



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL DAÑO EN UN MODELO TRIDIMENSIONAL  
DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GÓMEZ ROSAS ANA LAURA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANNIE PARDO CEMO**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presenta

Me permito informarle a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2015, aprobó el Jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GÓMEZ ROSAS ANA LAURA** con número de cuenta **305275282**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL DANO EN UN MODELO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS HUMANOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**:

Presidente:	DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
Vocal:	DR. DAVID GARCADIEGO CÁZARES
Secretario:	DR. ANDRÉS F. J. CASTELL RODRÍGUEZ
Suplente:	DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ALVAREZ
Suplente:	DRA. ANNIE PARDO CEMO

Sin otro particular, me es gusto enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de febrero de 2017

DRA. MARÍA DEL CORDO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por la beca para realizar estudios de posgrado con número de registro 294506, clave 545226.

Al Dr. Edgar Kröttsch Gómez por su dirección y asesoría.

A los miembros del comité Tutor: Dra. Annie Pardo Cemo y al Dr. Andrés Castell Rodríguez.

## **Agradecimientos a título personal**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres ya que sin su cuidado y apoyo no hubiera logrado este proyecto. Gracias mamá y papá por impulsarme a ser una mejor persona no solo profesionalmente sino también en lo personal. Este logro también es de ustedes los quiero y admiro mucho.

A mis hermanas Viridiana y Alicia que siempre están presentes en mi vida para hacerla mejor y más divertida, y aunque son menores que yo, me han dado las mejores lecciones de vida, las quiero mucho y pueden contar conmigo siempre.

Al doctor Edgar por permitirme ser parte de su laboratorio, por sus consejos, paciencia y guía.

A los revisores y jurado de este trabajo: Dr. David Garcíadiego, Dr. José Cisneros Lira y Dr. Jorge Antonio García, gracias por sus comentarios.

A mis amigos del laboratorio de tejido conjuntivo Marío, Francisco, Alejandro, Gerardo, Ernesto y Rosi, pero en especial a René por todo su apoyo, ya sea técnico o académico, pero sobre todo por ser mi amigo y estar ahí siempre, apoyándome en mis peores momentos y compartiendo los buenos, por incitarme a nunca rendirme, ni a darme por vencida, y a siempre luchar por lo que quiero. A mis amigas Dulce, Ariana y Anel por los momentos de diversión. A alex por ser un gran amigo y levantarme el ánimo con sus bromas y ocurrencias.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de tejido conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo la asesoría y dirección del Dr. Edgar Kröttsch Gómez

# Índice

Índice de figuras .....	I
Resumen .....	1
Abstract .....	2
INTRODUCCIÓN. ....	3
Hemostasia. ....	3
Fibrinólisis .....	5
Estimulación por medio de los péptidos de degradación de la fibrina .....	5
Fase de proliferación y migración.....	7
Fase de reparación o remodelación .....	9
ANTECEDENTES .....	10
Modelos de cicatrización en 3D.....	10
OBJETIVOS .....	12
METODOLOGÍA.....	13
Establecimiento del modelo de daño incisional .....	13
Cultivo celular .....	13
Cultivo y propagación de Fibroblastos .....	13
Diálisis, filtración y cuantificación de la colágena. ....	13
Establecimiento de cultivos tridimensionales de libre flotación .....	14
Preparación de la muestra para su análisis morfológico. ....	15
Tinción Hematoxilina-Eosina .....	16
Tinción Tricrómica de Massón.....	16
Ensayo por inmunohistoquímica para evidenciar la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).....	17
Análisis de la morfología del citoesqueleto.....	17
Evaluación de la actividad metabólica mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).....	18
Obtención, concentración y cuantificación de proteínas en los sobrenadantes de cultivo. ....	19
Evaluación de actividad gelatinolítica.....	19
Densitometría de geles.....	20
Ensayo de síntesis de colágena.....	21
RESULTADOS .....	22
La reparación del daño incisional de un cultivo tridimensional de fibroblastos requiere de una matriz provisional que conecte los bordes seccionados.....	22
Los cultivos tratados con fibrina presentaron una menor proliferación que los controles.....	30

Los cultivos tratados con fibrina en la zona del daño aumentan la síntesis de colágena.....	31
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .....	32
LITERATURA CITADA.....	37
ANEXO.....	42
En el presente anexo se presenta la preparación de las soluciones para evidenciar la actividad de las gelatinasas MMP-2 Y 9.....	42

## Índice de figuras

Figura 1. Establecimiento del modelo. ....	15
Figura 2. Modelo de cicatrización.....	24
Figura 3. Contracción de los cultivos tridimensionales de fibroblastos.....	25
Figura 4. Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos teñidos con hematoxilina y eosina.....	26
Figura 5. Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos teñidos con la técnica Tricromica de Massón.....	27
Figura 6. Identificación de fibroblastos en la matriz de fibrina.....	28
Figura 7. Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos procesados por inmunohistoquímica para evidenciar a la actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).....	29
Figura 8. Gráfica que muestra la actividad de la succinato deshidrogenasa en cultivos tridimensionales de fibroblastos.. ....	30
Figura 9. Cinética de la síntesis de colágena en cultivos tridimensionales de fibroblastos. ....	31
Figura 10. Fotografía de un zimograma representativo de gelatina mostrando la actividad de MMP-2.....	32

## Resumen

El proceso de cicatrización es un sistema muy complejo de interacciones celulares y moleculares. Una alternativa para estudiar *in vitro* una fase específica de la cicatrización, es el uso de matrices tridimensionales de fibroblastos y colágena, en las que se puede simular de una manera muy básica un tejido parecido a la dermis. Además, representa un modelo básico para estudiar las características funcionales y biomecánicas de los fibroblastos.

El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo *in vitro* de reparación de una lesión incisional de espesor parcial. Esto nos permitirá determinar la contribución de los fibroblastos para cerrar el daño, así como analizar el arreglo de la matriz en el sitio de la lesión.

Se estableció el modelo de reparación de una lesión en matrices de libre flotación, para lo cual se mezclaron  $1 \times 10^5$  fibroblastos BJ1 con colágena tipo I (2mg/ml) y se mantuvieron en incubación por 5 días. Al cumplirse el día 5 se realizó una lesión incisional de espesor parcial con unas tijeras modificadas, para simular una matriz provisional se agregó fibrina en el sitio de la lesión y en una de las matrices sólo se realizó el corte para usarla como control. Se evaluaron los cambios al día 1, 5 y 10 post-lesión mediante técnicas histológicas para observar la morfología celular en la zona del daño; además las matrices fueron fotografiadas y se determinó el nivel de contracción. Se determinó el nivel de proliferación en las matrices con la técnica de viabilidad celular de MTT. Por otra parte, el medio en donde crecieron las células se usó para identificar la actividad de las metaloproteasas en la matriz extracelular mediante zimografía para la MMP-2 y MMP-9, así como analizar el contenido de colágena.

En los resultados obtenidos se observa que las matrices control y con fibrina presentan una contracción similar, los fibroblastos en ambas matrices se encuentran proliferando, se logró identificar a la MMP-2 en su forma activa e inactiva y la MMP-9 en su forma inactiva en matrices control y con fibrina. En cuanto a la estructura observamos que la fibrina proporciona adhesión a la zona de daño, que esta fibrina es degradada y observamos células en esta matriz provisional.

## Abstract

The healing process is a complex interaction of cellular and molecular system. *In vivo* studies show extremely valuable information for understanding the process. However, these results showed multiple cellular and molecular functions that exist and, therefore, make it difficult to recognize the specific roles of the cells and molecules during the process. Three-dimensional models *in vitro* offer an alternative for the dissection of complex processes such as tissue repair. Three dimensional matrices of fibroblasts and collagen represent a basic model to study the functional properties (morphology, synthesis of proteins, enzyme expression) and the biomechanics of fibroblasts (contraction). In this model, fibroblasts contact with a three-dimensional type I collagen matrix, allowing them to survive and maintain their fundamental physiological functions in a very basic level, similar to the dermis tissue. Performing an incisional "wound" in this basic three-dimensional matrix we can elucidate the different molecular components that have been described during repair.

To set out *in vitro* model repair as a three-dimensional culture of human type I collagen and fibroblasts, we made a superficial incision into the cell-matrix gel with a modified scissors. To simulate a provisional reparation matrix was added fibrin at the injury site and the incisions without fibrin was used as control. The morphological changes were evaluated at cellular and matrix level, also the synthesis and degradation of extracellular matrix in the site of damage was evaluated at 1, 5 and 10 day post injury.

Results observed that matrices contract more than control fibrin matrices that fibroblasts in both arrays are proliferating, and expressing MMP-2 in its active and inactive form and MMP-9 in its inactive form. As for the fibrin structure observes that provides adhesion to the area of damage, this is degraded fibrin and cells observed at this provisional matrix.

## **INTRODUCCIÓN.**

La cicatrización es un proceso biológico en cascada que se activa en respuesta a un daño, para su entendimiento y estudio se ha dividido en tres fases cuyo resultado final es la reparación del tejido dañado. La secuencia de eventos en un proceso de cicatrización consiste de 4 etapas, 1) cubrir provisionalmente el defecto, 2) evitar y destruir cualquier patógeno potencial que haya entrado al sitio de daño, 3) restablecer y restaurar los componentes destruidos en la zona de daño, 4) remover estructuras provisionales que sirvieron de apoyo en las fases anteriores. Estos procesos son continuos y están interconectados de tal manera que podrían traslaparse y regular los procesos siguientes, tanto positiva como negativa. Otro aspecto a señalar es el tiempo que dura cada fase, que dependerá del tamaño del defecto, del tipo de herida y del estado fisiológico de la persona (Sonnemann KJ y Bement WM 2011). Cuando ocurre una lesión en la piel el primer acontecimiento que se lleva a cabo es la hemostasia y formación del coágulo de fibrina, la cual brindará una matriz de transición para una gran variedad de tipos celulares. Así, la fibrina y las demás proteínas de la matriz extracelular juegan un papel muy importante en cada estado del proceso de cicatrización, pues le confieren un aspecto biomecánico al crear un “andamio” (una matriz temporal) que genera señales biomecánicas que modulan el metabolismo celular; además de que los componentes de matriz sirven como reservorio de citocinas, enzimas e inhibidores que regulan la actividad durante la reparación (Olczyk P Mencner L, Komosinska-Vassev K 2014).

