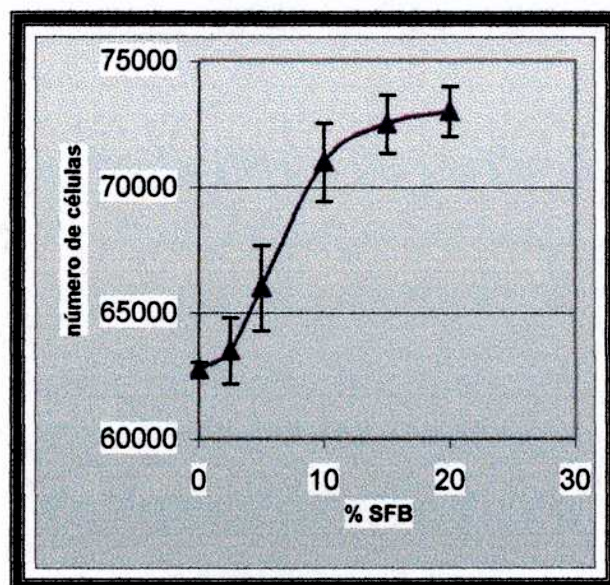
En términos generales, las células en cultivo requieren del aporte de nutrientes para crecer *in vitro* en un entorno con condiciones reguladas de pH y temperatura. Estos nutrientes son aportados por el medio de cultivo y por el suero fetal bovino.

El mantenimiento de los cultivos primarios de fibroblastos fue llevado a cabo en medio MEM, el cual fue descrito como más apropiado para el desarrollo de este tipo de células por Eagle (1959). Este medio contiene sales de *Earle* que proveen los iones sodio, potasio, magnesio y calcio necesarios para la regulación del potencial de membrana y el mantenimiento del balance osmótico celular, así como el aminoácido no esencial L-glutamina necesario para la síntesis del ácido glutámico. La presencia de glucosa en el medio cubre el aporte de energía requerido y el *zwitterion* HEPES regula el pH en un rango estrecho de valores.

Además, el medio fue suplementado con SFB, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento importantes para el desarrollo celular. El suero es una mezcla compleja de albúminas, α y β globulinas y factores de crecimiento cuya concentración puede afectar el desarrollo de las células *in vitro*. Entonces, fue necesario determinar, mediante un ensayo dosis-respuesta, la concentración óptima a ser utilizada en los cultivos de fibroblastos. Este consistió en el agregado de diferentes porcentajes de SFB a un inóculo inicial de 50.000 células, y posterior recuento celular a las 48 h de iniciado el cultivo. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

Cada uno de los valores tabulados a continuación corresponde al promedio $\pm$ DS (desvío estándar) del recuento celular de los cuadruplicados para cada una de las concentraciones de SFB ensayadas. Este experimento se repitió en dos oportunidades obteniéndose resultados similares. Los datos de la tabla fueron también representados gráficamente.

% SFB	Células	DS
0	63000	300
2,5	64000	1300
5	66000	1700
10	71000	1550
15	72500	1160
20	73000	990



Del análisis de los datos obtenidos se desprende, en primer lugar, que la concentración de fibroblastos cultivados *in vitro* es dependiente de la concentración de SFB presente en el medio. Para cada concentración de SFB el número de células recuperadas al final del ensayo es mayor que el número de siembra inicial. En el cultivo control (SFB 0 %) se observa el mismo incremento en el recuento celular. Por consiguiente se deduce que, en cultivos de corta duración los fibroblastos se mantienen viables e incluso se multiplican, aún en ausencia de los factores aportados por el SFB.

La representación gráfica del número de células cosechadas en función del porcentaje de SFB adicionado adopta la forma de una curva sigmoidea. A bajas concentraciones del SFB se obtiene un escaso crecimiento celular, con poca diferencia respecto del desarrollo observado en los cultivos control (0% SFB). A partir de la adición de 5% de suero, se observa una respuesta celular más activa que favorece la replicación de los fibroblastos y se traduce en una mayor pendiente. La proliferación celular óptima se obtiene con el agregado de 10 % de SFB y luego se frena en la zona de "meseta". Agregado de mayores cantidades de suero no sólo no contribuyen a mejorar la expansión celular sino que, en otro ensayo (no mostrado) se observó una leve disminución en el recuento. Una de las causas probables de esta última respuesta puede ser la limitación de los nutrientes aportados por el medio de cultivo, enmascarada por un efecto de dilución provocado por el agregado de suero en altas proporciones. Otra causa probable, puede ser la presencia de inhibidores del desarrollo y proliferación celular en el suero, cuya presencia se pone de manifiesto exactamente cuando este suplemento se incorpora al medio en grandes cantidades.

Por lo tanto, a partir de estos resultados queda establecido que se utilizará un medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB en los ensayos posteriores con fibroblastos.

Este resultado concuerda con la propuesta de Sonnenschein & Soto (1981) quienes, tras ensayar porcentajes de suero de caballo entre 2 y 50 % en cultivos fibroblásticos, sugieren que el óptimo desarrollo celular (analizado mediante curvas de crecimiento) se alcanza con el suplemento de 10 % de suero. Además, este porcentaje es coincidente con el utilizado por otros autores para cultivos de fibroblastos obtenidos de biopsias de piel humana de origen palmar, plantar y de otras localizaciones (Chipev & Simon, 2002) así como de piel de prepucio de neonatos (Shreiber & Tranquillo, 2001).

1.3. Optimización de la Densidad Celular

Si bien el aporte de nutrientes es un punto fundamental para el desarrollo celular, no menos importante es determinar la densidad celular apropiada para utilizar de forma óptima esos nutrientes. Un número elevado de células podría ocasionar el agotamiento de los nutrientes del medio. Por el contrario, un medio puede resultar nocivo en un cultivo con baja densidad celular debido al exceso de los mismos.

Otro factor a considerar es el área efectiva disponible para la adhesión y la influencia de ésta sobre la morfología del cultivo de fibroblastos.

La serie de ensayos propuestas en esta sección fue diseñada con el objetivo de estudiar si existe una relación entre la densidad celular y la presencia de factores de crecimiento en un medio de cultivo completo, mediante la detección de diferencias morfológicas en cultivos de fibroblastos.

Los resultados de los estudios preliminares para establecer las características morfológicas generales del cultivo primario de fibroblastos (sección 1.1.) mostraron variaciones morfológicas en cultivos con distintas densidades celulares (Fotos 2-295; 12-304). Se infiere que si la morfología es distinta, el comportamiento metabólico y/o fisiológico de la célula es diferente.

El ensayo se llevó a cabo por triplicado en placas de cultivo, variando el número de células de manera de tener un inóculo inicial equivalente a 1.000, 500, 250, 100 y 50 células/mm². En todos los casos el medio de cultivo se suplementó con 10 % de SFB. Paralelamente y con fines comparativos se efectuaron controles del cultivo en ausencia de SFB. La inspección visual se realizó a las 72 h de comenzado el cultivo y las observaciones se registraron fotográficamente.

Los hallazgos más relevantes documentados se muestran en las fotografías que se incluyen al final del capítulo.

En aquellas pruebas en las que la densidad celular fue alta, (Foto 19-321, 1.000 células/mm² y Foto 21-310, 500 células/mm²) los fibroblastos adoptaron la morfología de fibras, se ordenaron siguiendo líneas paralelas y cubrieron la placa sin dejar sectores libres de células. La inspección de la placa reveló la ausencia de células en división. En ausencia de SFB, en cambio, el cultivo mostró una morfología muy diferente según la densidad celular inicial. Para 1.000 células/mm² no se distinguieron fibras sino células poligonales más pequeñas y levemente estrelladas (Foto 18-322), morfología compatible con la descrita para fibrocitos, células en estado de reposo o de poca actividad (UCCh, 2003). Para el ensayo de 500 células/mm² (Foto 20-320), la menor densidad celular (aún cuando continúa siendo alta) permitió individualizar células fusiformes o con diversas orientaciones y formas geométricas. En este caso también pudo observarse superposición celular, de modo que el cultivo ya no presentaba aspecto de monocapa.

La disminución progresiva de la densidad celular de partida (Foto 9-301: 250 células/mm², Foto 23-324: 100 células/mm²) permitió observar tanto a las células en forma individual como detectar figuras en división. En ambos casos, se logró una perfecta diferenciación de la morfología tipo fibra de cada célula y distinguir las interconexiones celulares que se proyectan en busca de células adyacentes. En los cultivos controles (0% SFB), la diferencia más sobresaliente fue el menor número de células al cabo de las 72 horas de incubación (Fotos 8-300 y 22-307, correspondientes a un inóculo inicial de 250 y 100 células/mm², respectivamente). También se observó que los fibroblastos adoptaban formas fusiformes con leves modificaciones debidas a la emisión de prolongaciones (Foto 8-300). Cuando la densidad celular disminuía, el fibroblasto tendía a alargarse (Foto 22-307).

Esta diferencia en el tamaño se acentuaba si la densidad celular disminuía (Fotos 24-325 y 25-327: 50 células/mm² con y sin SFB, respectivamente). Las células generaban prolongaciones mucho más extensas con el fin de lograr las interconexiones con células vecinas. En la foto 25-327 se observa que las células en ausencia de SFB exhiben aproximadamente el doble de tamaño que aquellas crecidas con SFB en el medio de cultivo (Foto 24-325).

En líneas generales se advierte que el crecimiento de los fibroblastos depende de manera crítica de la densidad celular. Esta observación es sustentada por las diversas morfologías halladas. En ausencia de SFB presencia de: fibrocitos en cultivos a altas densidades celulares, fibroblastos activos y escasas células en mitosis a densidades intermedias, y células fusiformes con cuerpos muy alargados para las menores densidades. En cultivos suplementados con SFB, presencia de fibroblastos metabólicamente activos y mayor proporción de células en división, que aumentan en forma inversa a la densidad celular.

Existe más de una hipótesis para explicar estas observaciones. a) la inhibición del crecimiento por depleción de nutrientes del medio, b) la acumulación de moléculas inhibitorias en el medio, c) la inhibición del crecimiento por interacciones específicas célula-célula.

Las dos primeras hipótesis se sustentan por si mismas, en cambio en relación con la tercera Wieser *et al.* (1986) demostraron que una glicoproteína de membrana plasmática estaba involucrada en la inhibición del crecimiento por contacto. Estos autores simulaban en cultivos fibroblásticos de baja densidad celular el contacto célula-célula por agregado de proteínas de membrana, promoviendo el estado de reposo de los mismos. Según Sakaguchi *et al.* (2000), existe una proteína citoplasmática involucrada en el proceso de inhibición del crecimiento de fibroblastos humanos por contacto, que se fosforila, se trasloca al núcleo e inhibe la síntesis de ADN arrestándolas en el estado de reposo cuando las células alcanzan la confluencia.

En consideración de estas observaciones y, para evitar que ocurran los mecanismos de supresión de la proliferación celular, es conveniente trabajar con densidades celulares intermedias. Por lo tanto, se establece que una densidad inicial de 100 a 250 células/mm² en un medio suplementado con 10 % de SFB, es apropiada para estudiar el comportamiento de los fibroblastos y detectar posibles diferencias en la proliferación celular.

