

Evaluación de la matriz extracelular (MEC) de la submucosa del intestino delgado (SID) de porcino como biomaterial para el crecimiento de fibroblastos humanos.

Evaluation of the extracellular matrix (ECM) of porcine small intestinal submucosa (SID) as a biomaterial for the growth of human fibroblasts.

D. Gaviria-Arias *, F. Arciniegas-Leal *

RESUMEN

Introducción: la matriz extracelular de la submucosa del intestino delgado (MEC-SID) de porcino ha sido usada con éxito como soporte para regenerar diversos tejidos debido a su composición en colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento.

Materiales y métodos: en este estudio se caracterizó como biomaterial la MEC-SID a nivel funcional, ultraestructural y se evaluó su capacidad de proporcionar un ambiente adecuado para la adhesión, crecimiento y multiplicación de células humanas.

Resultados: se obtuvo un biomaterial completamente descelularizado, con un grosor de $\pm 23\mu\text{m}$ y la presencia de fibras colágenas de $\pm 1,8\mu\text{m}$ para la presentación de 1 capa, una porosidad de $\pm 55,4\%$ y una capacidad de retención de líquidos de 386%. El biomaterial mostró un módulo de elasticidad dependiente de la temperatura y del número de capas con las cuales se fabricaba con un rango entre 27,6MPa y 96,8MPa. Se identificó que el biomaterial presento una estabilidad en condiciones de cultivo superior a las cuatro semanas. El biomaterial presento un valor para el ángulo de contacto de $\pm 30^\circ$, la citotoxicidad del biomaterial fue baja con valores inferiores al 10%. Se evaluó la interacción que las células establecieron con el biomaterial mediante microscopia electrónica de barrido, la cual permitió la identificación de proyecciones de citoplasma al igual que la generación de matriz extracelular propia sobre el andamio de MEC-SID.

Conclusiones: los resultados obtenidos soportan la hipótesis que este biomaterial podría ser empleado como alternativa para la regeneración de tejidos cutáneos afectados por heridas crónicas y agudas.

PALABRAS CLAVE: “Medicina regenerativa”, “Ingeniería de tejidos”, “Matriz extracelular”, “Biomaterial”.

ABSTRACT

Introduction: the porcine small intestinal submucosal extracellular matrix (SI-SEM) has been successfully used as a scaffold for regenerating tissues due to its composition of collagens, proteoglycans, glycosaminoglycans, and growth factors.

Materials and Methods: in this study, the SI-SEM as a biomaterial was characterized at the functional and ultrastructural levels, and its ability to provide a suitable environment for the adhesion, growth, and multiplication of human cells was evaluated.

Results: a completely decellularized biomaterial was obtained, with a thickness of $\pm 23\mu\text{m}$ and the presence

* Unidad de Investigación en Soportes Celulares y Medicina Regenerativa, BIOTRISKEL SAS
Risaralda-Colombia, Calle 14 # 16-71, Pereira-Risaralda, Colombia; biotriskel@biotriskelbiotech.com

of collagen fibers of $\pm 1.8 \mu\text{m}$ for the single-layer presentation, a porosity of $\pm 55.4\%$, and a fluid retention capacity of 386%. The biomaterial showed an elastic modulus that depended on temperature and the number of layers with which it was manufactured, ranging from 27.6 MPa to 96.8 MPa. The biomaterial was found to be stable under culture conditions for over four weeks. The biomaterial exhibited a contact angle of $\pm 30^\circ$, and its cytotoxicity was low, with values below 10%. The interaction of the prepared cells with the biomaterial was evaluated by scanning electron microscopy, which allowed the identification of cytoplasmic projections as well as the generation of extracellular matrix on the SI-SEM scaffold.

Conclusions: the results obtained support the hypothesis that this biomaterial could be used as an alternative for the regeneration of skin tissues affected by chronic and acute wounds.

KEY WORDS: “Regenerative medicine”, “Tissue engineering”, “Extracellular matrix”, “Biomaterial”.

Fecha de recepción: 20 Enero 2025.

Fecha de aceptación: 20 Mayo 2025.

D. Gaviria-Arias, F. Arciniegas-Leal. *Evaluación de la matriz extracelular (MEC) de la submucosa del intestino delgado (SID) de porcino como biomaterial para el crecimiento de fibroblastos humanos*. 2025; 41(E2): 155-164.

INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular (MEC) ejerce efectos mecánicos y bioquímicos en las células activando los receptores de la superficie celular para inducir a nivel intracelular cascadas de señalización y en última instancia, alteraciones en la expresión génica que repercuten en el fenotipo celular⁽¹⁾. Se ha identificado que el “diálogo” entre las células y su MEC circundante dicta el comportamiento celular, este proceso ha sido descrito como “reciprocidad dinámica”⁽²⁾. La MEC es degradada o remodelada como respuesta a los estresores ambientales como la hipoxia, la carga mecánica, pH y temperatura⁽³⁻⁷⁾ o también como respuesta a procesos como el envejecimiento, estado de enfermedad y alteraciones en el macro y microambiente celular⁽⁸⁻¹¹⁾. La ingeniería tisular brinda un enfoque prometedor para reparar los defectos tisulares y regenerar nuevos tejidos y órganos⁽¹²⁾. La medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos requiere la interacción de tres elementos, células, factores de crecimiento y la presencia de un material adecuado que funcione como andamio.