### **Hemostasia.**

La hemostasia es la combinación de un fenómeno físico y uno biológico que evita la pérdida de sangre y limita la llegada de patógenos al sitio de la herida. Para que ello ocurra debe presentarse la combinación de dos procesos, la formación de una matriz que retenga a los elementos de la sangre y el estrechamiento de los vasos sanguíneos seccionados que limite la fuga de sangre. Así que la primera matriz de la zona de la herida será la fibrina que es la forma polimerizada de su precursor, el fibrinógeno. Si bien el plasma contiene, además de fibrinógeno, otras formas solubles de matriz, como la fibronectina y la

vitronectina, solamente se integrarán en una malla estrecha cuando la fibrina se haya depositado.

### **El fibrinógeno como precursor de la fibrina**

La molécula de fibrinógeno es una glicoproteína hexamérica compuesta por dos complejos de tres diferentes cadenas peptídicas, dos cadenas  $\alpha$ , dos cadenas  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$ , las cuales están unidas por enlaces disulfuro. Genéticamente, cada monómero de fibrinógeno está codificado por genes separados, pero todos ellos juntos en un grupo que se encuentra localizado en el cromosoma 4q22-23 y que comprende aproximadamente 50 Kb. La proteína tiene una longitud de 46 nm y la estructura consiste de dos dominios-D unidos a un dominio central E por un segmento enrollado. Tanto el dominio E como el D presentan sitios de unión para polimerizar fibrina, regiones para formar entrecruzamientos que estabilizan al polímero de fibrina, regiones de interacción con plaquetas y sitios de unión a trombina. También en el dominio E se encuentra el sitio activo para la trombina. El ensamble de fibrina, la activación del factor (F) XIII o de la coagulación, la modulación de fibrinólisis y la adhesión celular a través de las regiones de unión a fibronectina (RGD), se modulan desde la región carboxilo terminal de la cadena  $A\alpha$ . Por su parte, en la región amino terminal de las cadenas  $A\alpha$ - $B\beta$  la trombina corta a los fibrinopéptidos A y B durante el último paso en la cascada de coagulación. Así, el fibrinógeno soluble es convertido en monómeros de fibrina que después forman polímeros insolubles de la proteína hasta convertirse en una red o malla de fibras. Esta red se encuentra estabilizada por el FXIII el cual fue activado por la trombina durante el proceso de polimerización de fibrina. Finalmente, el entrecruzamiento ocurre entre dos monómeros  $\gamma$  o entre un  $\gamma$  y uno  $\alpha$ , es lo que le brinda estabilidad al coágulo, que a su vez forma una barrera protectora que previene la degradación de la fibrina por la plasmina (Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM 2006).

En su forma polimerizada la fibrina funciona como una molécula que puede anclar a varios tipos de células y promover su proliferación. Se ha reportado que las matrices de fibrina tienen la capacidad de unir células endoteliales, células de músculo liso, queratinocitos, fibroblastos y leucocitos. Estas células se pueden unir directamente a la fibrina mediante receptores de superficie

integrinas y no integrinas como VE-Cadherina, Molécula de adhesión intercelular-1 (I-CAM-1), P-selectina y Glicoproteína Ib de plaquetas (GPIIb). Las integrinas que unen fibrina para los leucocitos son  $\alpha_M\beta_2$ , en plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , para células endoteliales  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y para fibroblastos  $\alpha_5\beta_1$ .

### **Fibrinólisis**

Una vez que la fibrina fue ensamblada y estabilizada en una red o malla, esta matriz es degradada por varias enzimas específicas, entre la más importante se encuentra: la plasmina. La cual se genera a través de la degradación proteolítica del plasminógeno, por la activación de los activadores del plasminógeno (PAs). Existen varias evidencias que sugieren que la plasmina juega un papel importante en la activación de factores de crecimiento latentes, tales como TGF- $\beta$  y algunas MMPs en particular a la colagenasa intersticial 1 (MMP-1) (Collen D, Lijnen HR 2006).

Esta reportado que la fibrinólisis juega un papel importante durante el proceso de cicatrización y en eventos fibróticos. En un trabajo se probó que al reducir la fibrinólisis (persistencia de fibrina) se generó el aumento y la acumulación de colágena, y como resultado se obtuvo un evento fibrótico (Giorgio-Miller A. et al 2005).

### **Estimulación por medio de los péptidos de degradación de la fibrina**

Una vez que se lleva a cabo la formación de la matriz provisional de fibrina, así como su degradación, se tiene el conocimiento que existen pequeñas moléculas que permanecen atrapadas durante la formación del coagulo y que tienen importantes efectos biológicos; por ejemplo, se ha reportado que la trombina tiene efecto mitogénico para los fibroblastos. Gray et al. demostró que los productos de formación del coagulo pueden estimular la proliferación de fibroblastos; puntualmente que los fibrinopéptidos A y B tienen actividad mitogénica para los fibroblastos, así como el fibrinopéptido B tiene actividad quimio-atrayente para neutrófilos y fibroblastos a concentraciones de  $10^{-11}$  y  $10^{-6}$  M, y se sugiere una asociación entre la formación del coagulo de fibrina y la proliferación de los fibroblastos, resaltando su importancia durante el proceso de cicatrización (Gray A, Reeves J, et al 1990).

## Respuesta inflamatoria

Una vez que ocurrió el daño y durante las primeras 24 horas se desarrolla la fase inflamatoria, el flujo de células inflamatorias en el área de daño comienza hasta las 48 horas siguientes, donde el componente celular se vuelve dominante. Esta fase presenta las características clásicas de la inflamación: rubor, dolor, calor, y edema alrededor del sitio de daño.

Las células clave en la fase inflamatoria son los neutrófilos y los monocitos/macrófagos. Estas células mediante fagocitosis y desbridamiento mantendrán aséptica la zona de daño, y simultáneamente liberarán varios mediadores como citocinas y factores de crecimiento.

Los **neutrófilos** constituyen la primera línea de defensa contra las infecciones, fagocitando y matando las bacterias generando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como proteasas (elastasas, colagenasas y catepsina G) en el sitio de la herida. La respuesta inflamatoria se intensifica por el aumento de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$ . Después de dos o tres días en el sitio de la herida los neutrófilos entran en apoptosis y son reemplazados por monocitos.

Los **monocitos** migran de los capilares y bajo la influencia de mediadores inflamatorios, tales como TGF- $\beta$  y productos de degradación de fibrina y fibronectina presentes en la matriz provisional sufren una diferenciación a macrófagos. La trombina sirve como factor mitogénico y quimiotáctico de macrófagos/ monocitos.

Los **macrófagos** tienen un doble papel en el proceso de cicatrización, participan en la fagocitosis, matan las bacterias y remueven los residuos, porque secretan moléculas de la matriz extracelular (MMPs) como colagenasas o elastasas y por otro lado son la principal fuente de citocinas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación de fibroblastos y la biosíntesis de colágena, además de liberar al activador de plasminógeno, degradando el tapón de fibrina. Secretan TGF- $\beta$ , PDGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, HB-EGF, IL-1, IL-6, estos mediadores no solo regulan el proceso inflamatorio, también modulan la epitelización, angiogénesis y la biosíntesis de colágena.

Los **linfocitos** en la última etapa del proceso inflamatorio se infiltran en el sitio de la herida e influyen la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena.

## Fase de proliferación y migración

Durante esta fase el número de células en la zona de herida se incrementa, hay migración y proliferación de fibroblastos, células endoteliales y de queratinocitos, a la par que sintetizan mediadores que estimulan y modulan a) la biosíntesis de moléculas de matriz extracelular, b) la epitelización y c) la angiogénesis.

Los **fibroblastos** son células en forma de huso que están ampliamente distribuidas en la mayoría de los tejidos y particularmente en el tejido conjuntivo. Este tipo celular es de origen mesenquimal expresan vimentina, y no expresan alfa actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA) ni desmina. Los fibroblastos regulan el intercambio de las proteínas de la matriz extracelular bajo condiciones fisiológicas (Li B, Wang J.2011).

En el sitio alrededor de una herida los fibroblastos son estimulados por factores de crecimiento como PDGF y TGF- $\beta$  por proteínas como fibrina y fibronectina que se encuentran en la matriz provisional para proliferar, expresar receptores tipo integrinas y migrar al sitio de la herida.

Los fibroblastos *In vitro*, requieren de fibronectina para moverse a través de una matriz de fibrina, los fibroblastos pueden interactuar directamente con fibrina y vitronectina en dominios sitios RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) a través de receptores integrinas (Clark R. 2001).