2. EVALUACIÓN DE ALGUNOS ASPECTOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA DERMIS PORCINA

El desarrollo de un modelo *in vitro* para facilitar el estudio de aquellos fenómenos involucrados en la regeneración tisular, aun cuando no se ajusta exactamente a las condiciones fisiológicas que se observan *in vivo*, puede constituir una aproximación experimental válida a fin de establecer diferencias en la actividad biológica inducidas por la incorporación de compuestos exógenos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el desarrollo de los cultivos de fibroblastos, se procedió a diseñar diferentes ensayos a fin de evaluar la acción de la dermis porcina sobre el cultivo celular elegido como modelo. En esta serie de ensayos se utilizó la dermis porcina liofilizada, pulverizada y esterilizada ATHI.

2.1. Efecto de la Dermis Sobre la Morfología Celular

Como fue demostrado previamente en esta tesis, la dermis porcina tratada posee 59,0% de colágeno; esta alta proporción le confiere la característica de insolubilidad en el medio de cultivo.

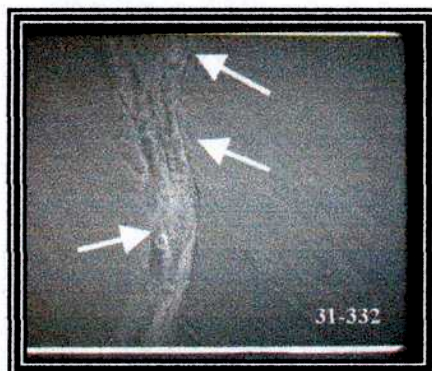
Los intentos de disolución del liofilizado que incluyeron incubaciones prolongadas a 37°C, agitación mecánica y/o cambios en el pH resultaron poco satisfactorios. De hecho, dada las características de los ensayos biológicos programados, no hubiera sido conveniente utilizar las condiciones disociantes descritas en el capítulo I.

Por lo tanto, se optó por la preparación de una "suspensión" homogénea de 100 µg de dermis / 100 µl de medio de cultivo, seguida de una incubación a 37 °C durante 48 horas a fin de mejorar su disolución. Al cabo de ese período, se centrifugó la suspensión, y se le determinó la concentración de proteínas al sobrenadante. El rango de valores hallados en los diferentes experimentos llevados a cabo, estuvo comprendido entre 76-80 µg de proteína / 100 µl de suspensión. Para los ensayos se utilizaron 100 µl de la suspensión o 100 µl de la solución (sobrenadante). La suspensión de pulverizado de dermis incluía partículas microscópicas de diversos tamaños y formas, la mayoría de ellas de aspecto alargado más o menos anchas y muy refringentes que fueron denominadas "fibras de dermis".

El ensayo para evaluar el comportamiento de los fibroblastos consistió en utilizar un cultivo establecido previamente, al cual se le agregó la suspensión de dermis tratada. Brevemente, los cultivos de fibroblastos se iniciaron con densidades celulares en el rango de 0,25 a 250 células/mm², luego de una incubación de 9 días en las condiciones óptimas de cultivo, se le agregó la suspensión de la dermis. A los 2, 5, 11 y 15 días de adicionada la suspensión se inspeccionó la evolución del cultivo mediante observación microscópica.

Se comprobó que el producto a base de dermis porcina no resultó tóxico para los fibroblastos en cultivo, ya que en ningún caso se observaron cambios en el desarrollo, ni en la morfología de las células.

Al cabo de 2 días en el cultivo celular iniciado con 250 células/mm², las fibras de dermis se encontraban total y firmemente adheridas a la placa. La firmeza de esa adhesión, se comprobó mediante un pequeño golpeteo en el costado de la placa y posterior observación microscópica del posible desprendimiento de la fibra. Otra observación relevante, fue la visualización de fibroblastos adheridos sobre estas fibras. La Foto 31-332 muestra en primer plano una fibra de dermis sobre un fondo de fibroblastos dispuestos en forma paralela. Las flechas señalan las células fijadas a la fibra.



En cambio, en los cultivos con densidades celulares menores (25, 2,5 y 0,25 células/mm²), las fibras de dermis se encontraban fijadas por sólo uno de los extremos a alguna de las células de la monocapa. Por lo tanto, al comprobar mecánicamente la firmeza de adhesión de las fibras se generaba un movimiento que se concentraba en su extremo libre, pero que no lograba desprender a la fibra del sitio de contacto. Cabe destacar que no se distinguió el fenómeno ya descrito de crecimiento celular por encima de las fibras. Con el transcurso del tiempo (5 y 11 días) se observaba pérdida de la movilidad de las fibras dérmicas, producto de su fijación progresiva a las células de la monocapa. Fijación que se generaba en el sitio de contacto y se extendía hacia el extremo libre, probablemente debida al aumento del número de fibroblastos.

Independientemente de la densidad del cultivo de partida, luego de 15 días de ensayo las fibras adheridas ya no eran distinguibles. Probablemente, el desarrollo de un elevado número de células no permitía apreciar el sitio de anclaje de las fibras de dermis.

El análisis de estos resultados sugiere que, la adhesión de los fibroblastos a las fibras de dermis estaría favorecida por el alto número de puntos de contacto (célula-sustrato) debido a la alta densidad celular. Además, considerando que en la fibra dérmica se demostró presencia de proteínas de la MEC (colágenos, fibronectina, laminina), es altamente probable que las células de la monocapa sean capaces de reconocerlas e interactuar con ellas mejorando así el proceso de adhesión. Se infiere en consecuencia que, en períodos breves de contacto, la dermis actuaría como producto quimiotáctico favoreciendo la migración celular.

Los resultados observados durante períodos de incubación mayores, en cuanto a la inmovilización progresiva de la fibra dérmica, estarían también relacionados con el efecto anterior. Sin embargo, el crecimiento profuso de fibroblastos al cabo de 15 días de ensayo, no relacionado con la densidad inicial de células, sugiere en cambio una acción mitogénica de la dermis. Para confirmar alguna de estas hipótesis se analizará el efecto de la dermis sobre el ciclo celular (ver sección 2.6).

La “ausencia” de fibras de dermis en cultivos prolongados fue un hecho no esperado. Esta observación tendría un sustento fisiológico, ya que *in vivo* las propiedades mecánicas del entorno celular son moduladas por la síntesis y degradación de proteínas de la MEC. En ese sentido, se observó que la síntesis de colagenasa facilitaba la degradación de colágeno y proteínas de la MEC (Beele, 2002). Además, se demostró que la biodegradación de matrices de colágeno sintéticas era un paso crítico para la integración de sus componentes a los tejidos *in vivo* (Pelham & Wang, 1997). En consecuencia, es probable que la “ausencia” de las fibras de dermis en el cultivo esté relacionada con su degradación, etapa que sería requisito indispensable para incorporar sus componentes a las células *in vivo* y favorecer la reepitelización durante la cicatrización de heridas cuando se emplean los sustitutos dérmicos.

En consideración de lo expuesto, es probable que la fibra de la dermis haya sido degradada por enzimas proteolíticas sintetizadas por las células en el cultivo. Esta última hipótesis sería avalada por los estudios de Kerkvliet *et al.*, (2003) quienes encontraron en un cultivo de fibroblastos en presencia de colágeno I y III, que tanto los productos de degradación de estas proteínas como la expresión de ciertas metaloproteinasas celulares como gelatinasa A, se encontraban significativamente aumentados.

Dado que el producto dérmico utilizado en estos ensayos estaba constituido por 59 % de proteínas del colágeno (tipos I y III mayoritarios), considerando sus propiedades estructurales y las observaciones realizadas en esta sección, se propone que, en este modelo de cultivo *in vitro*, el producto podría actuar en forma pasiva como soporte mecánico favoreciendo la adhesión de los fibroblastos. Una sugerencia similar fue realizada por Lindberg & Badylak (2001), quienes demostraron que una matriz acelular compuesta por 90 % de colágeno tipo I y III (proveniente de submucosa de intestino de cerdo), favorecía la adhesión y migración de células epidérmicas y fibroblastos en un cultivo primario mixto. Un estudio previo (Pelham & Wang, 1997), ya sustentaba estas propuestas, pues en él se demostró que el proceso de adhesión celular involucraba una cierta interacción física entre el citoesqueleto y el sustrato sobre el que se apoyaba la célula. Estos estudios en conjunto indican que las propiedades físicas y químicas del sustrato afectarían la locomoción, el crecimiento y la diferenciación de las células.

La conclusión final de esta sección indica que las fibras de dermis porcina no son citotóxicas, no alteran las propiedades fisiológicas ni la viabilidad de los fibroblastos humanos. Constituyen además, un excelente sustrato para la adhesión celular y aparentemente se comportan como agente quimiotáctico y mitogénico.

2.2. Proliferación Celular

A efectos de corroborar que la dermis tratada influye positivamente sobre el desarrollo y proliferación celular, se diseñó un ensayo que estudia cuantitativamente este efecto.

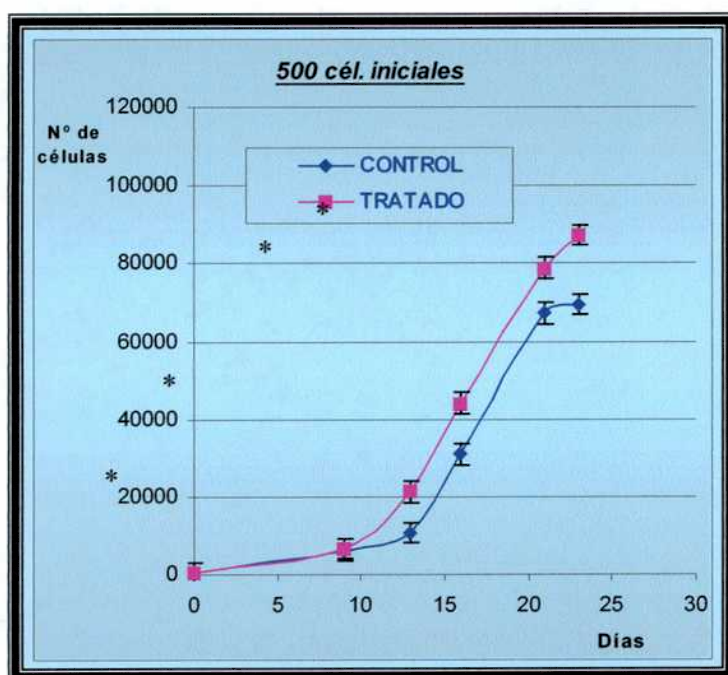
Sobre un cultivo de fibroblastos se determinó el número de células generadas a distintos tiempos en presencia y ausencia de una solución de dermis porcina. Se trabajó con un bajo número de células iniciales con el fin de seguir su evolución durante tiempos largos y no permitir al cultivo llegar a la confluencia. El ensayo consistió en sembrar 2,5 células/mm² en placas de poliestireno. La dermis tratada fue agregada a la mitad de la placa (*"Ensayo tratado"*), mientras que la otra mitad se reservó como control (*"Ensayo control"*). A los 9, 13, 16, 21 y 23 días, se despegaron las células adheridas a la superficie de cultivo por tripsinización y se realizó la cuantificación de las suspensiones celulares.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Día		CONTROL	TRATADO	p
9	Nº células cosechadas	6.250 ± 700	6.620 ± 800	NS
	Incremento absoluto respecto del día 0	12,5	13,3	
	Incremento porcentual respecto del control		6 %	
13	Nº células cosechadas	10.750 ± 1.500	21.250 ± 1.500	p<0,05
	Incremento absoluto respecto del día 0	21,5	42,5	
	Incremento porcentual respecto del control		97 %	
16	Nº células cosechadas	31.000 ± 2.500	44.120 ± 1.800	p<0,05
	Incremento absoluto respecto del día 0	62	88	
	Incremento porcentual respecto del control		42 %	
21	Nº células cosechadas	67.200 ± 2.700	78.750 ± 2.500	p<0,05
	Incremento absoluto respecto del día 0	134,4	157,5	
	Incremento porcentual respecto del control		17 %	
23	Nº células cosechadas	69.500 ± 3.700	87.340 ± 3.500	p<0,05
	Incremento absoluto respecto del día 0	139	174,7	
	Incremento porcentual respecto del control		26 %	

La observación de estos resultados indica que la dermis no sólo no es citotóxica sino que, además, influye positivamente sobre el desarrollo de los fibroblastos en cultivo. En todo momento el número de células cosechadas en la serie de ensayos "tratado" fue mayor que el número obtenido en la serie "control", infiriéndose que la dermis actúa favoreciendo la proliferación de los fibroblastos.