Los andamios ideales mantienen un espacio para el crecimiento del tejido, proporcionan estabilidad mecánica y poseen moléculas que apoyan la adhesión, la proliferación, la diferenciación y la migración de las células dispuestas en ellos tal como lo hace la matriz extracelular nativa. En términos generales, los andamios deben suministrar las condiciones necesarias para que se puedan

reemplazar de manera adecuada y completa los tejidos dañados⁽¹³⁾. Entre los biomateriales utilizados como andamio, homólogo del tejido cutáneo, se encuentra la matriz extracelular de la Submucosa de Intestino Delgado de cerdo (MEC-SID). Este soporte acelular está compuesto por un 90% aproximadamente de colágenos tipo I y III; similar a las estructuras dérmicas⁽¹⁴⁾. En esta matriz se encuentran también, en menor cantidad, otros tipos de colágeno como los colágenos IV, V y VI⁽¹⁵⁾. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de otros tipos de moléculas tales como; ácido hialurónico, fibronectina (FN), heparán sulfato, condroitina sulfato del tipo A y B y heparina⁽¹⁶⁾. También se reporta la presencia de factores de crecimiento como el FGF-2 (factor básico de crecimiento para fibroblastos), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) y el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)⁽¹⁷⁾.

Se ha demostrado la capacidad de este biomaterial de favorecer la regeneración de diferentes tipos de tejidos; por ejemplo, reemplazo de tracto urinario⁽¹⁸⁻²¹⁾, tejido cutáneo^(22, 23), vasos sanguíneos^(24, 25), hueso⁽²⁶⁾, tendones^(27, 28), y ligamentos^(29, 30). La MEC-SID, presenta 2 de los tres elementos necesarios de un buen soporte, un andamio biocompatible y moléculas de señalización. La presencia de moléculas de adhesión favorece la llegada y adhesión de células con lo que se completan sus características como un excelente biomaterial para ser usado en medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos.

En el presente trabajo se caracterizó a nivel ultraestructural y mecánico la MEC-SID, adicionalmente, se demostró que la MEC-SID es capaz de soportar la adhesión, migración y crecimiento de células humanas primarias (fibroblastos neonatales humanos), suministrando a estas un ambiente adecuado, in vitro. Se identificó que las células que crecieron sobre el soporte son capaces de modificar el biomaterial y llevar a cabo la deposición de nueva matriz extracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del biomaterial (matriz extracelular de submucosa de intestino delgado de cerdo).

El yeyuno del intestino delgado de cerdo fue obtenido a partir de animales sanos con un peso >100 kg, en un frigorífico certificado. Inicialmente, el yeyuno fue lavado con el fin de retirar los residuos presentes, posteriormente este fue invertido y la capa de la mucosa fue retirada por medio de una limpieza extensiva empleando un bisturí recubierto con una gasa húmeda. El yeyuno fue invertido otra vez, y tanto la capa serosa como la muscular fue removida llevando a cabo el mismo procedimiento que para la mucosa.

Posteriormente el material fue cortado en fragmentos de 15cm y abierto longitudinalmente. Las muestras del tejido fueron incubadas en 5L de una solución de EDTA 100 mM y NaOH 10 mM (pH 11-12) durante 16 h. Posteriormente las muestras fueron incubadas en 2L de una solución de HCl 1M y NaCl 1M (pH 0-1) durante 8h, finalizado este tiempo el material fue incubado durante 16h en una solución de NaCl 1 M y solución amortiguadora salina fosfato (PBS) (pH 7,4).

Finalmente, las muestras fueron incubadas en PBS durante 2 h, y enjuagadas con agua destilada durante 2 h. Con el fin de completar el proceso de descelularización el material fue incubado durante 2h en 2L de una solución de ácido peracético al 0,1%⁽³¹⁾. Las muestras del biomaterial fueron extendidas en láminas de acrílico y secadas durante 12 horas con el uso de un Liofilizador LABCONCO FreeZone 6L. Posteriormente el biomaterial obtenido fue dispuesto de manera ortogonal capa sobre capa, creando así matrices de 1, 2 y 4 capas.

Las muestras fueron finalmente esterilizadas me-

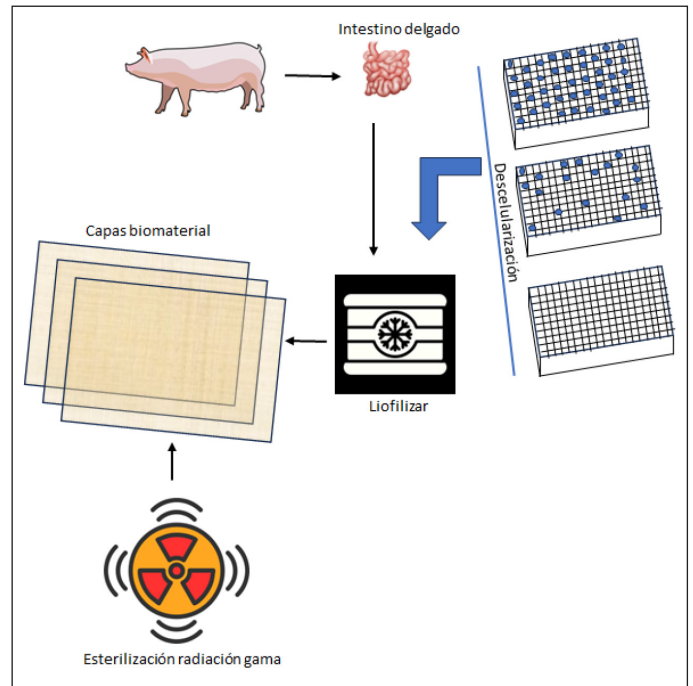


Figura 1. Proceso de producción de biomaterial a partir de yeyuno de cerdo.

dante radiación gamma en las instalaciones del Servicio Geológico colombiano usando una dosis de absorción de radiaciones ionizantes de 25 kGy (Figura 1).