El proceso por el cual los fibroblastos sintetizan una matriz extracelular se conoce como fibroplasia que es la fase en el proceso de cicatrización en el cual los fibroblastos repueblen la cicatriz, generalmente involucra la estimulación y atracción quimiotáctica de los fibroblastos por los factores de crecimiento y fragmentos proteolíticos de las moléculas de la matriz extracelular generadas en la herida por los macrófagos mediante un gradiente quimiotáctico (el movimiento de células hacia un gradiente de concentración de un químico soluble).

a) Los fibroblastos constituyen las células clave en el proceso de biosíntesis de matriz, ya que migran al sitio del daño a través de un gradiente quimio-táctico de PDGF, EGF, IGF-1 y TGF- $\beta$  a su vez estos factores estimulan la síntesis de moléculas de matriz así como la formación del “tejido de granulación” nombrado así debido a su apariencia granulada y de red entrelazada por los capilares y vasos recién formados así como las moléculas recién sintetizadas y de abundantes células (fibroblastos y macrófagos) en proliferación, y entre fibras de

colágena recién sintetizadas. Las moléculas de la MEC que constituyen el tejido de granulación son: colágena principalmente tipo I y tipo III, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y proteínas no colagénicas. La matriz del tejido de granulación es rica en heparán sulfato (proteoglicano), condroitin y dermatán sulfato. En las etapas tempranas de este tejido hay un gran porcentaje de ácido hialurónico y fibronectina. Con el paso del tiempo la concentración de ácido hialurónico decrece y es reemplazado por colágena. El contenido de colágena en el tejido de granulación se incrementa mientras que el porcentaje de fibroblastos disminuye hasta que desaparecen mediante apoptosis.

El tejido de granulación sustituye temporalmente a la dermis y finalmente madurará a una cicatriz durante la fase de remodelación.

b) **Epitelización** es un proceso en el cual se cierra el defecto reconstruyendo el epitelio después del daño, el principal tipo celular que participa son las células epiteliales las cuales llegan provenientes de los bordes de la herida y de apéndices epiteliales como folículos, glándulas sebáceas y sudoríparas.

El proceso comprende la separación celular, la migración al sitio de la herida, así como la proliferación y migración. Estos procesos están mediados por factores de crecimiento como EGF, KGF y TGF- $\alpha$ . Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  es uno de los factores involucrados en la maduración del epitelio (Werner S. Krieg T, Smola H 2007).

c) **Angiogénesis** se refiere a la creación de nuevos vasos sanguíneos, este proceso restaura la circulación en la zona de daño, provee de oxígeno y nutrientes y prevé el desarrollo de necrosis por isquemia. Está regulado por mediadores solubles como bFGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, angiogenina y angiotropina, también es estimulada por el microambiente formado como baja presión de oxígeno, bajo pH y concentraciones altas de ácido láctico. Por último, es estimulado por angiostatina y trombospondina.

Las células encargadas de este fenómeno son las células endoteliales las cuales migran a la matriz temporal, proliferan y crean una nueva red ramificada de estructuras tubulares. La migración requiere de secreción local de metaloproteasas de matriz que digieran la membrana basal. Conforme pasa el tiempo la angiogénesis cesa, mientras que una parte de los capilares son desintegrados por apoptosis.

## **Fase de reparación o remodelación**

Durante esta fase y bajo la influencia de citocinas como TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), la colágena tipo I se convierte en la proteína fibrosa más abundante. En el tejido, la resistencia a la tracción aumenta y la colágena aún se sigue sintetizando, entrecruzando, reorientando y degradando, hasta formar una cicatriz madura. La remodelación implica un incremento en el recambio de los elementos del tejido conjuntivo por medio de proteasas que degradan a la matriz extracelular, como son las MMPs y su regulación por medio de los inhibidores (inhibidores tisulares de las MMPs o TIMP por sus siglas en inglés). Esta estrecha regulación entre síntesis y degradación es controlada principalmente por citocinas (Bonnans Caroline, Chou J, Werb Z, 2014), entre otros mediadores bioquímicos y moleculares.

En esta fase, los procesos celulares que se activaron en la etapa de proliferación cesan, reducen su actividad, algunos tipos celulares sufren apoptosis, entre ellos macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, debido a un cambio en el perfil cualitativo y cuantitativo de citocinas, (Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y & Longaker M.T. 2008) así como una baja en la actividad metabólica, lo que resulta en una cicatriz hipocelular e hipovasular (Satish L & Kathju S.2010).

Un evento muy importante que se lleva a cabo en esta última fase del proceso de cicatrización es que la superficie de la cicatriz se contrae. El fenómeno de contracción lo conforma una diferenciación fenotípica de fibroblastos a miofibroblastos. Por otro lado, la proporción de los tipos de colágena cambia (el tipo I se incrementa en favor del tipo III), el contenido total de colágena aumenta al igual que el número de entrecruzamientos y uniones covalentes que resulta en una mayor resistencia a la tracción del tejido y en un cambio en la organización espacial. En esta fase los componentes recién sintetizados de la matriz extracelular presentan varios cambios, el inicial depósito de delgadas fibras de colágena agrupadas al azar, típicas de la fase de proliferación, es reemplazado por una matriz en donde las fibras de colágena están maduras, gruesas y entrecruzadas, de un diámetro propio que construyen una red de tejido nuevo (Reinke J.M, Sorg H. 2012).

## ANTECEDENTES

En un modelo experimental se pretende representar algunos aspectos de la realidad que teóricamente son relevantes. Esta condición análoga simplifica y restaura diferentes elementos de la realidad que darán lugar a un sistema que represente la porción de la realidad seleccionada. Por lo cual este modelo pasa a ser una representación de segundo orden, que está hecha sobre un sistema y que representa una abstracción de la realidad. De esta manera los modelos resultan en representaciones abstractas y se consideran herramientas de representación teórica del mundo, que auxilian en su explicación, lo predicen y lo transforman (Galagovsky L, Adúriz-Bravo A. 2001).

### Modelos de cicatrización en 3D

En 1979, Bell y colaboradores reportaron que se podía formar una estructura parecida o equivalente a un tejido dérmico mezclando fibroblastos en una matriz de colágena. Estos fibroblastos son capaces de interactuar con las fibras de colágena y producir un arreglo de ellas. El rango de contracción se puede regular variando el número celular, el contenido de proteína y mediante la adición exógena de inhibidores o activadores de la contracción. En el ensayo de Bell se midió cuantitativamente el fenómeno de contracción, resultado de la incorporación de las células dentro de la matriz de colágena, y de la función de los fibroblastos para contraer y eliminar el medio líquido (Bell E, Ivarsson B, and Merrill, C. 1979). Si bien estos modelos sirven para medir o estudiar el fenómeno de contracción, hoy en día se utilizan para estudiar la locomoción y la elongación celular, que son relevantes para conocer las interacciones entre las células con su matriz (Dallon, J, Ehrlich P., 2008).

Considerando que la colágena es la proteína más abundante de los tejidos conjuntivos, entre ellos la dermis cutánea, y que los fibroblastos son las células predominantes en ellos, entonces este modelo puede ser usado para el estudio de la cicatrización y de algunas de las funciones de la piel. Se ha generado una gran controversia en cuanto al uso de las matrices de colágena y fibroblastos como un modelo de cicatrización. Para algunos autores las matrices no son

buenos modelos, como por ejemplo para modelos complejos de úlceras crónicas que no pueden modelarse con matrices de colágena (Kuhn and et al. 2000) , ya que al ser muy reduccionistas estas se centran sólo en un fenómeno de la cicatrización y no representan todas las fases involucradas en este proceso. Sin embargo, al contener sólo un tipo celular permite aislar el fenómeno de interés, experimentar sólo en una etapa, adicionarle factores de crecimiento, proteínas y esclarecer los mecanismos moleculares y celulares implicados. Por lo anterior el modelo de poblaciones de fibroblastos embebidos en matrices de colágena se ha usado para tratar de esclarecer los mecanismos que ocurren en las diferentes fases de cicatrización (Grinnell F & Petrol WM 2010, Miller CC et al 2002, Brown Robert A 2013, Ehrlich PH, Rajaratnam JBM 1990) .

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Analizar la reparación de una matriz tridimensional de libre flotación, compuesta por colágena tipo I y fibroblastos en un modelo de daño.

## Objetivos particulares

1. Establecer un modelo de herida incisional *in vitro* e identificar los procesos biológicos reconocidos durante la reparación, como la migración de fibroblastos al sitio del daño, así como la síntesis de nuevas moléculas de matriz extracelular necesarios para el cierre de la incisión.
2. Evaluar la contribución de los fibroblastos en el cierre de un defecto incisional, identificar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos mediante la expresión de actina de músculo liso y medir la contracción de la matriz.
3. Cuantificar la síntesis de colágena, la actividad de las metaloproteasas de matriz extracelular: MMP- 2, MMP-9 durante el cierre del defecto incisional
4. Determinar el papel de la fibrina en la contracción y diferenciación de fibroblastos, así como en la síntesis de colágena y actividad de MMPS en el recambio de matriz, durante el cierre del defecto incisional.

## **METODOLOGÍA**

### **Establecimiento del modelo de daño incisional**

#### **Cultivo celular**

##### **Cultivo y propagación de Fibroblastos**

Se creció la línea celular BJ1 de fibroblastos de piel humana (American Type Culture Collection ATCC Lockville MD, USA CRL-2522) en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA USA) suplementado con suero de bovino fetal (SBF) al 10% (Gibco Thermo Fisher Scientific), antibióticos al 1% (10,000 unidades/ml de penicilina 10,000 g/ml streptomycin, Pen Strep® de Gibco Thermo Fisher Scientific) y L-glutamina al 1% (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Las células se propagaron en botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Corning-Costar®, New York, NY, USA) en una incubadora a una temperatura de 37°C, con una mezcla gaseosa de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire. Una vez que los fibroblastos llegaron a 90% de confluencia, se realizaron subcultivos, para ello se lavó la monocapa celular con 5ml de Verseno y las células fueron desprendidas con un tratamiento a base de Tripsina al 0.025% (5ml, Sigma Aldrich St. Louis MO, USA). Inmediatamente después se adicionaron 10ml de medio suplementado para detener la reacción de la enzima, se centrifugó la suspensión celular a 1,500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió por pipeteo suave con medio suplementado en una botella nueva (Freshney RI 2005).