En el siguiente gráfico, se representan los datos de la tabla previa mediante curvas de crecimiento celular.



* p<0,05

El perfil de la curva de crecimiento para la serie "control", muestra un desarrollo lento (hasta el día 13). Luego se observa una fase de crecimiento exponencial que se extiende hasta el día 20, a partir del cual se establece una meseta.

La serie "tratada" muestra un perfil similar, señalando que la presencia de la dermis porcina no altera el metabolismo y la fisiología de la célula. Inclusive, hasta los 9 días de iniciado el cultivo, no se encontraron diferencias significativas entre el número de células de ambas series. Desde ese día comienza la fase de crecimiento exponencial que se prolonga hasta el día 23, y en esta fase de la curva se observa un mayor ($p < 0.05$) número de células respecto del "control". A diferencia de lo encontrado en la serie "control", aquí no se detecta la tendencia al "plateau", dado que las células "tratadas" continúan aumentando en número por lo menos hasta el día 23 (último día ensayado). Probablemente, si se hubiera prolongado el tiempo de cultivo se habría observado el mismo efecto.

La conclusión de este ensayo es que la dermis porcina liofilizada o alguno de sus componentes poseen propiedades mitogénicas en el cultivo de fibroblastos *in vitro*. Los ensayos de Lindberg & Badylak (2001) apoyan esta conclusión, ya que una matriz de submucosa de intestino de cerdo produjo un efecto similar sobre el crecimiento y proliferación de células epidérmicas y fibroblastos en un cultivo primario mixto. El resultado de las experiencias de Kerkvliet, *et. al.* (2003), quienes midieron la síntesis de ADN como indicador de la proliferación de fibroblastos de periosteo de conejo, indica también que los colágenos tipo I y III modulan la proliferación celular. Observaron que el aumento en la síntesis de ADN depende de la dosis de colágeno, sin embargo esto es sólo evidente luego de un periodo inicial de 48 h de cultivo. Esto último sugiere que, probablemente, se realice la síntesis de uno o más intermediarios (factores de crecimiento, citoquinas, etc.) durante los periodos iniciales del cultivo como requisito previo a la replicación celular.

2.3. Efecto de los GAGs Mayoritarios de la Dermis Liofilizada Sobre el Cultivo Celular

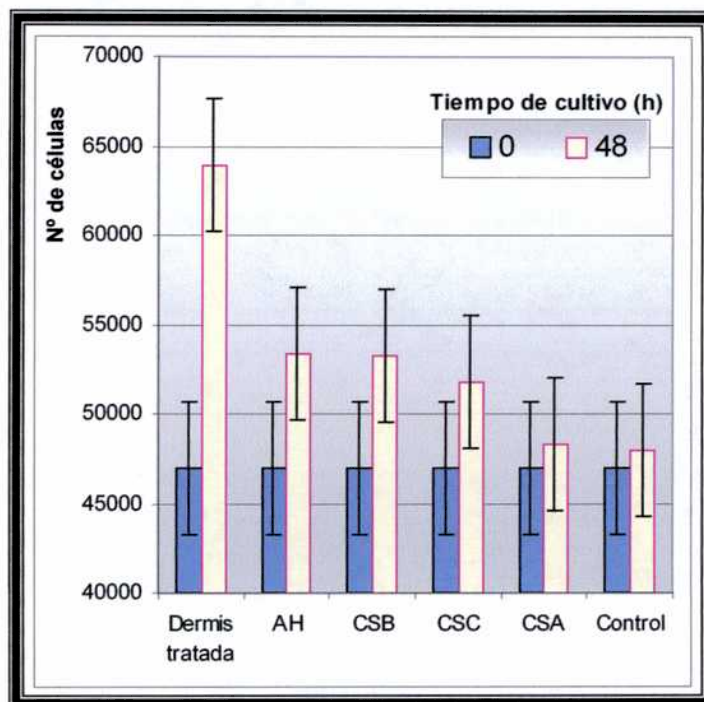
La caracterización de dermis porcina (primer capítulo de esta tesis) incluyó la determinación del contenido de los GAGs tanto en la dermis fresca como en la tratada (**Etapas 5.a.**). Los GAGs que se encontraban en mayor proporción en ambos casos fueron CSA, CSC, CSB (DS) y AH.

Para verificar si la actividad mitogénica de la dermis porcina podía ser atribuida a alguno/s de ellos, en este segundo capítulo se planteó la realización de un cultivo de fibroblastos en presencia de estos compuestos. A efectos de normalizar los resultados, se empleó en los cultivos una concentración de GAGs similar a la encontrada en la dermis, por lo tanto la cantidad agregada de cada uno correspondió a la cantidad detectada en 100 µg de dermis tratada.

Para ello se realizaron ensayos –**Serie “A”**– donde se sembraron 250 células/mm² en presencia de los GAGs correspondientes. De manera simultánea se realizaron ensayos control, sin el agregado de componentes exógenos. Se incluyó además un ensayo con el agregado de dermis porcina liofilizada solamente con fines comparativos. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. A las 48 h de iniciado el cultivo, se efectuaron observaciones microscópicas y cuantificación de las células generadas.

Los resultados de la serie “A”, se muestran a continuación.

Ensayo	Nº de células a las 48 h	% de proliferación
Dermis tratada	63900 ± 3700	35.9
AH	53400 ± 3700	13.6
CSB	53300 ± 3000	13.4
CSC	51800 ± 3100	10.2
CSA	48300 ± 3500	2.7
Control	48000 ± 2900	2.1



El número de fibroblastos cosechados al finalizar el ensayo indica que, ninguno de los GAGs resulta citotóxico para los fibroblastos en cultivo y que, tanto la dermis tratada como cada uno de los GAGs producen un aumento de la proliferación celular respecto del día 0 (47.000 células iniciales).

El mayor efecto observado sobre la proliferación es producido por adición de la dermis porcina ya que, el número de células a las 48 h de cultivo está significativamente aumentado ($p < 0,05$) con respecto a las del control (63.900 ± 3.700 vs 48.000 ± 2.900) y con respecto a las de cada uno de los GAGs analizados ($p < 0,05$).

No hay diferencias significativas entre el número de células desarrolladas por la adición de AH, DS, CSC y CSA por separado (% de proliferación: 13,6; 13,4; 10,2 y 2,7 respecto del control), aunque se observa una tendencia del HA, DS y CSC a favorecer el desarrollo celular.

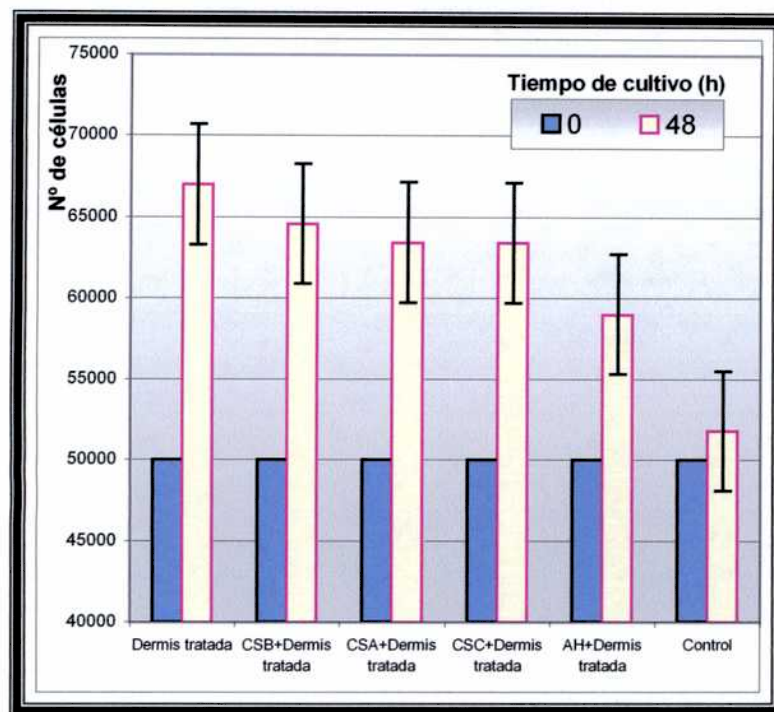
Por ende se puede señalar que, los componentes constitutivos de la dermis tratada en forma global son los responsables del substancial efecto mitogénico observado y que, los GAGs individualmente producen algún tipo de efecto que no es comparable cuantitativamente al global, no pudiendo considerarse a ninguno de ellos un marcador de la proliferación celular.

En general, los GAGs están sobreexpresados durante las etapas tempranas de la cicatrización y luego retornan a los niveles basales. Además, el entrecruzamiento entre colágeno y GAGs proporciona al tejido firmeza y resistencia a la digestión por colagenasa (Prathiba & Gupta, 2000). Por lo tanto, la disponibilidad de los GAGs durante la etapa de la reepitelización es diferente y, en consecuencia, la actividad celular podría modificarse en base a la concentración de los mismos y/o a la facilidad con que puedan liberarse de su unión a proteínas. Debido a esto, resultó de interés evaluar si el agregado simultáneo de cada uno de los GAGs junto a la matriz dérmica modificaba el efecto mitogénico de la dermis sola sobre el cultivo celular (Serie "A").

Para ello se llevaron a cabo los ensayos de la Serie "B" con 250 células/mm², a las cuales se les agregó una mezcla de 100 µg de dermis tratada más la misma cantidad de GAGs utilizados en la Serie "A". Con fines comparativos, se cultivaron células en presencia de solamente 100 µg de dermis. De manera simultánea se realizaron ensayos control (sin agregados exógenos). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y, a las 48 h, se efectuaron los recuentos microscópicos.

Los resultados se muestran a continuación.

Ensayo	Nº de células a las 48 h	% de proliferación
Dermis tratada	67000 ± 3700	34,0
CSB+DT	64600 ± 2700	29,2
CSA+DT	63400 ± 2000	26,9
CSC+DT	63400 ± 2900	26,8
AH+DT	59000 ± 2700	18,1
Control	51800 ± 2000	3,6



DT: Dermis tratada

CSB: Dermatan sulfato

El análisis de los datos presentados indica que todos los agregados produjeron un aumento en el número de células cosechadas a las 48 h de iniciado el cultivo. Nuevamente, el mayor efecto sobre la proliferación de los fibroblastos fue producido por la adición de dermis tratada (67.000 ± 3.700 células vs. 51.800 ± 2.000 células) que representa un aumento en la proliferación de 34 % respecto al día de inicio.

En esta oportunidad, el agregado conjunto de GAGs y dermis tratada no mejora el comportamiento fisiológico celular ya que la proliferación alcanza el valor obtenido por la adición de la dermis tratada pero no lo sobrepasa ($p > 0,05$). El aumento de concentración de cada GAG por encima del valor hallado en la dermis tratada, no contribuye a mejorar su efecto mitogénico, al menos en este modelo propuesto de cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos.