Caracterización del biomaterial MEC-SID

Evaluación histológica

Con el fin de evaluar que el material fue totalmente descelularizado, se determinó la presencia de células viables con el uso de la tinción de Hematoxilina-Eosina (HyE). Para esto, las muestras del biomaterial fueron fijadas previamente con el uso de paraformaldehído al 4%. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de patología SERPAT, Bogotá-Colombia.

Caracterización mecánica, ultraestructural y porosidad

Las características ultraestructurales tanto de la superficie como del interior del biomaterial fueron determinadas en un microscopio electrónico de barrido (JSM- 6490LV, JEOL, Tokio, Japón) ajustado a un voltaje de aceleración de 5 kV a 10 kV, en el Centro de microscopía de la Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia. Para realizar el análisis de los resultados de microscopía electrónica de barrido se empleó el programa de libre acceso para análisis de imágenes ImageJ (<https://imagej>).

nih.gov/ij/), con el cual se determinó el grosor del biomaterial y las características del entre-mallado de las fibras de colágeno en el interior.

La caracterización mecánica de la MEC-SID fue llevada a cabo mediante un microtester Instron 5848 (Canton MA, USA) en el laboratorio de Mecánica de la Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia, empleando piezas rectangulares (12 mm x 6 mm) del biomaterial, utilizando una velocidad de 1 mm/min y una celda de carga de 0,5 kN; todos los ensayos fueron llevados a cabo a una humedad relativa de 50-60%, los ensayos fueron realizados tanto a 22°C como a 37°C. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado para cada uno de los soportes de 1, 2 y 4 capas de MEC-SID, los parámetros de resistencia determinados en este ensayo fueron: esfuerzo máximo, elongación a la rotura, esfuerzo a la rotura y esfuerzo de fluencia. La porosidad y capacidad de absorción de líquidos del biomaterial MEC-SID fue determinada identificando inicialmente el peso seco del biomaterial, posteriormente se sumergió en agua destilada y pasadas 24 h se registró el peso húmedo y se calculó la capacidad de captación de agua (Porcentaje contenido de agua) usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Contenido de agua} = \frac{(Ws - Wd)}{(Wd)} * 100$$

Donde Ws corresponde al peso húmedo del biomaterial luego de la inmersión en agua destilada por 24 h y Wd al peso inicial del mismo.

La porosidad del biomaterial se calculó tomando inicialmente el peso seco del biomaterial y posteriormente sumergiéndolo en 10 mL de hexano (V1) por 5 minutos. El volumen total del hexano y del biomaterial fue registrado como (V2). El biomaterial impregnado se removió y el volumen restante se registró como (V3). Finalmente, la porosidad del biomaterial fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$A\% = \frac{(V1 - V3)}{(V2 - V3)} * 100$$

Estabilidad del biomaterial en condiciones de cultivo

Con el fin de determinar el comportamiento del biomaterial y el mantenimiento de su integridad estructural en condiciones de cultivo, se tomaron 4 caja de cultivo de 35 mm en 3 de las cuales se colocaron las membranas de MEC-SID, la cuarta se dejó sin biomaterial (control-blanco). A cada una de las cajas se les adiciono 2mL de medio

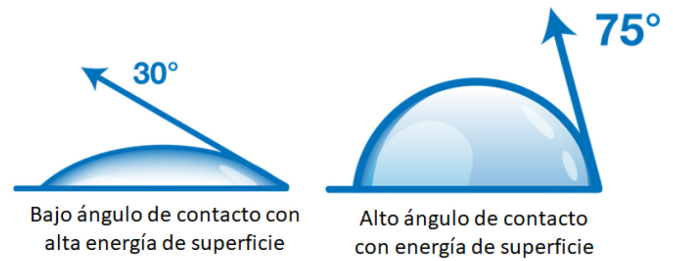


Figura 2. Representación calculo ángulo de contacto.

de cultivo completo: DMEM (Lonza, Basilea, Suiza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (estreptomicina-penicilina 100UI/mL y anfotericina B 2,5µg/mL). Las cajas fueron incubadas a 37°C, 5% de CO2 y 90% de humedad relativa. El ensayo de estabilidad se basó en la liberación de proteínas, péptidos y/o aminoácidos desde el biomaterial los cuales fueron evaluados mediante el uso de espectrofotometría a 280nm con el uso del equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA). La medición fue realizada por triplicado durante 4 semanas, tomado 1 µL de cada una de las cajas (muestras y blanco) los días 0, 7, 14 y 21.

Angulo de contacto

La biocompatibilidad del biomaterial se evaluó inicialmente con la medición del ángulo de contacto. Para esto, se procedió a tomar fotografías con una cámara Nikon D-100 de gotas de agua tanto sobre una superficie totalmente hidrófoba (papel parafilm) como sobre la superficie del biomaterial (MEC-SID (Figura, 2).