##### **Diálisis, filtración y cuantificación de la colágena.**

La colágena porcina tipo I (DSM Nutritional Products, LLC. Heerlen, The Netherlands Limburgo, Holanda) se dializó con ácido acético 5mM a 4 °C en agitación constante por 2 horas. En total se realizaron tres cambios de la solución de diálisis y en el último se quedó toda la noche. La colágena dializada se filtró en la campana de flujo laminar a través de filtros de 0.45µm de poro, en tubos cónicos de polipropileno de 50ml, estériles. Se tomó una alícuota de 1ml para

determinar su concentración mediante su proporción de hidroxiprolina<sup>(Woessner, JF 1961)</sup> la cual resultó de 9.48-9.69 mg/ml.

### **Establecimiento de cultivos tridimensionales de libre flotación**

Para el establecimiento del cultivo de libre flotación, se mezclaron  $1 \times 10^5$  fibroblastos BJ1 en medio D-MEM 1.5X suplementado y colágena porcina tipo I (2mg/ml) a 4°C. Dos mililitros de la suspensión celular se distribuyeron en cada pozo de una placa de cultivo de 24 pozos (Corning-Costar) y se dejaron en incubación a 37°C por 1 hora, tiempo en el cual la colágena polimerizó. Dado que la colágena del sistema se adhiere a las paredes del pozo, ésta se despegó de los bordes con una aguja estéril, permitiendo así la libre flotación del cultivo en el medio. Para incrementar la consistencia de los cultivos tridimensionales, estos se mantuvieron en la incubadora por 5 días mientras se aumentaban su rigidez; que fue el tiempo apropiado para obtener sistemas semisólidos manejables, dado que cuando se prepara la matriz de fibroblastos y colágena, ésta es laxa y traslúcida, y conforme pasa el tiempo los fibroblastos ejercen fuerzas de tracción que cambian su consistencia volviéndola opaca y reduciendo su tamaño<sup>(Bell et al. 1979)</sup>.

A partir de los cultivos tridimensionales de libre flotación contraídos por 5 días, se estableció un modelo de daño incisional. Para ello, cada cultivo fue transferido a una placa de 24 pozos nueva donde en 1ml de medio suplementado se cortó a la matriz por la mitad con tijeras quirúrgicas modificadas que permitían realizar una incisión homogénea, simple y siempre a la misma profundidad (Figura 1). Para que las células pudieran migrar a la hendidura, se integró al cultivo una matriz provisional de fibrina (Tissucol<sup>®</sup> adhesivo hemostático de Baxter Deerfield Illinois, USA, que contiene fibrinógeno humano liofilizado, solución de aprotinina bovina, trombina y solución de cloruro de calcio). Se agregaron 20µl de la mezcla aún soluble de Tissucol en la hendidura de cada defecto generado y se incubaron por 30 minutos para favorecer la polimerización de la matriz, el cultivo con el daño se mantuvo en incubación por 1, 5, y 10 días. Se empleó como control un cultivo sin fibrina.



**Figura 1. Establecimiento del modelo.** En el panel A se muestran las tijeras modificadas. En el panel B se ilustra el momento del corte de los cultivos tridimensionales. En el panel C se muestra la aplicación de fibrina.

### **Preparación de la muestra para su análisis morfológico.**

Los cultivos tridimensionales se fijaron en 3ml de SafeFix<sup>®</sup>, (Thermo Fisher Scientific) por 24 horas, se deshidrataron con una serie gradual de alcoholes (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) por 30 minutos en cada uno. Posteriormente se continuó con etanol-xileno, xileno y xileno-parafina, para su posterior inclusión en parafina líquida a 60°C por 12 horas (Paraplast Plus<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich). Se formaron los bloques con la muestra incluida y se cortaron en secciones de 5µm de espesor en un micrótopo (Leica<sup>®</sup> Microsystems Wetzlar, Germany). Los cortes se colocaron en portabjetos electrocargados para realizar tinciones.

## **Tinción Hematoxilina-Eosina**

La hematoxilina es un colorante catiónico y actúa como un pigmento básico, asociándose a moléculas que poseen grupos aniónicos como fosfatos, sulfatos o carboxilos ionizados; como ocurre con la cromatina presente en los núcleos, tiñéndolos de color morado. Por su parte la eosina es un colorante ácido (predomina densidad de carga negativa) por lo que se asocia a estructuras catiónicas del citoplasma y matriz extracelular tales como: filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras de colágena, tiñéndolas de un tono rosa intenso.

Brevemente, las laminillas se desparafinaron en un horno a 60° C por 10 minutos y con una serie gradual de alcoholes se rehidrataron (100%, 96%, 80%, 70%, 50%), se tiñeron con hematoxilina de Harris al 30% por 1 minuto, se agregó solución de carbonato de litio saturado para virar a azul y se lavaron con agua destilada, se tiñeron con eosina al 1% por 25 minutos, se lavaron con agua destilada y las laminillas se montaron con resina para microscopía (Entellan®, Merck Millipore. Billerica, Massachusetts, USA).

## **Tinción Tricrómica de Massón**

Los tejidos se desparafinaron como se indicó previamente, una vez deshidratados se agregó solución de Bouin y se dejó fijando por 12 horas a temperatura ambiente (periodo importante dado que las fibras de colágena eran muy delgadas y de lo contrario no se obtenía una tinción evidente y homogénea). Pasado el tiempo se retiró la solución y los tejidos se lavaron con agua destilada, se agregó hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos, se retiró y se lavó con agua corriente y se tiñó con fuscina ácida escarlata de Biebrich por 15 minutos, se realizó un lavado y se agregó ácido fosfomolibdico por 10 minutos, los tejidos se lavaron y se tiñeron con azul de anilina por 10 minutos. Nuevamente se lavaron y se agregó ácido acético al 1%. Los tejidos fueron deshidratados en alcohol del 96%, 100% y xilol para finalmente realizar el montaje de la muestra.

## **Ensayo por inmunohistoquímica para evidenciar la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).**

Las laminillas se desparafinaron y se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS) y se bloqueó la peroxidasa endógena por 20 minutos con una mezcla de metanol: peróxido de hidrógeno (9:1), los tejidos se lavaron tres veces con PBS por 2 minutos cada una. Dado que la proteína  $\alpha$ -SMA es intracelular, fue necesario realizar la exposición de epítomos, lo cual se llevó a cabo tratando los tejidos con un buffer de citratos pH 6 a 70°C por 10 minutos. Posteriormente los sitios de posible pegado inespecífico se bloquearon con suero normal de caballo al 2.5% (Vectastain Universal Quick HRP kit (Peroxidase), R.T.U (Ready-to-Use) (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) por 15 minutos en una cámara húmeda. El suero bloqueante se retiró sin lavar y los tejidos se incubaron por 15 horas con el anticuerpo primario policlonal anti-conejo para  $\alpha$ -SMA (anti-alpha smooth muscle actin antibody® ab5694 de Abcam Cambridge, UK) en una dilución de 1:200 a 4°C en una cámara húmeda. Al finalizar el tiempo se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinado (universal pan-specific, anti-mouse/rabbit/goat IgG) Vectastain Universal Quick HRP kit (Peroxidase), R.T.U (Ready-to-Use) por 15 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS por 2 minutos, después se agregó la enzima conjugada streptavidina-peroxidasa, Vectastain Universal Quick HRP kit (Peroxidase), R.T.U (Ready-to-Use) por 10 minutos y los tejidos se lavaron tres veces con PBS por 2 minutos y finalmente se reveló con el kit (AEC Peroxidase substrate kit Vector®) el cual tiene como sustrato aminoetilcarbazol que al reaccionar con la peroxidasa genera un precipitado de color marrón.

## **Análisis de la morfología del citoesqueleto**

Para evidenciar la distribución del citoesqueleto de los fibroblastos se realizó la tinción de las fibras de F-actina a través de un ensayo fluorescente de afinidad por faloidina (Alexa Fluor® 488 Phalloidin. Life Technologies).

Los cultivos tridimensionales se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con una solución de formaldehído al 3.8% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces más con PBS. Para permeabilizar las membranas, se agregó Tritón X-100 al 0.1% en PBS por 5 minutos, los cultivos se lavaron dos

veces con PBS, se bloquearon los sitios inespecíficos de los cultivos con una solución de albumina al 1% en PBS por 30 minutos y se tiñó con la solución de faloidina fluorescente 200 unidades/ml que equivalen a una concentración de 6.6  $\mu$ M (tomar 5  $\mu$ l del stock de faloidina y agregar 195  $\mu$ l de BSA en PBS por muestra) por 40 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS y los núcleos se tiñeron con 5 $\mu$ l de yoduro de propidio (solución, 1mg/ml, sigma-Aldrich®) en 500 $\mu$ l de PBS. Se realizaron dos lavados más con PBS y se observaron al microscopio.