El empleo de GAGs en la elaboración de una matriz sintética podría tener como efecto beneficioso aumentar la retención de agua favoreciendo la hidratación de la MEC y la unión de moléculas efectoras (factores de crecimiento, citoquinas, etc). Por lo tanto, una matriz modificada en esas condiciones podría interactuar selectivamente con las células del entorno y favorecer la regeneración tisular *in vivo*. En relación a esto, Daamen *et al.* (2003) enriquecieron con CSA una matriz sintética constituida por colágeno y elastina la cual no alteró la morfología de los fibroblastos ni favoreció la proliferación celular (medida indirectamente por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial). El único efecto beneficioso de esta modificación fue la retención de mayor proporción de agua.

Estos últimos resultados (inmovilización de GAGs en la matriz), junto a los resultados de esta sección (agregado de GAGs solubles) son coincidentes, demostrando que el GAG *per se* no produce ningún efecto beneficioso sobre la proliferación celular. Posiblemente se requiera de la participación de los otros GAGs o de algún otro elementos para favorecerla.

2.4. Migración Celular

Con el propósito de comprobar el efecto quimiotáctico observado en los ensayos realizados en presencia de fibras de dermis (sección 2.1.) se diseñó un experimento que permitiera poner de manifiesto la locomoción celular. En un cultivo de fibroblastos iniciado con una alta densidad celular y luego incubado durante 7 días hasta llegar a la confluencia, se removieron las células adheridas de un sector de la superficie de la placa. Luego de agregar la suspensión de fibras de dermis, la evolución del cultivo fue observado en función del tiempo y comparado con los controles correspondientes.

En las fotografías incluidas al final del capítulo pueden percibirse detalles de las observaciones realizadas. En la Foto A (cultivos control) se muestra el aspecto del cultivo inmediatamente después de la remoción celular. En el extremo superior de la fotografía se advierte la falta de una porción importante de la capa celular, y en el inferior las células remanentes permanecen bien adheridas. A las 18 horas, un gran número de células había avanzado hacia la zona libre (Foto B) y a las 24 horas habían cubierto una distancia mayor (Foto C). Esta distancia no pudo ser cuantificada dada la morfología heterogénea de los fibroblastos y el crecimiento desordenado en algunos sectores de la zona de migración. Sin embargo, la apreciación visual permitió establecer que, si se tomaba como “unidad arbitraria” la longitud promedio de un fibroblasto en esa zona de migración, a las 24 horas de incubación las células habían avanzado entre dos y tres “unidades arbitrarias”.

En cambio en los ensayos realizados en presencia de fibras de dermis el efecto no fue tan marcado. Si bien las células habían invadido la zona de migración, en cada uno de los períodos evaluados, tanto el número celular como la distancia recorrida fue menor. Analizando la secuencia temporal (Fotos D-E-F, 12, 18 y 24 h respectivamente), se advierte que los fibroblastos no habían avanzado más de 1,5 a 2 unidades “arbitrarias”. Del mismo modo, la densidad celular en el frente de avance fue menor con respecto a los controles en todos los casos.

Estos resultados sugieren que, al menos en este modelo *in vitro*, la dermis tratada no favorece la migración celular, resultados que aparentan ser contradictorios con los de la sección 2.1. donde se postuló una acción quimiotáctica de la dermis sobre los cultivos fibroblásticos. Esta discrepancia podría explicarse por el empleo de condiciones experimentales diferentes.

Las observaciones preliminares se realizaron empleando una monocapa continua y se analizaron al cabo de 48 h. En esta sección, se redujo el número de células en cultivo por remoción, y los períodos analizados fueron más breves (12, 18 y 24 h). Por lo tanto, se especula que cuando la monocapa está intacta se vería favorecida la adhesión de los fibroblastos a las fibras de dermis, las cuales ejercerían una acción quimiotáctica local (Foto 31-332, sección 2.1.). En cambio, la discontinuidad de la monocapa eliminaría zonas de contacto para la adhesión de la matriz dérmica, con la consecuente disminución de la interacción célula-matriz y dilución del efecto quimiotáctico.

2.5. Optimización de las condiciones de arresto celular

El estudio del ciclo celular de los fibroblastos requiere la sincronización de todas las células en una misma etapa, con la finalidad de normalizar el estado del desarrollo celular y contar con un número importante de células en el mismo estadio de división. El arresto o sincronización en la fase G0/G1 pudo lograrse con la disminución drástica de la concentración de SFB en el medio (Andrecht *et al.* 2002; Takeuchi, 2004) o por inhibición por contacto celular (Wieser & Oesch, 1986).

Tomando en consideración que los fibroblastos en cultivo poseen la capacidad de desarrollarse adheridos a una superficie, y que tal capacidad se pierde cuando sobreviene la muerte celular, se diseñó un experimento para determinar si el tiempo de incubación en condiciones de arresto (sin SFB) afectaba negativamente su viabilidad. Este ensayo permitirá establecer también la máxima densidad celular que es capaz de soportar la restricción de nutrientes.

Los fibroblastos suspendidos en medio MEM básico (sin el suplemento de SFB) fueron sembrados utilizando diferentes densidades (100, 250, 500 y 1.000 células/mm²) y la evolución del cultivo fue inspeccionada microscópicamente a las 48 y 72 h de iniciado el ensayo.

En todos los casos el análisis visual indicó que las células permanecían adheridas a la superficie de cultivo hasta las 72 h.

Con densidades celulares entre 100 y 250 células /mm², la presencia de fibroblastos en proceso de división fue una clara evidencia de que el ciclo celular no estaba completamente detenido. Cabe recordar que el ensayo había sido iniciado como subcultivo de un pasaje previamente suplementado con SFB. Por lo tanto, no es extraño suponer que, durante el cultivo en esas óptimas condiciones, las células recibieron el estímulo suficiente de factores de crecimiento para hacerlas progresar a lo largo del ciclo celular. De este modo una vez iniciada la división ésta se continúa aún en ausencia de SFB. Resulta evidente que en las condiciones de este ensayo (baja densidad celular) no fue suficiente la depleción de nutrientes como para detener el desarrollo celular a las 72 h.

Sin embargo la ausencia de figuras en división fue notoria cuando la densidad celular inicial fue elevada (500 a 1.000 células/mm²), es decir cuando las membranas plasmáticas tomaban contacto estrecho entre sí. En este caso se estableció la inhibición por contacto, descrito por Wieser & Oesch, (1986).

Si bien para algunos autores (Andrecht *et al.* 2002; Takeuchi, 2004), es necesario contar con un porcentaje mínimo de 0.5% de SFB en el medio para mantener viables las células, en este ensayo de optimización quedó demostrado que los fibroblastos son capaces de resistir condiciones extremas de falta de nutrientes, y pueden permanecer viables, aún por períodos de 72 h en medios de cultivo no proteicos. Además, si el proceso de mitosis se inició mientras las células estaban en un medio de cultivo enriquecido, estas mitosis se continuaban en el nuevo cultivo (sin SFB), sin embargo en este medio no era posible inducir nuevas divisiones mitóticas.

En consideración de estos resultados el estudio posterior del ciclo celular se llevará a cabo mediante un arresto de 72 h en ausencia de SFB, y partiendo de una densidad celular elevada, de 1.000 células/mm².

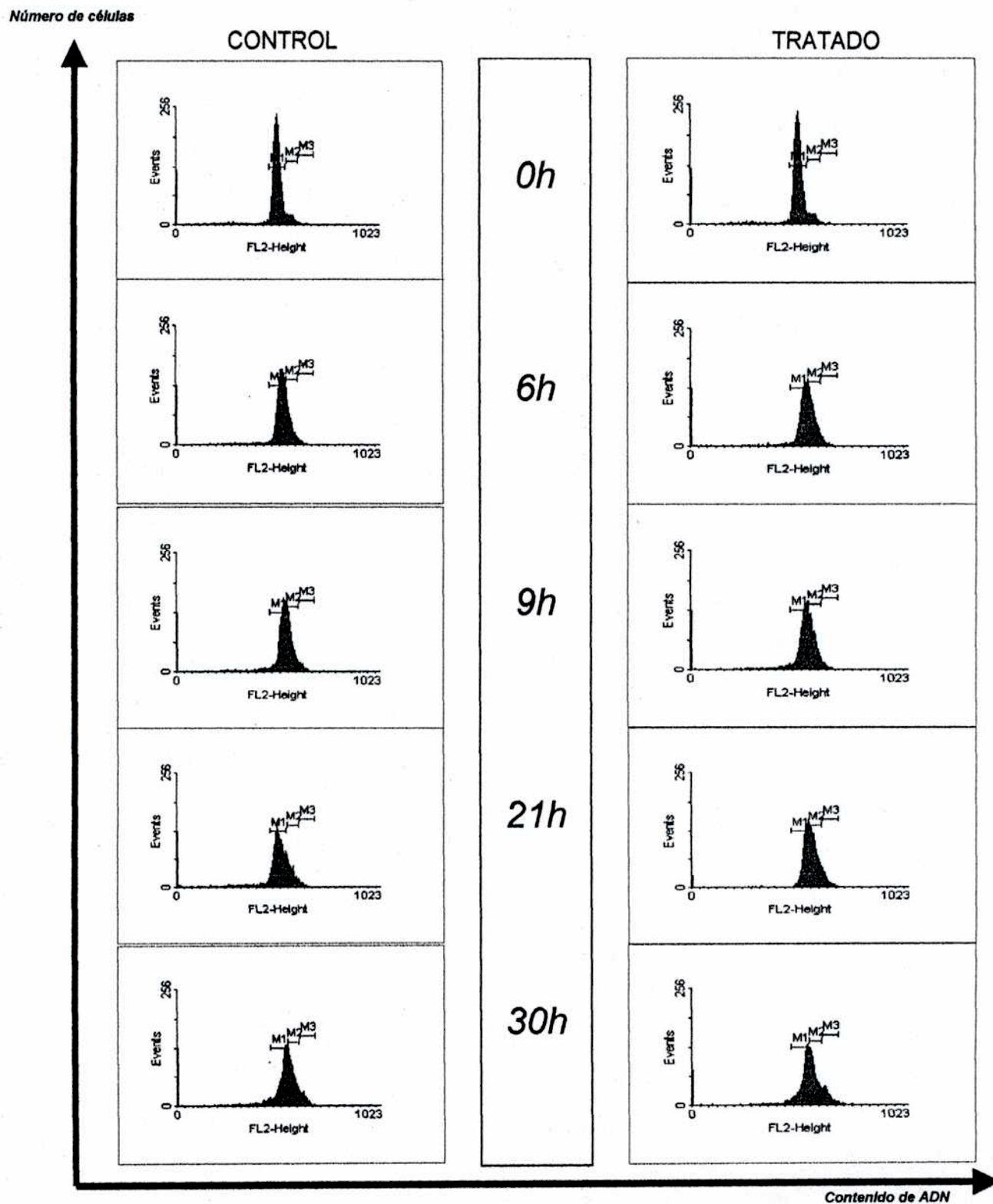
2.6. Duración del Ciclo Celular de Fibroblastos

Durante la proliferación y replicación, las células atraviesan diversas fases, cada una de las cuales está caracterizada por diferentes funciones metabólicas y filológicas. Luego de un estado inicial (G0/G1) comienza la síntesis activa de ADN (fase S) que culmina con el proceso de mitosis (G2/M).