Con el fin de mantener el principio de esfericidad en la gota, se utilizaron gotas de 4 µL. La determinación del ángulo de contacto fue llevada a cabo a partir de la evaluación del ángulo de contacto en 10 imágenes con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Evaluación del crecimiento de células epiteliales sobre el biomaterial MEC-SID

Crecimiento y multiplicación de fibroblastos humanos

Para este estudio se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos neonatales HDFn (GIBCO, California, USA), los cuales fueron cultivados en medio 106 (GIBCO, California, USA) suplementado con 1X LSGS (Low Serum Growth Supplement) (GIBCO, California, USA) y antibióticos (estreptomi-

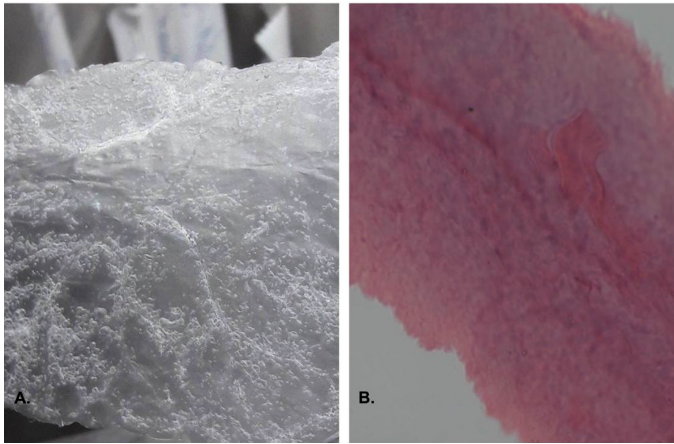


Figura 3. MEC-SID descelularizada. A. Biomaterial liofilizado. B. Evaluación histológica del biomaterial con tinción de HyE, no se evidencian restos celulares ni núcleos.

cina-penicilina 100UI/mL y anfotericina B 2,5µg/mL). Las células fueron sembradas en platos de cultivo T25 e incubadas a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, los cambios de medio fueron llevados a cabo cada 2 días hasta lograr una confluencia de 80%. Las células fueron desprendidas con el uso de 1ml de solución de Tripsina/EDTA (Invitrogen, USA) en una proporción 3:1 (0,25%), durante 5min a 37°C, la reacción enzimática fue detenida añadiendo 2mL de medio completo. El conteo y la determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo con el uso de la coloración supra vital de azul de tripán en una cámara de Neubauer. Finalmente, las células fueron crio preservadas usando medio completo y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich-USA) al 10%, utilizando una densidad celular de 1x10⁶ células en cada crio vial almacenado, la viabilidad para la crio preservación fue siempre superior al 95%.

Crecimiento de fibroblastos en el biomaterial MEC-SID

Piezas de la MEC-SID fueron depositadas en cajas de cultivo de 35 mm, e hidratadas durante 24h utilizando 2 mL de medio completo (DMEM, SFB 20% y estreptomycin-penicilina 100UI/mL y anfotericina B 2,5µg/mL). Finalmente, el medio se retiró y fue reemplazado por 2mL de medio fresco, en el cual fueron sembradas 5x10³ células/cm². El cultivo de las células sobre el biomaterial se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Dado que el biomaterial no era totalmente traslucido, lo que hacía difícil la evaluación del creci-

miento celular de manera directa al microscopio, este fue evaluado mediante histología utilizando la tinción de HyE en los días 5 y 10. Esta evaluación fue llevada a cabo en el laboratorio de patología SERPAT, Bogotá-Colombia. La viabilidad y el número de células se determinaron, en estos mismos días, como se describió anteriormente, desprendiendo las células del soporte con el uso de tripsina y utilizando la coloración supra vital con azul de tripán en cámara de Neubauer. Adicionalmente, se evaluó la interacción que tenían las células con el biomaterial MEC-SID, esta interacción fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) en el Centro de microscopia de la Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia a partir de una muestra.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como las medias ± desviación estándar (DE) para las réplicas utilizadas en cada uno de los ensayos. Los análisis fueron realizados mediante el paquete de ofimática de la compañía Microsoft, Excel versión 2017.

RESULTADOS

Caracterización del biomaterial MEC-SID

Preparación del biomaterial MEC-SID

La tinción histológica (HyE) mostró que el tratamiento de descelularización realizado a la MEC-SID fue adecuado, no se observaron células viables ni núcleos en los soportes después de la tinción (Figura. 3 A y B). La ausencia de células sobre el biomaterial garantiza que no existan células o núcleos que generen una respuesta no deseada o que interfiera con el crecimiento celular de los fibroblastos humanos.

Microscopia electrónica de barrido (MEB) de la MEC-SID

Las microfotografías del biomaterial MEC-SID permitieron la caracterización a nivel ultra-estructural de éste, se identificaron fibras de colágeno las cuales se compactan entre sí y crean todo el entre mallado que compone esta matriz extracelular. Se identificó que, para la presentación de 1 capa, el grosor de la película de MEC-SID se encuentra en un rango entre 17,6 µm a 26,1 µm y el tamaño de las fibras de colágeno oscila entre 0,9 µm a 3,3 µm (Figura. 2).

Porosidad y capacidad de retención de líquidos
La evaluación de estos parámetros permitió identificar que la MEC-SID presenta una porosidad de 55,4%, la cual le da una capacidad de captación y retención de líquidos de un 386,06% en relación con su peso. Estas características se asocian directamente con la observación a nivel ultra-estructural y el entre-mallado de fibras colágenas y los espacios existentes entre estas fibras (Figura. 2).

Análisis mecánico del biomaterial MEC-SID
Los andamios que van a ser utilizados como apósitos, deben poseer cualidades mecánicas como: cantidad de esfuerzo que el biomaterial puede soportar antes de romperse, conocido como esfuerzo máximo, del mismo modo es necesario saber el momento preciso donde éste inicia a deformarse debido a la rotura, expresado como elongación a la ruptura; entre otras (Tabla 1). El conocimiento de estas características permitirá realizar los ajustes necesarios dependientes del tipo de tejido u órganos sobre el cual este tipo de biomaterial pretende ser usado.