## **Análisis metabólicos**

### **Evaluación de la actividad metabólica mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)**

Se realizó la prueba de reducción de la sal de tetrazolio (MTT de Sigma-Aldrich). El sustrato es una sustancia amarilla que se reduce a cristales de formazán caracterizados por ser azul oscuro. La reducción se lleva a cabo por la enzima deshidrogenasa mitocondrial en células metabólicamente activas, la actividad de las células es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann Tim 1983). Los cultivos tridimensionales se colocaron con cuidado y con ayuda de unas pinzas en una caja de 24 pozos nueva, a cada pozo se le agregaron 50 $\mu$ L de solución de MTT a una concentración de 1mg/ml en 1ml de DMEM y se incubaron 37°C por 3 horas, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5ml. Las muestras se sonicaron en presencia de una mezcla 1:1 de isopropanol/DMSO para disolver el formazán insoluble. La suspensión obtenida se centrifugó a 10,000rpm durante 5 minutos, el sobrenadante (la solución colorida) se cuantificó en un espectrofotómetro para placas de ELISA a 595nm. Se monitoreó la actividad celular al día 1, 5 y 10 postdaño.

## **Obtención, concentración y cuantificación de proteínas en los sobrenadantes de cultivo.**

El sobrenadante en el cual se establecieron los cultivos se recuperó después de cada periodo de incubación, las proteínas se concentraron al mismo tiempo que las sales se retiraron por diálisis mediante un dispositivo de filtración molecular (Microcon Ultracel YM-3, regenerated cellulose 3,000 MWCO, Millipore). El procedimiento fue el siguiente: se colocaron 500µl de medio sin tocar la membrana del fondo, se tapó el dispositivo y se centrifugó por 15 minutos a 4°C a 14 000 xg. El sobrenadante recuperado se pasó a un tubo Eppendorf y se concentró hasta sólido por vacío durante 1 hora a 37°C (Vacuum Concentrador Systems CentriVap de Labconco Kansas City, MO,USA), el concentrado de proteínas se diluyó en 100µl de ácido acético 0.5mM y se cuantificó por el método de Lowry; la determinación de proteínas se realizó preparando primero una curva de albúmina, tanto la curva como las muestras a analizar fueron leídas a una longitud de 595 nanómetros en el espectrofotómetro, se registraron los valores de absorbancia de cada muestra y se calculó una regresión lineal de los valores de la albúmina contra los valores de absorbancia, la cual generó un modelo lineal que nos permitió intrapolar los valores de las muestras para conocer la concentración de proteínas.

## **Evaluación de actividad gelatinolítica.**

La actividad de enzimas que degradan la matriz extracelular (MMPs) se puede observar por la técnica de zimografía de sustrato, que permite identificar a las MMPs mediante la degradación de su sustrato preferencial y por su peso molecular. (En la zimografía, las proteínas son desnaturalizadas por dodecil sulfato de sodio (SDS), separadas en condiciones no reductoras por electroforesis en un gel de acrilamida que contiene un sustrato específico.) Para conocer si en los cultivos tridimensionales de fibroblastos y colágena se presentó actividad de enzimas de la familia de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) se realizaron zimogramas de gelatina al 1%.

Se realizó un ensayo de electroforesis discontinua en el cual se separaron (los sobrenadantes de los medios, dónde crecieron los cultivos que fueron procesadas como se describió previamente). La electroforesis discontinua

consta de un gel concentrador al 4% de acrilamida y uno separador al 7.5% de acrilamida y 1% de gelatina. Las muestras se cargaron a la misma concentración de proteínas, equivalente a 0.25mg/ml y se llevó a cabo la corrida electroforética por una hora con voltaje constante (35mA) en buffer de corrida 1X. Una vez que se realizó la electroforesis el gel se lavó con agua destilada y un lavado más con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 2.5% por 1 hora, en agitación constante. Durante la electroforesis el SDS desnaturaliza las gelatinasas volviéndolas inactivas, sin embargo, el lavado con Tritón X- 100 las renaturaliza y recobran su actividad. Posteriormente el gel se incubó a 37°C con agitación durante 18 horas con el buffer de cloruro de calcio que le proveyó de iones para la activación enzimática (Von den Hoff JW, et al.2005)

Después de la incubación el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 2.5% (Thermo Fisher Scientific) por una hora con agitación constante. Posteriormente se retiró la solución teñidora y se reemplazó por solución desteñidora que removió el exceso de colorante hasta que fue posible ver claramente bandas de actividad gelatinolítica.

## **Densitometría de geles**

Debido a que la presencia de actividad se visualizó en un transluminador como bandas blancas en el gel, fue posible cuantificarlo mediante densitometría. Los geles fueron digitalizados con el paquete de captura ChemiDoc XR® System and Quantity One software versión 4.6.9 (Bio–Rad Laboratories, Hercules CA, USA). El cual incluye un software (Quantity One 4.6.7) de análisis digital de imágenes. Las bandas claras en el gel recibieron un valor de intensidad asignado por el programa que fue reflejo de la actividad gelatinolítica para cada una de las bandas en las diferentes muestras. En el programa después de detectar las bandas, estas se ajustan mediante unos braquets que detectan el pico máximo, se elige el atributo de interés que en este caso fue (la intensidad x milímetros) y estos datos se graficaron como el resultado de 6 experimentos independientes.

## **Ensayo de síntesis de colágena**

Se cuantificó el pro-péptido C de la colágena tipo I a través de un inmunoensayo (Procollagen type I C-Peptide (PIP) EIA kit, Takara Bio INC. Shiga, Japón). De los sobrenadantes, de los cultivos sin concentrar se llevó a cabo la determinación por el enzimoimmunoensayo (EIA) del PIP siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Los valores obtenidos se reportaron como ng/ml de PIP y fueron el promedio de dos experimentos.

## RESULTADOS

### **La reparación del daño incisional de un cultivo tridimensional de fibroblastos requiere de una matriz provisional que conecte los bordes seccionados.**

Los cultivos tridimensionales de libre flotación son una herramienta útil en el estudio de la interacción célula-matriz extracelular. (Carlson M, Longaker M. 2004) En este trabajo reportamos un modelo de daño incisional empleando este tipo de cultivos con el objeto de simular las condiciones tempranas de una lesión aguda con separación de bordes, donde nuestro interés se centró en los fibroblastos y su interacción con la proteína más abundante de la dermis animal, la colágena. Nuestros primeros intentos consideraron simplemente el realizar un corte en el cultivo tridimensional, esperando que la contracción que se sabe ejercen las células sobre la matriz fuera suficiente para afrontar los bordes del daño (Gabbiani G. 2003). No obstante, al llevarse a cabo la incisión y al permitir a las células que migren al sitio del defecto y lo cierren, observamos que al parecer los geles se abrían más en el sitio del corte en lugar de cerrarlo y que a pesar de la contracción y del paso del tiempo, la incisión no cerró por lo cual se consideró utilizar un material que sirviera de interfase en la incisión. Dado que el modelo era muy básico, formado sólo por colágena y fibroblastos, fue necesario acercarnos un poco más al fenómeno de reparación *in vivo* y adicionamos fibrina en la zona de daño, como se puede apreciar en la figura 2, ya que la fibrina es la principal proteína que participa en la formación de la matriz del coágulo en los organismos durante las primeras fases de la reparación (Laurens N, et al. 2006).

Los cultivos tridimensionales con fibrina y controles presentaron una contracción semejante y progresiva de la matriz (Figura 3). A nivel microscópico, en todos los cortes fue evidente la incisión y la matriz provisional de fibrina (Figura 4). La matriz se caracterizó por tener fibras de colágena empaquetadas que se observan de color azul intenso y la fibrina en rojo por la tinción tricrómica de Masson (Figura 5). Al día 1 post-daño se observó que la fibrina forma una red en el sitio del corte, así como una capa abundante de esta proteína en la superficie del cultivo (Figura 5) conforme avanzó el tiempo de cultivo la presencia de fibrina

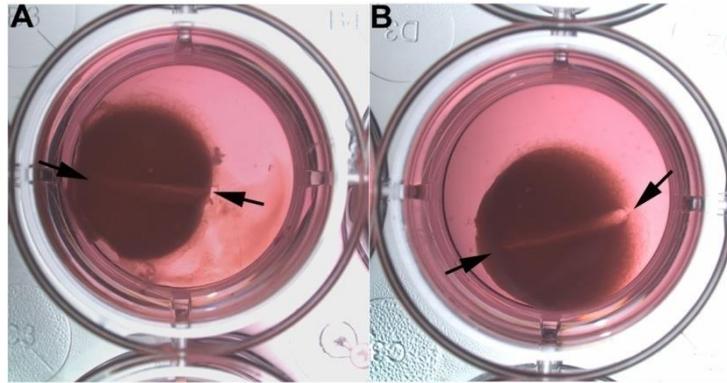
fue menos evidente (Figuras 4 y 5). En los cultivos control, al día 1 se observó la zona de la incisión claramente, mientras que para los días 5 y 10 solo la parte seccionada profunda volvió a integrarse, mientras que la superficial quedó abierta. La fibrina en la zona del defecto brindó una matriz provisional que sirvió de sostén para el afrontamiento de los bordes y la migración de los fibroblastos. En la figura 6 se observan fibroblastos en la matriz de fibrina (panel B) los cuales fueron teñidos con DAPI, se observan fibroblastos en la zona de la incisión, así como en la matriz de fibrina. A nivel celular se pudo apreciar que los fibroblastos presentaron diferentes morfologías, siendo fusiformes principalmente, algunos dendríticos y la mayoría alargados, también presentaban prolongaciones.

Otra característica valorada fue la disposición de las fibras o el arreglo de la matriz en el sitio del daño. En los cultivos control se observó que la orientación de las fibras era más uniforme, mientras que los cultivos tratados con fibrina las fibras colagénicas se contrajeron, generando cambios en el patrón de distribución y quedando integradas con las fibras de fibrina (Figura 5).