Consecuentemente, el contenido de ADN en las células es el parámetro más apropiado para monitorear la proliferación celular. El histograma de la distribución del ADN provee, entre otros datos, información acerca de la proporción de células en fase S (Diaconu *et al.*, 2004).

Con la finalidad de evaluar si la dermis tratada tiene algún efecto sobre la síntesis de ADN de los fibroblastos en cultivo, se empleó la citometría de flujo. Esta permitiría detectar cambios en el contenido de ADN celular y verificar si se modifica la duración del ciclo celular. Los ácidos nucleicos marcados con un fluorocromo emiten fluorescencia proporcional al contenido cromosómico global. De esta manera se produce un perfil característico que refleja las fases del ciclo celular dentro de la población de células en estudio.

Este experimento consistió en, cultivar fibroblastos en ausencia (control) y presencia (tratada) de dermis. Este cultivo se extendió durante 30h y, cada 3 h se retiraron muestras de células de ambos ensayos (control y tratado), previamente sincronizadas en fase G0. Luego de la marcación con Ioduro de Propidio y aplicación de citometría de flujo, los datos obtenidos fueron analizados con el programa Win MDI 2.8. Los histogramas para los tiempos 0, 6, 9, 21 y 30 h de tratamiento se muestran en la siguiente figura:



Histogramas de fibroblastos analizados por citometría de flujo. Las células fueron sincronizadas en G0, por incubación con medio de cultivo en ausencia de SFB durante 72 h y, posteriormente estimuladas por el agregado de 10% de SFB (CONTROL) y suspensión de dermis porcina (TRATADO) para reiniciar el ciclo celular. Los tiempos en horas indican, cuando las células fueron tripsinizadas y fijadas, para luego ser teñidas con ioduro de Propidio y analizar su contenido de ADN por citometría de flujo. M1, M2 y M3 son rangos de marcación que corresponden a las fases G0/G1, S y G2/M respectivamente, analizados mediante el programa WinMDI.

El histograma correspondiente a la citometría de flujo de las células control, arrestadas y marcadas al inicio del ensayo (tiempo cero) se empleó para determinar la extensión de las ventanas correspondientes a cada una de las fases del ciclo celular (definidas como M1, M2 y M3).

La inspección visual de los histogramas (control y tratado) pone de manifiesto un cambio gradual de su apariencia con el transcurso del tiempo. Se observó corrimiento del pico hacia las zonas de mayor contenido de ADN, con una disminución progresiva de la altura y un ensanchamiento de la base del histograma. El análisis de estos eventos sugiere que la proporción de células en fase G0/G1 (M1) disminuye y aumenta en consecuencia la proporción en fase S (M2). Este resultado es coincidente con una proliferación de células en un medio de cultivo apto (Takeuchi, 2004).

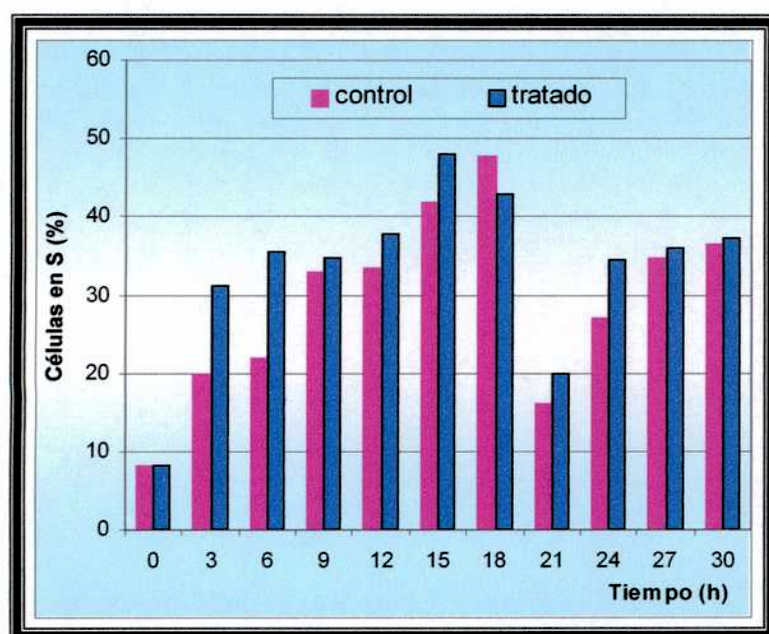
Esta observación se aprecia tanto para las células *control* como para las *tratadas* con dermis porcina. Con lo cual se puede afirmar que el producto no afecta negativamente la síntesis de ADN.

Por otro lado, cuando se realizan comparaciones de los histogramas control y tratado para un mismo tiempo, se puede advertir que, en los ensayos tratados, se produjo un desplazamiento levemente mayor de los picos hacia la zona de síntesis de ADN (M2). Si bien este desplazamiento es pequeño, está presente en todos los tiempos estudiados, indicando que la dermis porcina estaría ejerciendo un efecto positivo sobre la síntesis de ADN de los fibroblastos cultivados.

Estos resultados apoyan la conclusión obtenida en el ensayo de proliferación (2.2.) donde se propone que la dermis ejerce un efecto mitogénico sobre los fibroblastos. Además, son coincidentes con la observación de Kerkvliet, *et. al.* (2003), quienes demostraron que la incorporación de colágenos tipo I y III al cultivo de fibroblastos, produce aumento en la síntesis de ADN.

Para mejorar el análisis del efecto de la dermis sobre la síntesis de ADN y realizar una comparación más adecuada respecto de los controles, los datos colectados del citómetro de flujo fueron volcados en un gráfico en el que se representó el porcentaje de células en la fase S en función del tiempo de incubación.

El gráfico se expone a continuación.



En el perfil de las células control se advierte un aumento gradual de la síntesis de ADN hasta 18 h de iniciado el cultivo. Al cabo de este tiempo, el número de células en fase S baja abruptamente hasta valores similares a los iniciales, para comenzar luego un nuevo incremento gradual. Esto significa que después del arresto, las células debieron atravesar una fase de síntesis activa de ADN antes de completar el proceso de división celular. Este proceso se completa cuando se llega al punto de mínimo porcentaje de células en la fase S (M2).

Con respecto a las células "tratadas", el perfil es análogo, sin embargo, se observa que el aumento de la síntesis de ADN ocurre durante las primeras 15 h de iniciado el cultivo. Esta diferencia de 3 h entre las células control y las tratadas, indica que éstas últimas alcanzan la máxima síntesis de ADN antes que las células control. Esto permite inferir que el agregado de dermis porcina liofilizada al medio de cultivo es capaz de producir un acortamiento del ciclo celular de los fibroblastos humanos utilizados como modelo.

Otra de las observaciones interesantes, es que el porcentaje de células en proceso de síntesis es siempre mayor en los cultivos tratados, para todos los tiempos analizados.

Existen pocos trabajos en la literatura que estudien el efecto de un sustituto de dermis completo sobre el ciclo celular de un cultivo *in vitro*, con lo cual resulta difícil realizar comparaciones con trabajos anteriores. Sin embargo el agregado de distintos componentes de matriz extracelular a cultivos *in vitro* permite hacer un análisis aproximado. Greco *et al.*, (1998) demostraron que el AH estimulaba la proliferación de fibroblastos humanos anclados a una matriz de colágeno. Además comprobaron mediante citometría de flujo que este suplemento producía un leve incremento en la velocidad de la división celular y síntesis de ADN.

Es importante destacar que en el modelo de cultivo *in vitro* elegido en esta tesis, el agregado de AH (2.3.) no produjo un aumento de la proliferación celular.

Dado que en este último ensayo se utilizaron los componentes solubles de la dermis, es probable que se requiera de la acción conjunta de varios de estos compuestos para inducir la síntesis de ADN.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GENERALES DEL CULTIVO DE FIBROBLASTOS

1/2



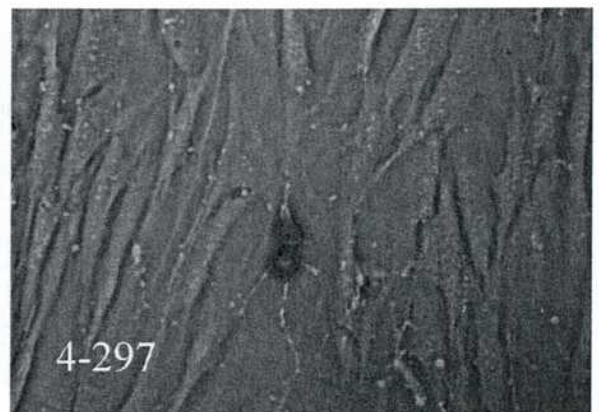
Cultivo de 48 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (200x). Se observan células alargadas con núcleos grandes.



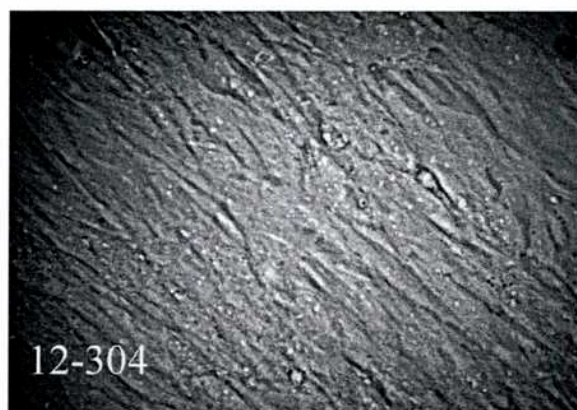
Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (400x). Nótese las interconexiones a través de las prolongaciones citoplasmáticas.



Cultivo de 48 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (200x). Obsérvese la forma triangular que adoptan algunas células tras la emisión de las prolongaciones citoplasmáticas que favorecen el contacto intercelular.



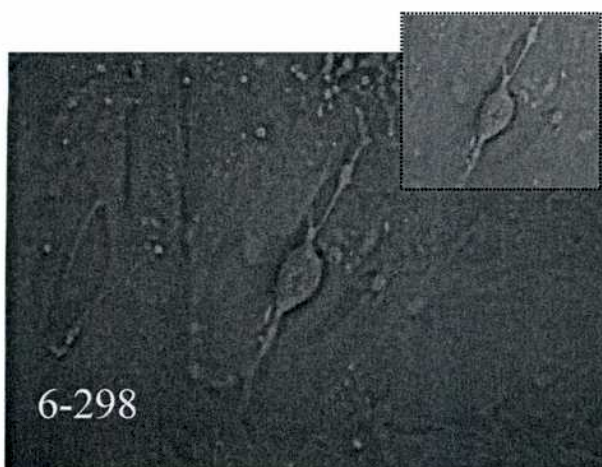
Cultivo de 48 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (200x). Detalle de una mitosis, los núcleos están separados y rodeados por una membrana, pero aún no ha concluido la división citoplasmática que dará origen a dos células hijas. Obsérvese que las células continúan adheridas a la superficie de cultivo.



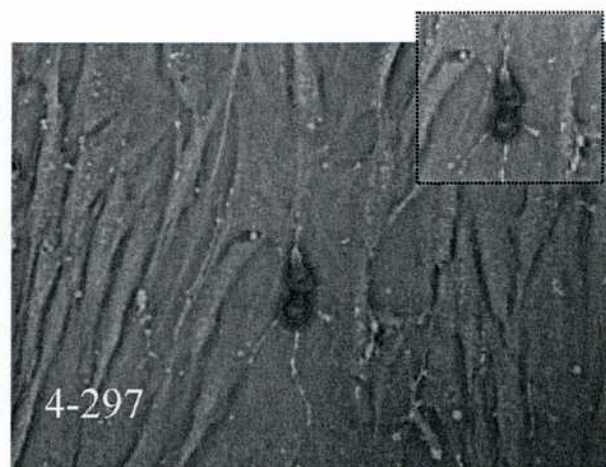
Cultivo de 120 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (200x). El aspecto del cultivo es más homogéneo y puede observarse la disposición paralela que adoptan las células cuando el contacto es estrecho.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GENERALES DEL CULTIVO DE FIBROBLASTOS

2/2



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (400x). Detalle de una mitosis. La célula permanece adherida a diversos puntos en la superficie de cultivo. Nótese la refringencia de la membrana celular, la pérdida de nitidez de la membrana nuclear y el detalle de la cromatina.