La relación entre el estado de esfuerzos inducido en películas de MEC-SID por la aplicación de una fuerza, y su deformación, permitió determinar el módulo de elasticidad el cual se calculó como la pendiente de la región lineal de las curvas obtenidas. Los resultados promedio fueron de 78,1 MPa a para MEC-SID 1 capa a 22°C y de 33,9 MPa para el mismo a 37°C, para MEC-SID 2 capas de 27,6 MPa a 22°C y a 37°C 41,7 MPa y para MEC-SID de 4 capas los resultados calculados fueron de 96,8 MPa a 22°C y a 37°C de 88,4 MPa.

Degradación del biomaterial MEC-SID en condiciones de cultivo

La estabilidad de los biomateriales usados en in-

geniería de tejidos debe correlacionarse con el tipo de tejido en el cual este se implanta y su comportamiento debe semejar la tasa de recambio del tejido natural. Se determinó que el biomaterial en condiciones de cultivo comienza un proceso de degradación continua desde la primera semana, posteriormente se identificó mayor incremento de liberación proteica a las semanas 2 y 3, la cual comienza a disminuir en la 4ta semana.

Angulo de contacto

La hidrofiliidad de un biomaterial es una característica de suma importancia, y está directamente relacionada con su cito-compatibilidad. Esta característica puede ser medida de acuerdo con el ángulo de contacto que poseen ciertos fluidos sobre las superficies de distintos soportes empleados. En el ensayo realizado para conocer el respectivo ángulo de contacto de la MEC-SID, se logró evidenciar como este biomaterial posee un ángulo de contacto bajo, ya que se encuentra entre el rango de 25,4° a 41,3° correlacionado con una buena histocompatibilidad⁽³²⁾.

Crecimiento de fibroblastos humanos sobre el bio-soporte MEC-SID.

La evaluación del crecimiento de los fibroblastos humanos neonatales sobre el biomaterial se determinó histológicamente (Figura 3). El crecimiento, multiplicación y efecto citotóxico de la MEC-SID, se llevó a cabo mediante la tinción supra vital, azul de tripán. Este demostró que en efecto la MEC-SID no es citotóxica. Para esto se evaluó el crecimiento teniendo 3 puntos de corte, respecto al tiempo, a los días 5,10 y 15. En donde se evidencia que al día 5 de crecimiento, las células alcanzan el punto máximo de proliferación y la viabilidad celular se encuentran por encima del

Propiedades Mecánicas MEC-SID 1 Capa						
T°	Factor de Ruptura, Fr [kN/m]	Esfuerzo Máximo, σmáx [MPa]	Esfuerzo a la ruptura, σrup [MPa]	Elongación a ruptura, Lrup [%]	Esfuerzo de fluencia, σys [MPa]	Elongación en fluencia, Lys [%]
25°C	190,131	29,736	20,08	63,159	29,736	43,179
37°C	70,064	10,658	4,041	80,627	10,658	58,835
Propiedades Mecánicas MEC-SID 2 Capa						
25°C	99,303	15,63	14,578	72,502	15,63	69,501
37°C	92,341	13,976	10,417	75,81	13,976	59,251
Propiedades Mecánicas MEC-SID 4 Capa						
25°C	161,456	24,607	23,047	92,45	24,607	90,001
37°C	116,686	18,082	17,331	55,752	18,082	54,211

Tabla 1. Análisis mecánico del biosoporte MEC-SID, en 1, 2 y 4 capas de grosor.

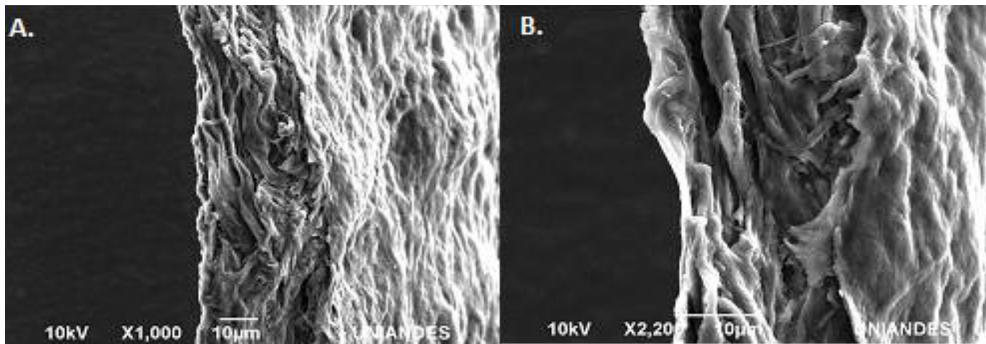


Figura 4. Fotografías de microscopía electrónica de barrido del biomaterial MEC-SID. Fotografía tomada a 1000X, superficie y sector lateral del soporte de MEC-SID.