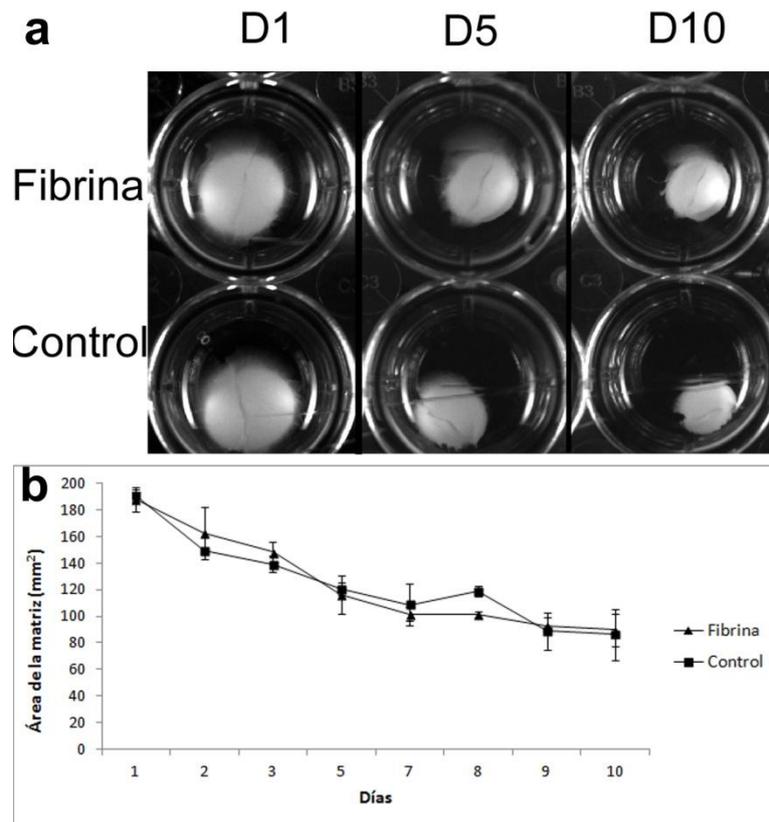
Se sabe que los miofibroblastos son los responsables de la contracción en una herida *in vivo*, así que dado que nuestros cultivos contrajeron existía la posibilidad de que algunos de los fibroblastos se hubieran diferenciado a miofibroblastos. A través de un ensayo inmunohistoquímico buscamos la expresión de la actina alfa de músculo liso en las células y no encontramos marcaje positivo, lo que nos llevó a afirmar que la contracción se presentó solamente a través de mecanismos fibroblásticos. Debido a que está reportado que para llegar a la diferenciación a miofibroblastos, en ensayos *in vitro*, los fibroblastos deben ser estimulados con factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$ 1, y el PDGF o variando la rigidez de la matriz (Tomasek JJ, et al 2002) por lo que nuestro sistema no cumplió con las condiciones de estimulación para llevar a cabo tal diferenciación.

**Fibrina**

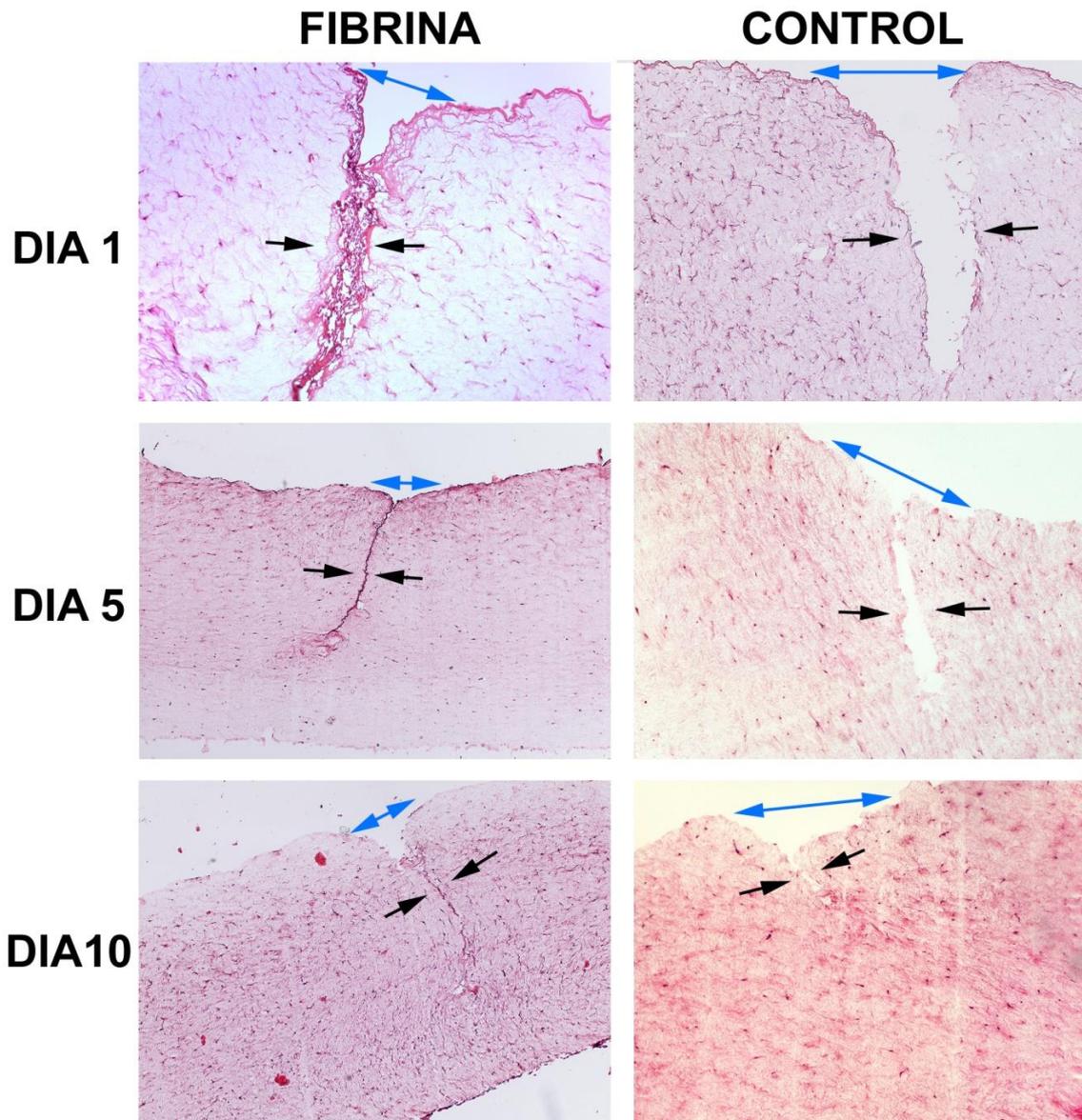
**Control**



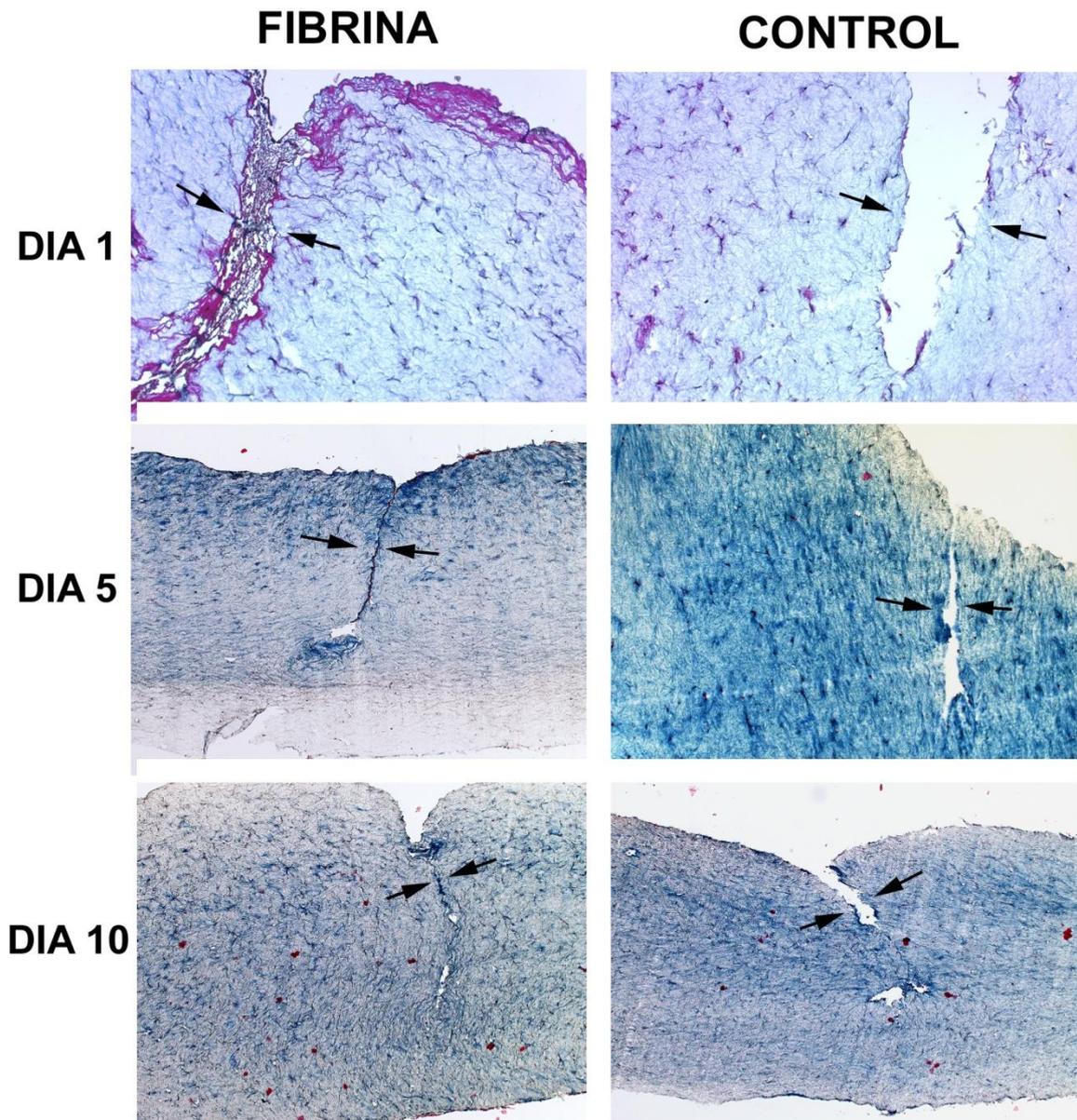
**Figura 2. Modelo de cicatrización.** A la izquierda se muestra un cultivo tridimensional con fibrina en la zona de la incisión, a la derecha se observa un cultivo control en flechas se señala la zona de la incisión