Cultivo de 48 horas de evolución, densidad celular inicial 40 cél./mm², pasaje 10, (200x). Detalle de una mitosis, los núcleos están separados y rodeados por una membrana, pero aún no ha concluido la división citoplasmática que dará origen a dos células hijas. Obsérvese que las células continúan adheridas a la superficie de cultivo.

DENSIDAD CELULAR DEL CULTIVO DE FIBROBLASTOS 1/2



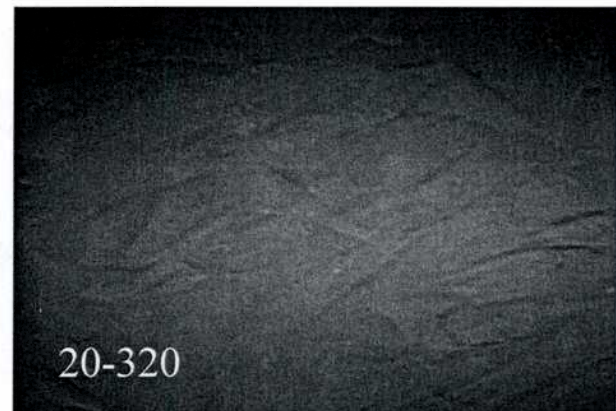
Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 1000 cél./mm², pasaje 11, (200x), 10 % SFB. Se observan fibras ordenadas en paralelo. Ausencia de figuras en división



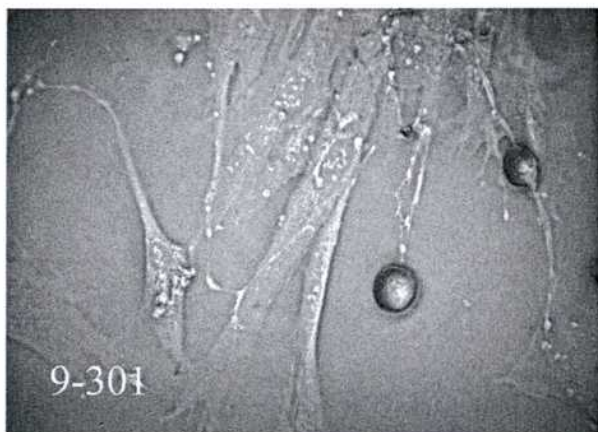
Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 1000 cél./mm², pasaje 11, (200x), 0 % SFB. Se advierte morfología poligonal compatible con fibroцитos.



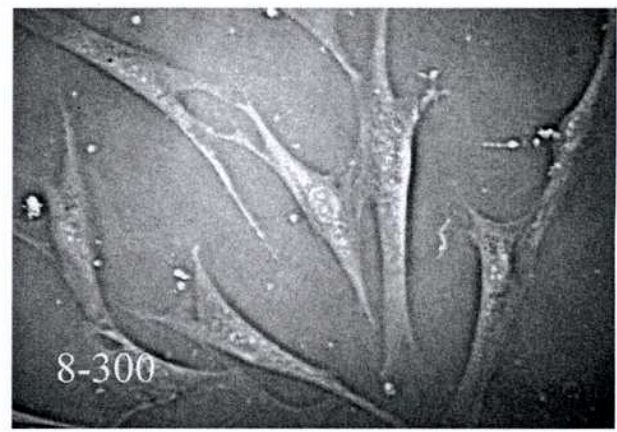
Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 500 cél./mm², pasaje 11, (200x), 10 % SFB. Se observan fibras ordenadas en paralelo. Ausencia de figuras en división



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 500 cél./mm², pasaje 11, (200x), 0 % SFB. Se diferencian estructuras tipo fibra.



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 250 cél./mm², pasaje 11, (400x), 10 % SFB. Se diferencia morfología tipo fibra, figuras en división e interconexiones celulares.



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 250 cél./mm², pasaje 11, (400x), 0 % SFB. Se diferencia morfología tipo fibra e interconexiones celulares. No se advierten figuras mitóticas

DENSIDAD CELULAR DEL CULTIVO DE FIBROBLASTOS 2/2



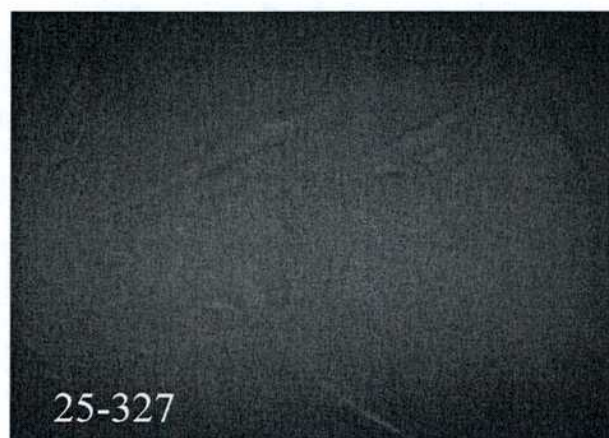
Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 100 cél./mm², pasaje 11, (200x), 10 % SFB. Se diferencia morfología tipo fibra, figuras en división e interconexiones celulares.



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 100 cél./mm², pasaje 10, (200x), 0 % SFB. Se diferencia morfología tipo fibra.



Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 50 cél./mm², pasaje 11, (200x), 10 % SFB. No se observan figuras en división.

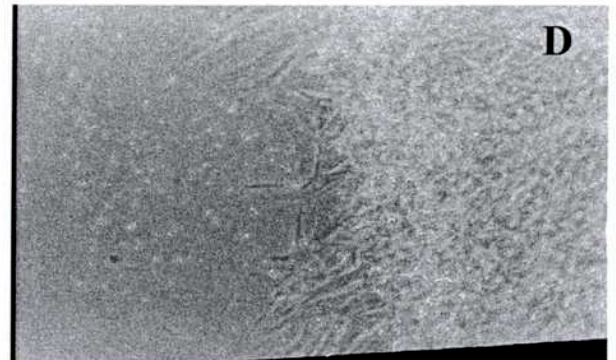


Cultivo de 72 horas de evolución, densidad celular inicial 50 cél./mm², pasaje 11, (200x), 0 % SFB. No se observan figuras en división.

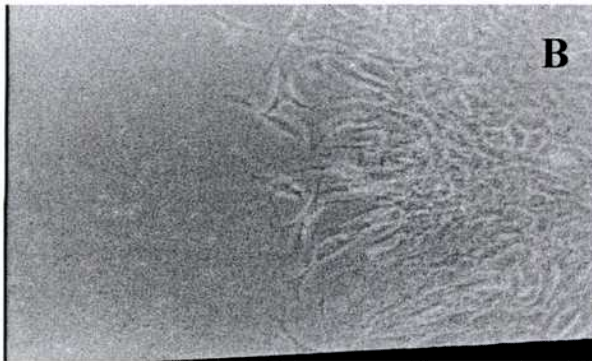
MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS



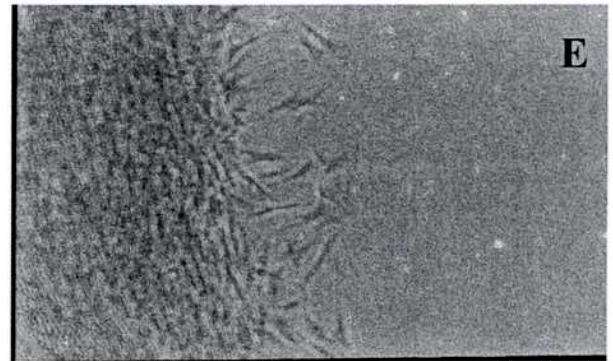
Cultivo de 7 días de evolución, a las 0 horas de remover parte de la superficie celular.



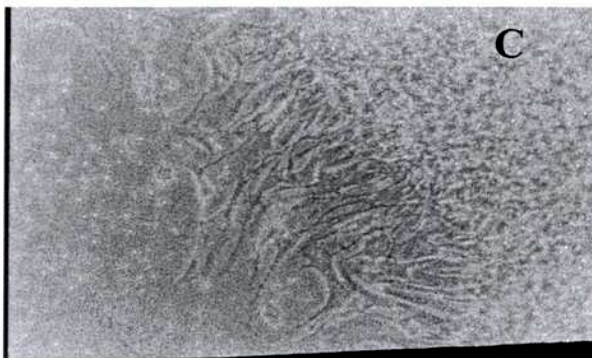
Cultivo de 7 días de evolución, a las 12 horas de remover parte de la superficie celular e incorporar Dermis Tratada.



Cultivo de 7 días de evolución, a las 18 horas de remover parte de la superficie celular.



Cultivo de 7 días de evolución, a las 18 horas de remover parte de la superficie celular e incorporar Dermis Tratada.



Cultivo de 7 días de evolución, a las 24 horas de remover parte de la superficie celular.



Cultivo de 7 días de evolución, a las 24 horas de remover parte de la superficie celular e incorporar Dermis Tratada.