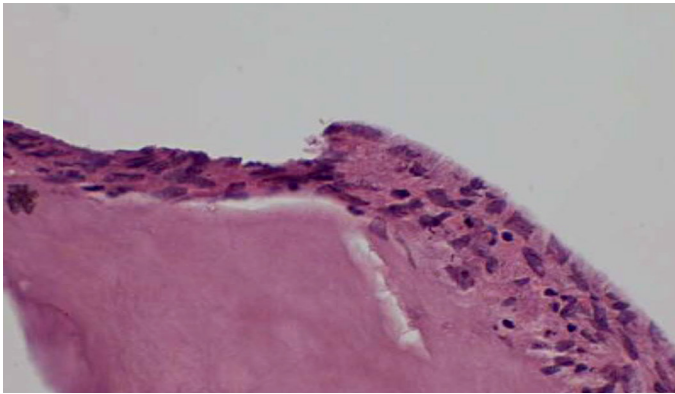


Figura 5. Evaluación histológica por medio de tinción HyE. Observación de núcleos celulares viables sobre el andamio de MEC-SID a 40X.

90%. Asimismo, en los días 10 y 15 se observa una cantidad similar de células luego de realizar el respectivo conteo, la viabilidad permaneció siempre en todos los puntos por encima del 90%.

Interacción de las células con el biomaterial

Las microfotografías tomadas al crecimiento celular sobre el biomaterial, permite observar de manera más cercana la interacción entre los fibroblastos y la MEC-SID. Se evidencia como los fibroblastos mediante la proyección de filopodios interaccionan estrechamente con el biomaterial, adicionalmente se observa como las células establecen su matriz extracelular sobre el biomaterial (Figura 5).

DISCUSIÓN

Comparado con materiales sintéticos, los biomateriales derivados naturalmente han sido ampliamente utilizados para construir andamios porosos, amplia-

mente aplicados a la ingeniería de tejidos. Existen una gran variedad de materiales basados en matrices extracelulares que están disponibles para ser empleados en ingeniería de tejidos^(33, 34).

Estos biomateriales poseen efectos biológicos positivos en la remodelación de distintos tejidos, creando un microambiente óptimo para el desarrollo tisular y acele-

rando la diferenciación celular por medio de la liberación de factores de crecimiento presentes en el andamio⁽³¹⁾. Las moléculas que posee el biomaterial como las glicoproteínas y las citoquinas son las encargadas de promover el crecimiento celular. Por ejemplo, los proteoglicanos se unen a receptores específicos celulares y crean puentes con la matriz extracelular uniéndose al colágeno presente en este, lo que facilita la adherencia y la migración de las células epiteliales, demostrado por Voytik-Harbin⁽¹⁷⁾ y Hodde⁽²⁴⁾.

Además, las características ultraestructurales identificadas como la microporosidad de la MEC-SID favorece la infiltración celular y la angiogénesis⁽³⁵⁾, por lo tanto, este biomaterial funciona como un sistema de liberación controlada de moléculas que favorecen la adhesión, crecimiento y diferenciación de células. Los resultados obtenidos demuestran que el biomaterial establece una relación positiva con las células dada su hidrofili- cidad, lo que permite predecir su excelente comportamiento con células.

Su alto grado de porosidad permitirá que se lleve a cabo un intercambio favorable de nutrientes y desechos del metabolismo celular, su capacidad de retención de líquidos asegurará la disponibilidad de medio de cultivo a las células que sobre este crecen. Esta última característica también posee un gran valor en el caso del desarrollo de apósitos para el manejo de heridas con gran cantidad de exudado, garantizando que el biomaterial podrá controlar éste sin inconvenientes y brindará el andamio necesario para la colonización y crecimiento de células desde el lecho de la herida. Los datos obtenidos en la caracterización mecánica para los andamios de 1, 2 y 4 capas, demuestran que las características como la resistencia mecánica