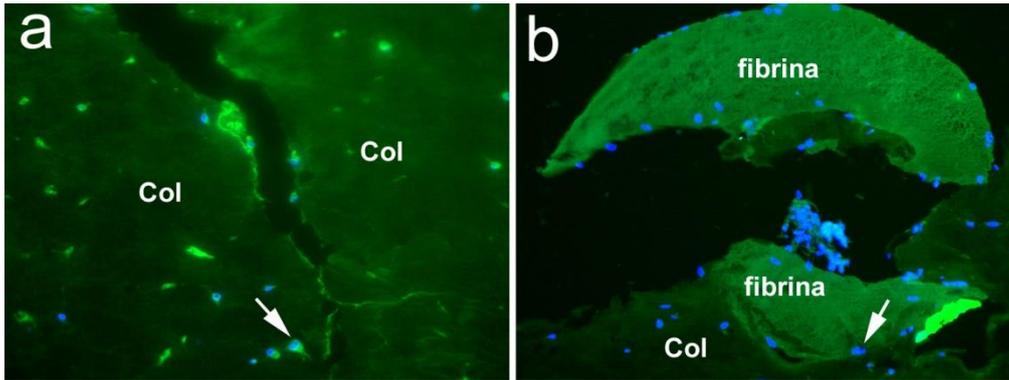
**Figura 3. Contracción de los cultivos tridimensionales de fibroblastos.** En a) se observan las matrices con fibrina y los cultivos control. D1, D5 y D10 representan los días en cultivo, 1, 5 y 10, respectivamente. Imagen representativa de un duplicado derivado de uno de los 3 experimentos independientes realizados. En b) se muestra la gráfica con los promedios  $\pm$  la desviación estándar de los 3 experimentos independientes que se realizaron.



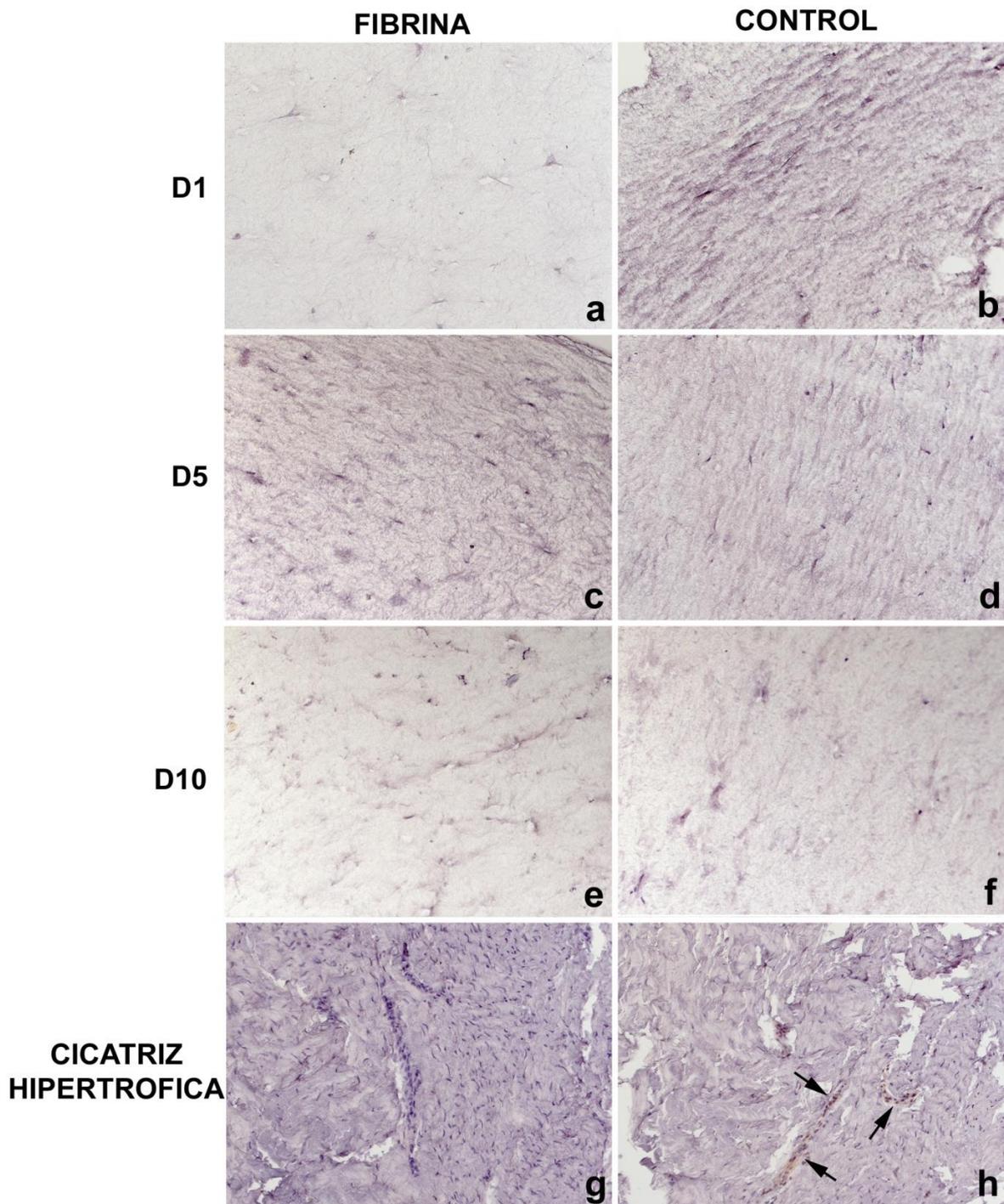
**Figura 4. Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos teñidos con hematoxilina y eosina.** En el panel izquierdo de la figura se encuentran las muestras tratadas con fibrina en la zona del defecto y en el derecho se presentan los controles. Matriz extracelular en rosa, núcleos de células en morado y fibrina en un color rojo. Las flechas negras señalan la zona de la incisión y en flechas azules el tamaño de la incisión.



**Figura 5. Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos teñidos con la técnica Tricromica de Massón.** En el panel izquierdo de la figura se encuentran las muestras tratadas con fibrina en la zona de la incisión, y en el lado derecho se presentan los controles. En azul se observa la matriz extracelular de colágena con distintos grados de empaquetamiento, en negro las células y en rosa fuerte se observa la fibrina. Las flechas negras representan la zona de incisión.



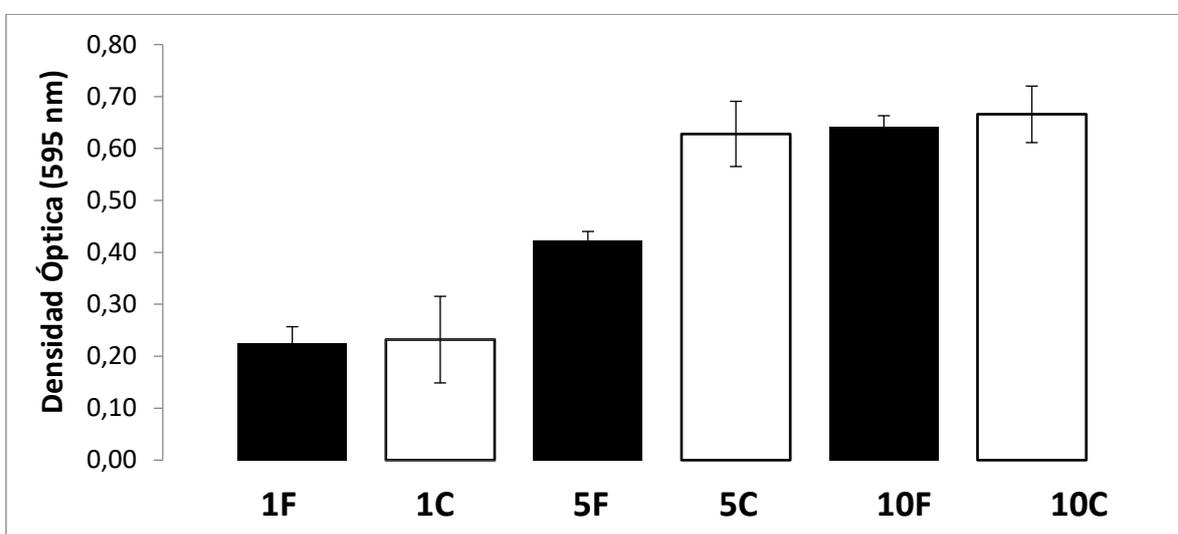
**Figura 6. Identificación de fibroblastos en la matriz de fibrina.** En A se observa matriz de colágena y fibroblastos en la zona del defecto y en B se observan fibroblastos en la matriz de fibrina. En azul núcleos de las células marcados con DAPI y en verde la matriz de colágena y fibrina.