CONCLUSIÓN

- ✓ La metodología que se estudió y describió es considerada como la más adecuada para el aislamiento y cuantificación en forma conjunta de los componentes de la dermis activos biológicamente.
- ✓ Los componentes de importancia, ordenados de mayor a menor, son: colágeno tipo III, tipo I, proteoglicanos conteniendo ácido hialurónico, condroitín sulfato A+C, dermatán sulfato, keratán sulfato y proteínas no colágenas (fibronectina, laminina).
- ✓ La escasa diferencia descrita al comparar la dermis fresca y tratada, es indicativa de que el tratamiento industrial que se aplica para su comercialización, no afecta en forma importante sus características físicas y posiblemente las biológicas.
- ✓ La similitud cualitativa y cuantitativa hallada entre piel humana y dermis porcina refuerza la sugerencia de utilizar esta última como apósito temporario sustituto de la piel humana.
- ✓ El cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos optimizado es un modelo apto para evaluar algunas características de la actividad biológica del pulverizado de dermis porcina y/o de alguno de sus componentes mayoritarios.
- ✓ El análisis del efecto de la dermis sobre la morfología de los fibroblastos demostró que ésta no es citotóxica y no altera las propiedades de adhesión de las células. Es importante destacar que se comporta también como un excelente sustrato para facilitar la adhesión celular, mecanismo mediado probablemente por quimiotaxis.
- ✓ El estudio de la migración celular demuestra que la dermis porcina ejerce un efecto quimiotáctico local sólo en presencia de una monocapa celular. Este hallazgo debe de considerarse para la aplicación terapéutica de la dermis ya que sólo podría establecerse el nuevo tejido dérmico si quedaran células remanentes sobre la superficie cruenta.
- ✓ La acción observada sobre la proliferación celular apoya la propuesta de que la dermis posee propiedades mitogénicas.
- ✓ El estudio del ciclo celular indica una constante síntesis de ADN y un acortamiento importante de la duración del mismo, eventos que apoyan una vez más, el efecto mitogénico atribuido a la dermis.
- ✓ Los resultados presentados y discutidos en esta tesis, en cuanto a la descripción de las características de las dermis, la comparación entre dermis fresca y tratada, la comparación entre dermis porcina y piel humana, y la descripción de su actividad biológica, respaldan la utilización de la misma como sustituto de piel humana para el tratamiento de diferentes patologías.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albini, A. & Adelman Grill, B.C.** 1985. Collagenolytic cleavage products of collagen type I as chemoattractants for human dermal fibroblasts. *Eur J Cell Biol.*; **36**:104-107.
- Andrecht, S.; Kolbus, A.; Hartenstein, B.; Angel, P. & Schorpp-Kistner, M.** 2002. Cell Cycle Promoting Activity of JunB through Cyclin A Activation. *Biol. Chem.*, **277(39)**:35961-35968.
- Antonopoulos, C.A.; Axelsson, I.; Heinegard, D. & Gardell, S.** Extraction and purification of proteoglycans from various types of connective tissue. 1974. *Biochim. Biophys. Acta*, **338**: 108-119.
- Artigas, R.; Egger, E.; Hernan, E. & Centeno, G.** 1980. Combinación de sulfadiazina de plata y nitrato de cerio empleado como tópico local en quemaduras. *Cir. Plást. Ib. Lat. Americana*, **6**:1470-1520.
- Beele, H.** 2002. Artificial Skin: Past, Present and Future. *The international Journal of Artificial Organs*. **25**:163-173
- Benaim, F.** 1968. Quemaduras, Cap. 6. En: Patología Quirúrgica. Editor Michans, J.R. Ed. El Ateneo-2^{da} Ed. Bs. As.
- Benaim, F.** 1970. Personal opinion on a uniform classification of the depth of burns. Transactions of the 3rd international Congress on Research in Burns. Praga.
- Benaim, F.** 1984. Quemaduras. Cap. 10. En: Tratado de cirugía. Editor Torres, R. Ed. Interamericana. México D.F.
- Bitter, T. & Muir, H.M.** 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**:330-335.
- Boyce, S.T.** 2001. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns*, **27**:523-533.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Breen, M.; Weinstein, H.G.; Johnson, R.L.; Veis, A. & Marshall, R.T.** 1970. Acidic Glycosaminoglycans in Human Skin During Fetal Development and Adult Life. *Biochim. Biophys. Acta* **201**:54-60.
- Broek, D.L.; Madri, J.; Eikenberry, E.F. & Brodsky B.** 1985. Characterization of the Tissue Form of Type V Collagen from Chick Bone. *J. Biol. Chem.*, **26(1)**:555-562.
- Brown, A.S. & Barot, R.L.** 1986. Biological dressing and skin substitutes. *Clinics in Plastic Surgery*, 13-69.
- Buchans, I.A.; Andrews, J.K. & Lang, S.M.** 1982. Laboratory Investigation of the composition and properties of pig skin wound exudate under op-site.. *Burns*, **8**:39.

- Burton, J.L. & Eblin, F.J.G.** 1986. Disorders of Connective Tissue en: Text Book of Dermatology Vol 3 Ed. Rook, A., Wilkinson, D.S.; Eblin, F.J.G.; Champion, R.H. & Burton, J.L. Blackwell. Scientific Oxford. 1787-1857.
- Carney, S. L.** 1986. Proteoglycans, chapter 4. In Carbohydrate analysis. M. F. Chaplin and J.F. Kennedy (eds.), A Practical Approach. IRL Press Limited, pp. 97-141.
- Chandrakasan, G.; Torchia, D.A. & Piez, K.A.** 1976 Preparation of Intact Monomeric Collagen from Rat Tail Tendon and Skin and the Structure of the Nonhelical ends in Solution. *J. Biol. Chem.*, **251(19)**:6062-6067.
- Chipev, C.C. & Simon, M.** 2002. Phenotypic Differences Between Dermal Fibroblasts from Different Body Sites Determine their Responses to Tension and TGF β -1. *BMC Dermatology* **2**:1-13
- Clark, R.A.F.** 1993. Dermatology in General Medicine. Ed Fitzpatrick, T.B.; Eisen, A.Z.; Wolff, K.; Freedberg, I.M. & Austen, K.F. Mc Graww Hill. N.Y.
- Cormack, D.H.** 1988. En: Histología de HAM. Novena Edición. Ed. Harla México.
- Daamen, W.F.; van Moerkerk, H.Th.B.; Hafmans, T.; Buttafoco, L.; Poot, A.A.; Veerkamp, J.H. & van Kuppevelt, T.H.** 2003. Preparation and Evaluation of Molecularly-Defined Collagen – Elastin – Glycosaminoglycan Scaffold for Tissue Engineering. *Biomaterials* **24**:4001-4009.
- Davis, J.M.** 1994. Basic Cell Culture. A Practical Approach. Ed. Davis, J.M. New York.
- Diaconu, C.C.; Bleotu, C.; Chivu, M.; Alexiu, I.; Petrusca, D.; Antón, G.; Achim, R.; Ruta, S.M. & Cernescu, C.** 2004. The development of larger cells that spontaneously escape senescence - a step during the immortalization of a human cancer cell line. *J. Cell. Mol. Med.* **8(1)**:1-21.
- Dische, Z.** 1947. A New Specific Color Reaction of Hexuronic Acids *J. Biol. Chem.* **167**:189-198.
- Eagle H.** 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**:432- 437.
- ECACC (European Collection of Cell Culture) & Sigma Aldrich.** 2001. Fundamental Techniques in Cell Culture. Ed. Sigma-Aldrich Co. UK.
- Eldad, A.; Burt, A. & Clarke, J.A.** 1987. Cultured Epithelium as a Skin Substitute. *Burns*, **13(3)**:173-180
- Fallabella, R.; Escobar, C. & Giraldo, N.** 1990. Estructura y funciones de la piel. Cap. 1, En: Dermatología - Fundamentos de Medicina. 4^{ta} ed., Edit. CIB. (Corporación para investigaciones biológicas). Medellín, Colombia.
- Farndale, R.W.; Buttle, D.J. & Barrett, A.J.** 1986. Improved Cuantitation and Discrimination of Sulphated Glycosaminoglycans by use of Dimethylmethilene Blue. *Biochim. Biophys. Acta.* **883(2)**:173-177.

- Fawcett, D.W.** 1987. Tratado de Histología. 11ª Ed. Edit. Interamericana- McGraw- Hill; Madrid.
- Fleischmajer, R.;** Perlish, J.S.; Burgeson, R.E.; Shaikh-Bahí, F. & Timpl, R. 1990. Type I and Type III Collagen Interactions During Fibrillogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **580**:161-175.
- Flores, C.;** Fusco, J.C.; Martinez, G.; Olives, A. & Vigilino, E. 1993. Empleo generalizado del polvo de dermis porcina liofilizada como medio hemostático en el alveolo post-extracción. En Monografía Laboratorios Asmopul pag:13-16.
- Frank, D.;** Watchel, T.; Frank, H. & Sanders, P.A.C. 1983. Comparison of Biobrane porcine and human Allografts as Biologic Dressing for Burn Wound. *Journal of Burns Care and Rehabilitation*, **4**:186.
- Freddi, O.;** Kestensen, G.; Soraires, F.; Arredondo, A. & Giustozzi, W. 1993. Uso de Pel Cupron® (dermis porcina liofilizada estéril) como sustituto temporario de piel en pacientes con pérdida de cubierta cutánea total o parcial. En Monografía Laboratorios Asmopul pag: 6-8.
- Gallico, G.G.** 1990. Biologic skin substitutes. *Clin. Plast. Surg.*, **17**:519-526.
- Gang, R.K.;** Arturson, G. & Hakelius, L. 1981. The effect of split skin allografts on wound epithelization from rabbits. *Scand. J. of Pl. and Rec. Surg.*, 15-100.
- Garcia Igarza, H. &** Losardo, R. 1984. Sustituto de piel humana autógena, en: Rev. Arg. de Quemaduras. 2-15.
- Geneser, F.** 2000 a. De Células a Tejido. Cap. 5. En Histología. 3era edición. Ed. Médica Panamericana. Bs. As., Argentina.
- Geneser, F.** 2000 b. Epitelio. Cap. 6. En Histología. 3era edición Ed. Médica Panamericana. Bs. As., Argentina.
- Geneser, F.** 2000 c. Tejido Conectivo. Cap. 8. En Histología. 3era edición Ed. Médica Panamericana. Bs. As., Argentina.
- Geneser, F.** 2000 d. Piel. Cap. 17. En Histología. 3era edición. Ed. Médica Panamericana. Bs. As., Argentina.
- GENEAUPP** 1998, Grupo Nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión. Directrices generales sobre el tratamiento de las úlceras por presión. Doc.III. Arnedillo. España.
- Greco, R.M.;** Iocono, J.A. & Ehrlich, H.P. 1998. Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J. Cell. Physiol.* **177**(3):465-473.
- Harding, K.G.;** Morris, H.L. & Patel, G.K. 2002. Science, medicine, and the future. Healing chronic wounds. *British Med. J.*, **324**:160-163.
- Hatz, R.A;** Niedrier, R; Vanscheidt W. & Westerhof, W. 1994. Wound healing and wound management. 75-87. In: Proteolytic enzymes and wound healing. Ed. Westenhof W, Vanscheidt W, Berlin: Springer-Verlag.
- Imai, S.;** Nabeshima, K. & Makino, K. 1980. Lyophilized porcine dermis. *Jap. J. Burn Injuries*, **6**, 65.

- Junqueira, L.C.;** Carneiro J. y. Kelley, R.O. Editores. 2004. Capítulo 5: "Connective Tissue" en Basic Histology. (publicación electrónica) Access Lange (accesslange.accessmedicine.com). The McGraw-Hill Companies
- Karamanos, N.K.;** Aletras, A.J.; Tsegenidis, T.; Tsiganos, C.P. & Antonopoulos, C.A. 1992. Isolation, characterization and properties of oversulphated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern. *Eur. J. Biochem.* **204**:553-560.
- Karamanos, N.K.;** Syrokou, A.; Vanky, P.; Nurvimen, M. & Hjerpe, A. 1994. Determination of 24 Variously Sulfated Galactosaminoglycan- and Hyaluronan- Derived Disaccharides by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **221**:189-199.
- Kerkvliet, E.H.M;** Jansen, I.C.; Schoenmaker, T.; Beertsen, W. & Everts, V. 2003. Collagen Type I, III and V Differently Modulate Synthesis and Activation of Matrix Metalloproteinases by Culured Rabbit Periosteal Fibroblasts. *Matrix Biollogy*. **22**:217-227
- Kjellén, L. & Lindahl, U.** 1991. Proteoglycans: Structures and Interactions *Ann. Rev. Biochem.* **60**:443-475.
- Kolar, K.** 1990. Colorimetric Determination of Hydroxyproline as Meseasure of Collagen Content in Meat and Meat Products: NKML Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73(1)**:54-57.
- Kolar, K.** 1992. Gravimetric Determination of Moisture and Ash in Meat and Meat Products: NKML Interlaboratory Study. *J. AOAC* **75(6)**:1016-1022.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Laskin, D.L.;** Kimura, T & Sakakibara, S. 1986. Chemotactic activity of collagen like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J Leukoc Biol.*, **39**:255-380.
- Lebwohl, M.;** Longas, M.O.; Konstadt, J.; Koreen, R.; Grabowski, G.A.; Phelps, R.; Lemlych, G. & Schwartz, E. 1995. Hyaluronic Acid and Dermatan Sulfate in non-lesional Pseudoxanthoma Elasticum Skin. *Clinica Chimica Acta.* **238**:101-107.
- Lehninger.** 2000. Principles of Biochemistry Third Edition. Nelson, D.L. & Cox, M.M. Editors.
- Lindberg, K. & Badylak, S.F.** 2001. Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS): a Bioscaffold Supporting in vitro Primary Human Epidermal Cell Differentiation and Synthesis of Basement Membrane Proteins. *Burns*, **27**:254-266.
- Lindsay, C.D.;** Hambrook, J.L.; Brown, R.F.; Platt, J.C.; Knight, R. & Rice, P. 2004. Examination of changes in connective tissue macromolecular components of large white pig skin following application of Lewisite vapour. *J Appl Toxicol.* **24(1)**:37-46.
- Linsenmayer, T.F.** 1991. "Collagen" Cap. I en Cell Biology of Extracellular Matrix. E.D. Hay ed. 2nd. Edition. Plenum Press, NY.