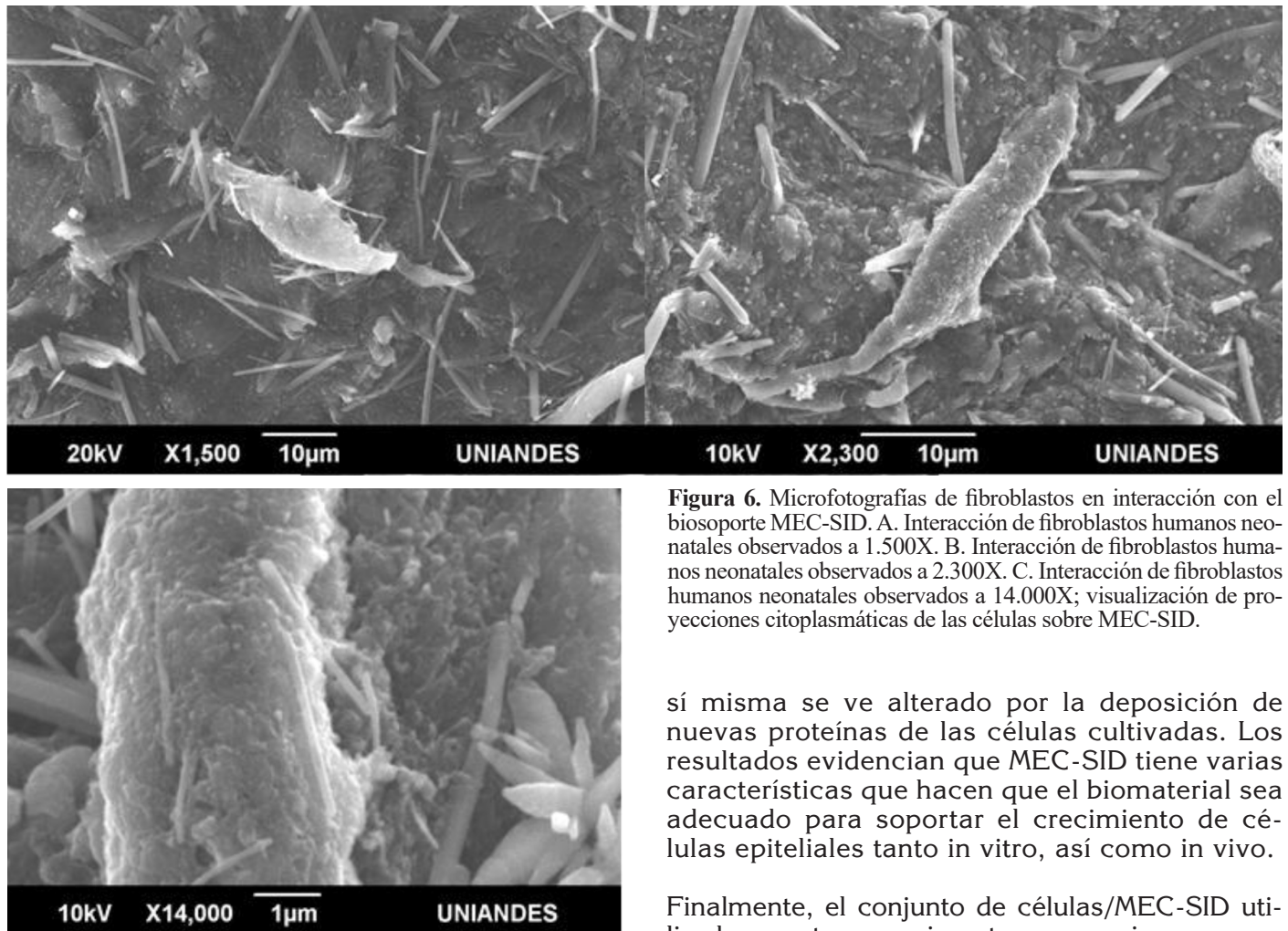


Figura 6. Microfotografías de fibroblastos en interacción con el biosoporte MEC-SID. A. Interacción de fibroblastos humanos neonatales observados a 1.500X. B. Interacción de fibroblastos humanos neonatales observados a 2.300X. C. Interacción de fibroblastos humanos neonatales observados a 14.000X; visualización de proyecciones citoplasmáticas de las células sobre MEC-SID.

y elasticidad del biomaterial puede ajustadas con el fin de orientar su biotensegridad hacia procesos de remodelación de distintos tipos de tejidos.

Las células epiteliales cultivadas en MEC-SID presentaron una buena morfología y un crecimiento adecuado sobre la superficie de este biomaterial, como se pudo observar por medio de la tinción histológica y los resultados de conteo y viabilidad celular, confirmando la biocompatibilidad de este y su baja citotoxicidad. Además, tanto la tinción histológica como la MEB confirmaron que las células fueron capaces de adherirse, crecer y extender su propia matriz extracelular sobre la superficie del andamio. Los resultados obtenidos evidencian la capacidad que posee la MEC-SID como un biomaterial que puede ser empleado como soporte adecuado para la adhesión, migración y crecimiento in vitro de fibroblastos humanos y que la matriz en

sí misma se ve alterado por la deposición de nuevas proteínas de las células cultivadas. Los resultados evidencian que MEC-SID tiene varias características que hacen que el biomaterial sea adecuado para soportar el crecimiento de células epiteliales tanto in vitro, así como in vivo.

Finalmente, el conjunto de células/MEC-SID utilizado en estos experimentos proporciona un modelo prometedor para estudios que podrían contribuir a la comprensión de los mecanismos que regulan la adhesión, migración y proliferación de células epiteliales humanas y para estudiar la interacción entre componentes de la MEC y células epiteliales. Estos resultados al igual que las características de porosidad y resistencia mecánica, orientan la modificación de esta es una propiedad que también puede ser modificada tendiente a ajustar la necesidad del tejido en el cual este biomaterial vaya a ser usado.

El biomaterial recrea entornos favorables para el crecimiento de células epiteliales y de tejido conectivo; es por lo que el conjunto de fibroblastos y MEC-SID podrían promover una regeneración rápida de tejidos dérmicos, permitiendo así el uso de este biomaterial en conjunto con células como un apósito alternativo para la regeneración de tejidos cutáneos en el caso de heridas y quemaduras

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio demuestran que la MEC-SID acelular puede ser usada como un andamio biológico xenogénico para la reparación de defectos en los tejidos, dados los resultados de citotoxicidad e histología. La caracterización mecánica del biomaterial establece las bases para procesos de mejora tanto de su resistencia, biodegradabilidad y características de liberación de moléculas para sus posibles y diferentes aplicaciones. La interacción que las células establecieron con el biomaterial permite concluir que, en un proceso de terapia celular, con el uso de apósitos celularizados, el apósito permitirá la multiplicación de las células sobre este antes de perder sus características estructurales de andamio.

AGRADECIMIENTOS

A la compañía CROMASOFT LTDA por la financiación del proyecto en convenio con el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias a través de la Convocatoria para obtener deducciones tributarias por inversiones en I+D+i 747.

FUNDING

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Xu R, Boudreau A, Bissell MJ. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Cancer Metastasis Rev* 2009 Jun; 28(1-2):167-76.
2. Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982 Nov 7; 99(1):31-68.
3. Almalki SG, Agrawal DK.. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2016; 7(1): 129.
4. Dziki JL, Giglio RM, Sicari BM, Wang DS, Gandhi RM, Londono R, Dearth CL, Badylak SF. The Effect of Mechanical Loading Upon Extracellular Matrix Bioscaffold-Mediated Skeletal Muscle Remodeling. *Tissue Eng Part A* 2018 Jan; 24(1-2):34-46.
5. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2013 Apr 12;288(15):10819-29.
6. Kufaishi H, Alarab M, Drutz H, Lye S, Shynlova O. Static Mechanical Loading Influences the Expression of Extracellular Matrix and Cell Adhesion Proteins in Vaginal Cells Derived From Premenopausal Women With Severe Pelvic Organ Prolapse. *Reprod Sci* 2016 Aug; 23(8):978-92.
7. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 Dec 1; 3(12):a005058.
8. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009 Feb; 9(2):108-22.
9. Linskens MH, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD, Villeponteau B. Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* 1995 Aug 25; 23(16):3244-51.
10. Sicari BM, Johnson SA, Siu BF, Crapo PM, Daly KA, Jiang H, Medberry CJ, Tottey S, Turner NJ, Badylak SF. The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold. *Biomaterials* 2012 Aug; 33(22):5524-33.
11. Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials* 2011 Jan; 32(1):128-36.
12. Gong S, Wang H, Sun Q, Xue ST, Wang JY. Mechanical properties and in vitro biocompatibility of porous zein scaffolds. *Biomaterials* 2006 Jul; 27(20):3793-9.
13. Lee Y, Kwon J, Khang G, Lee D. Reduction of inflammatory responses and enhancement of extracellular matrix formation by vanillin-incorporated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2012 Oct; 18(19-20):1967-78.
14. Ge L, Zheng S, Wei H. Comparison of histological structure and biocompatibility between human acellular dermal matrix (ADM) and porcine ADM. *Burns* 2009 Feb; 35(1):46-50.
15. Lindberg K, Badylak SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns* 2001 May; 27(3):254-66.
16. McPherson TB, Badylak SF. Characterization of Fibronectin Derived from Porcine Small Intestinal Submucosa. *Tissue Eng* 1998; 4(1): 75- 83.
17. Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem* 1997 Dec 15; 67(4):478-91.
18. Hauser S, Bastian PJ, Fechner G, Müller SC. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in a consecutive series. *Urology* 2006 Aug ;68(2):263-6.
19. Knapp PM, Lingeman JE, Siegel YI, Badylak SF, Demeter RJ. Biocompatibility of small-intestinal submucosa in urinary tract as augmentation cystoplasty graft and injectable suspension. *J Endourol* 1994 Apr; 8(2):125-30.
20. Liatsikos EN, Dinlenc CZ, Kapoor R, Bernardo NO, Pikhosov D, Anderson AE, Smith AD. Ureteral reconstruction: small intestine submucosa for the management of strictures and defects of the upper third of the ureter. *J Urol* 2001 May; 165(5):1719-23.
21. Smith TG 3rd, Gettman M, Lindberg G, Napper C, Pear-

- le MS, Cadeddu JA. Ureteral replacement using porcine small intestine submucosa in a porcine model. *Urology* 2002 Nov; 60(5):931-4.
22. MacLeod TM, Sarathchandra P, Williams G, Sanders R, Green CJ. Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction. *Burns* 2004 Aug; 30(5):431-7.
23. Ueno T, Pickett LC, de la Fuente SG, Lawson DC, Pappas TN. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects. *J Gastrointest Surg* 2004 Jan; 8(1):109-12.
24. Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium* 2001; 8(1):11-24.
25. Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol* 1996 Aug; 156(2 Pt 2):571-7.
26. Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terri LA, Badylak SF. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg* 1999 Sep-Oct; 12(5):277-87.
27. Gastel JA, Muirhead WR, Lirak JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Labrador DP. Meniscal tissue regeneration using a collagenous biomaterial derived from porcine small intestine submucosa. *Arthroscopy* 2001 Feb; 17(2):151-9.
28. Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Motta T, Turner AS. The effects of augmentation with Swine small intestine submucosa on tendon healing under tension: histologic and mechanical evaluations in sheep. *Am J Sports Med* 2006 Feb; 34(2):275-80.
29. Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M. Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices* 2009 Jan; 6(1):61-73.
30. Mothersill C, C. B. Seymour, A. O'Brien. 1991. Long-Term Effects of Porcine Small Intestine Submucosa on the Healing of Medial Collateral Ligament: A Functional Tissue Engineering Study». *Anticancer Research* 1991; 11(4): 1609-12.
31. Rong JJ, Sang HF, Qian AM, Meng QY, Zhao TJ, Li XQ. Biocompatibility of porcine small intestinal submucosa and rat endothelial progenitor cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 Feb 1; 8(2):1282-91.
32. Menzies KL, Jones L. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom Vis Sci* 2010 Jun; 87(6):387-99.
33. Chang CW, Petrie T, Clark A, Lin X, Sondergaard CS, Griffiths LG. Mesenchymal Stem Cell Seeding of Porcine Small Intestinal Submucosal Extracellular Matrix for Cardiovascular Applications. *PLoS One* 2016 Apr 12; 11(4):e0153412.
34. Hussey GS, Keane TJ, Badylak SF. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017 Sep; 14(9):540-552.
35. Badylak S, Liang A, Record R, Tullius R, Hodde J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials* 1999 Dec; 20(23-24):2257-63.

AUTOR DE CORRESPONDENCIA

Fernando, Arciniegas-Leal Fernando
Unidad de Investigación en Soportes Celulares y Medicina Regenerativa, BIOTRISKEL SAS Risaralda-Colombia, Calle 14 # 16-71, Pereira-Risaralda, Colombia; biotriskel@biotriskelbiotech.com