- Loewi, G.** 1961. The Acid Mucopolysaccharides of Human Skin. *Biochim. Biophys. Acta* **52**:435-440.
- López Corral, F. & Fernández Vico, M.** 1993. Heridas. 23-37, En: Actuación de enfermería ante las úlceras y heridas. Ed. López Corral JC, Luzán 5 S.A. Madrid.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L.; & Randal, R.J.** 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Manimalha Balasubramani, T.; Kumar, R. & Babu, M.** 2001. Skin substitutes: a review. *Burns* **27**:534-544.
- McCalmont, T.H.** 2003. Diseases of the Skin. Chapter 8. En Pathophysiology of Disease. Stephen J. McPhee, Vishwanath R. Lingappa ,William F. Ganong, Jack D. Lange (editores). The McGraw-Hill Companies.
- McDevitt, C.A. & Muir, H.** 1971 Gel Electrophoresis of PGs and GAG on large-pore composite polyacrilamide-agarose gel. *Anal. Biochem* **44**:612-622
- McGee, J.O'D.** 1992. Matrix specialization. Cap. 1.4.4. En: "Oxford Textbook of Pathology". Vol. 1. Ed. McGee, J.O'D.; Isaacson, P.G. y Wright, N.A. Oxford University Press, NY.
- Miller, E.J. & Rhodes, R.K.,** 1982. "Collagen" en Methods in Enzymology **82**:33-64
- Moserova, J. & Behounekova-Houskova, E.** 1979. Temporary skin substitutes and evaporative water loss. *Scand. J. of Pl. and Rec. Surg.*, **13**,143.
- Moserova, J. & Behounekova-Houskova, E.** 1984. Sustitutos temporarios de piel, sus limitaciones. *Rev. Arg. de Quem.*, 2-22.
- Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B. & Duodu, K.G.** 2004. Characteriation of Acid Soluble Collagen From Skins of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* **85**:81-89.
- Neale, T.J.; Aja, P.P.; Exner, M.; Poczewski, H.; Ruger, B.; Witztum, J.L.; Davis, P. & Kerjaschki, D.** 1994. Proteinuria in passive Heymann nephritis is associated with lipid peroxidation and formation of adducts on type IV Collagen. *J. Clin. Invest.* **94**:1577-1584.
- Oikarinen, A.** 2004. Connective Tissue and Aging. *International Journal of Cosmetic Science* **26(2)**:107-108.
- Pelham R. J. & Wang Yu-Li,** 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:13661-13665.
- Pepper, W.A.; Alhor, D.R.; Peterson, E.I. & Maguilligan, D.J.Jr.** 1986. Pigskin as a topical hemostat in arterial, liver and splenic injuries. *Surgery*, **99**, 557.
- Phillips, H.J. & Terryberry, J.E.** 1957. Counting Actively Metabolizing Tissue Cultured Cells. *Exp. Cell Res.* **13**:341-347.
- Pieper, J.S.** 1999. Oosterhof, A.; Dijkstra, P.J.; Veerkamp, J.H. & van Kuppevelt, T.H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* **20**:847-858.

- Pontz, B.; Meigel, W., Rauterberg, J. & Kuhn, K.** 1970. Localization of Two Species Specific Antigenic Determinants on the Peptide Chains of Calf Skin Collagen. *Eur. J. Biochem.* **16**:50-54.
- Postlethwaite, A.E.; Seyer, J.M. & Kang, A.H.** 1978. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 871- 875.
- Prathiba, V. & Gupta, P.D.** 2000. Cutaneous Wound Healing: Significance of Proteoglycans in Scar Formation. *Current –Science.* **78(6)**:1-5
- Price, C.G.; Webb, N.B.; Smith, W.J.; Marks, H.M.; Yoffe, A.M.** 1994. Comparison of Mercury and Copper Based Catalysts in the Kjeldahl determination of Nitrogen in Meat and Meat Products: Collaborative Study. *J. AOAC* **77(6)**, 1542-1556.
- Rouslahti, E.; Hayman, E.G.; Pierschbacher, M. & Engvall, E.** 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties, and biological activities. *Methods in Enzymology* **82**, 803-831.
- Rundle, J.S.H.; Cameron, S.H. & Ruckley, C.V.** 1976. New porcine dermis dressing for varicose and traumatic leg ulcers. *Brit. Med. J.*, **24**, 216.
- Sajdera S.W. & Hascall, V.C.** 1969. Proteinpolysaccharide Complex from Bovine Nasal Cartilage. A Comparison of Low and High Shear Extraction Procedures. *J. Biol. Chem.*, **244**: 77-87.
- Sakaguchi, M.; Miyazaki, M.; Inoue, M.; Tsuji, T.; Kouchi, H.; Tanaka, T., Yamada, H. and Namba, M.** 2000. Relationship Between Contact Inhibition and Intracellular S100C of Normal Human Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, **149(6)**:1193–1206
- Salisbury, R.E.; Wilmore, D.W. & Silverstein, P.** 1973. Biological dressing for skin grafts donor sites. *Arch. Surg.*, **106**, 705.
- Schmidtchen, A. & Franisson, I.** 1992. Analysis of Glycosaminoglycan Chains from Different Proteoglycan Populations in Human Embryonic Skin Fibroblasts. *Eur J. Biochem.* **208**:537-546.
- Shreiber, D.I. & Tranquillo, R.T.** 2001. Fibroblasts Traction-Migration Relationships in Collagen Gels. *Bioengineering Conference* **50**:667-668.
- Silver, F.H.; Siperko, L.M. & Sehra, G.P.** 2003. Review: Mechanobiology of Force Transduction in Dermal Tissue. *Skin Research and Technology* **9**:3-23.
- Sonnenschein, C. & Soto, A.M.** 1981. Cell Multiplication in Metazoans: Evidence for Negative Control of Initiation in Rat Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3702-3705.
- Sturla, F.; Zothner, A.; Mazzota, E.; Roman, M. & Perla, L.** 1971. Tratamiento clínico quirúrgico del quemado. Contribución al tema. Congreso Argentino de Cirugía Plástica, Mendoza.
- Supp, D.M.; Bell, S.M.; Morgan, J.R. & Boyce, S.T.** 2000. Genetic Modification of Cultured Skin Substitutes by Transduction of Human Keratinocytes and Fibroblasts with Platelet-derived Growth Factor-A. *Wound Repair and Regeneration* **8(1)**:26-35.

- Takeuchi, R.** 2004. The effect of basic fibroblast growth factor on cell cycle in human gingival fibroblasts from nifedipine responder and non-responder. *Journal of Oral Science* **46(1)**:37-44.
- Tijssen, P.** 1985. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Vol. 15. Editors Burdon, R.H. & van Knippenberg, P.H. Elsevier Oxford.
- Timpl, R.; Rohde, H; Risteli, L; Ott, U; Gehron Robey, P; Martin, G.R.** 1982. Laminin. *Methods in Enzimology* **82**, 831-838.
- Toner, P.G. & McCornick, D.F.W.** 1992. Cell and matrix structure and function. Cap. 1. En: "Oxford Textbook of Pathology". Vol. 1. Ed. McGee, J.O'D.; Isaacson, P.G. y Wright, N.A. Oxford University Press, NY.
- Towbin, H., Staehelin, T & Gordon, J.,** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
- Tuny, G.; Lanza, H.; Rizk, J.C. & Herrera, J.** 1997. Tratamiento de las Heridas Profundas con Piel Porcina Liofilizada Enriquecida con Mucopolisacáridos. *Revista Argentina de Cirugía Plástica.* **3(3)**:183-186.
- UCCh.** 2003. Universidad Católica de Chile. Cátedra de Histología. Escuela de Medicina. <http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb>.
- Volpi, N.** Fractionation of Heparin, Dermatan Sulfate, and Chondroitin Sulfate by Sequential Precipitation: a Method to Purify a Single Glycosaminoglycan Species from a Mixture. *Anal Biochem.* 1994. **218(2)**:382-391.
- Waisman, I.** 2002. Los pediatras argentinos y las lesiones no intencionales en la infancia. Comentario editorial en: *Archivo Argentino de Pediatría*, **100(4)**, 275-277.
- Watt, F.** 1992. Cell differentiation. Cap. 1.2. En: "Oxford Textbook of Pathology". Vol. 1. Ed. McGee, J.O'D.; Isaacson, P.G. y Wright, N.A. Oxford University Press, NY.
- Whiteman, P.** 1973. The quantitative measurement of Alcian blue glycosaminoglycan complexes. *Biochem. J.* **131**, 343-345.
- Wieser, R.J. & Oesch, E.** 1986. Contact Inhibition of Growth of Human Diploid Fibroblasts by Immobilized Plasma Membrane Glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, **103**:361-367.
- Wight, T.N.; Heinegard, D.K. & Hascall, V.C.** 1991. Proteoglycans. Cap. 2:45-78. En *Cell Biology of Extracellular Matrix*. E.D. Hay ed. 2nd. Edition. Plenum Press, NY.
- Willen, M.D.; Sorrel, J.M.; Lekan, C.C.; Davis, B.R. & Caplan, A.I.** 1991. Patterns of Glycosaminoglycan/Proteoglycan Immunostaining in Human Skin During Aging. *J. Investigative Dermatology*, **96**:968-974.

- Wilson, F.J.;** Gibney, J.A.; Kestenbaum, M.G. & Matta, S. (Ed.) 2003. Histology Image Review. Cap 11. Integumentary System. The McGraw-Hill Companies.
- Yamada, K.** 1991. Fibronectin and Other Cell Interactive Glycoproteins. Ch. 4. en: Cell Biology of Extracellular Matrix. 2nd Edition. Ed. Elizabeth D. Hay. Harvard Medical School. Boston, Massachusetts. Plenum Press. New York and London.
- Yanagishita, M. & Hascall, V.C.** 1983. Characterization of low buoyant density dermatan sulfate proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture *JBC* **258**:12847-12864.
- Yannas, I.V.;** Burke, J.F.; Gordon, P.L.; Huang, C. & Rubenstein, R.H. 1980. Design of an Artificial Skin. II. Control of Chemical Composition. *J. Biomed. Mater. Res.* **14**:107-132.
- Yoon, J.H.;** Brooks, R. & Halper, J. 2002. Immunoblotting Assays for Keratan Sulfate. *Analytical Biochemistry* **306**:298-304.
- Yurchenco, P.D.;** Cheng, Y.S. & Schittny, J.C. 1990. Heparin Modulation of Laminin Polymerization. *J. Biol. Chem.* **265**:3981-3991.