**Figura 7.** Fotomicrografía de cortes transversales de los cultivos tridimensionales de fibroblastos procesados por inmunohistoquímica para evidenciar a la actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). En a, c y e se presentan las muestras tratadas con fibrina, en b, f y h las muestras control. Las imágenes g y h representan los controles de reacción preparados en cicatriz hipertrofica, negativa y positiva respectivamente. El aumento de las imágenes es de 200 veces.

**Los cultivos tratados con fibrina presentaron una menor proliferación que los controles.**

Para conocer el efecto metabólico que la fibrina pudiera ejercer sobre las células de los cultivos tridimensionales se realizó un ensayo de actividad metabólica a través de la reducción de MTT. Los fibroblastos de los cultivos tratados con fibrina presentaron una proliferación lineal durante el tiempo del experimento, no obstante, los que crecieron solo en las matrices de colágena exhibieron un cambio abrupto en la proliferación entre los días 1 y 5, para posteriormente mantenerse sin cambios (Figura 8).

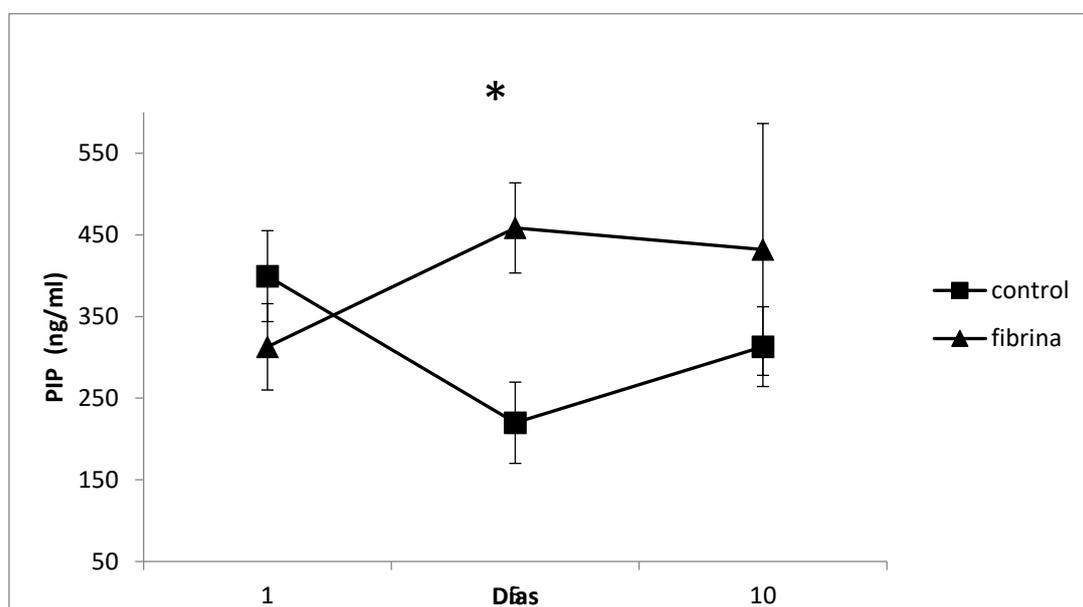


**Figura 8. Gráfica que muestra la actividad de la succinato deshidrogenasa en cultivos tridimensionales de fibroblastos.** Las barras de color negro representan a los cultivos tratados con fibrina y en blanco los controles. Se muestra la gráfica con los promedios  $\pm$  la desviación estándar de los 2 experimentos independientes que se realizaron por duplicado.

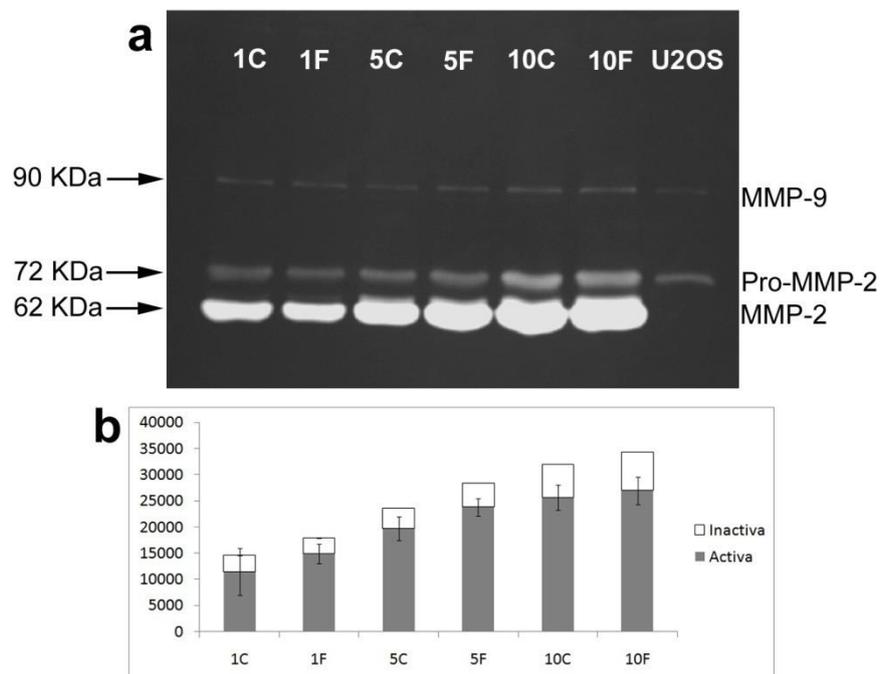
## Los cultivos tratados con fibrina en la zona del daño aumentan la síntesis de colágena.

Para cuantificar la síntesis de colágena, se realizó un inmunoensayo para detectar al péptido C de la procolagéna en sobrenadantes de los cultivos. En la figura 9 se puede observar que en los cultivos con fibrina al día 1, la producción de colágena es menor y que al día 5 presentan un aumento en la producción de colágena que no cambió para el día 10, mientras que los cultivos control, mostraron un comportamiento opuesto (Figura 9).

Está reportado que las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 están involucradas en el recambio de la matriz extracelular como ocurriría en una herida *in vivo* (Gill S E, Parks W C 2008), por lo que en este trabajo decidimos valorar la actividad gelatinolítica mediante zimografía. Todas las muestras evidenciaron MMP-2, tanto en su forma inactiva (Pro-MMP-2, 72 KD) como activa (MMP-2, 62 KD, y sólo observamos la forma inactiva de la MMP-9, donde encontramos cambios mínimos entre los dos cultivos evaluados, observándose solamente una variación entre ambos sistemas al día 5 post-daño (Figura 10).



**Figura 9. Cinética de la síntesis de colágena en cultivos tridimensionales de fibroblastos.** Se muestra la gráfica con los promedios + la desviación estándar de 2 experimentos independientes que se realizaron por duplicado. Mann-Whitney comparando cultivos control vs. con fibrina \*p=0.052



**Figura 10. Fotografía de un zimograma representativo de gelatina mostrando la actividad de MMP-2.** En a) se observa el gel con las bandas de lisis en la región correspondiente a las MMP 2 y 9. En b) se presentan los datos densitométricos correspondientes a las MMP 2 y 9. En b) se presentan los datos densitométricos correspondientes graficados. C= control, F= fibrina, U2OS= línea celular de osteosarcoma positiva para MMP-2 (control positivo). Las barras corresponden a promedios  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes que se realizaron por duplicado cada uno.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Uno de los eventos más tempranos que se presentan durante la reparación de las heridas es la hemostasia, que consiste en la formación de un coágulo sanguíneo cuyas funciones son: evitar la hemorragia, proveer de citocinas y cubrir de manera temporal el lecho de la herida. Cuando hay una pérdida en la continuidad de los vasos sanguíneos y la subsecuente hemorragia, el fibrinógeno que se encuentra en la circulación es polimerizado por la enzima trombina en fibras de fibrina (Schultz G S, et al 2011). Ya las moléculas de fibrinógeno presentan un dominio de unión a integrinas y a otras moléculas de superficie celular, así que cuando los fibroblastos se unen a la fibrina a través de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$ , estas interacciones favorecen su adhesión que llevan a las siguientes fases

del proceso de cicatrización. Más allá del papel de la fibrina como una matriz provisional que promueve la hemostasia, esta proteína activamente recluta varios tipos celulares que desencadenan respuestas como adhesión celular, migración y proliferación, por lo cual la composición estructural de la fibrina y su unión con las células y proteínas es altamente determinante durante el proceso de cicatrización (Laurens N, 2006).

Por ello, en este trabajo simulamos en un modelo tridimensional la etapa inicial de la reparación de heridas, donde los fibroblastos embebidos en una matriz de colágena respondieron a la presencia de fibrina en la zona del daño. Desde el primer día, pudimos observar la presencia de células en el borde de la incisión, particularmente en el cultivo tratado con fibrina, lo que sugiere que hay una migración de los fibroblastos hacia el sitio del daño, posiblemente asociado a cambios en la tensión de la matriz y los efectos quimioatrayentes de la fibrina (Clark R AF 2003). El cierre de una herida que cicatriza por primera intención se lleva a cabo principalmente por contracción (afrontamiento de los bordes seccionados). Para explicar este fenómeno se han propuesto varias hipótesis, la primera se refiere a que los elementos celulares en el tejido de granulación (fibroblastos y miofibroblastos) generan fuerzas contráctiles dentro del entorno de la herida, dando lugar a dirigir el movimiento hacia dentro del borde por medio de conexiones celulares y extracelulares (Farahani MR, Kloth CL, 2008). En nuestro sistema se cuantificó la contracción de las matrices y se valoró la morfología matricial. Tanto en el grupo control como en el tratado con fibrina no se observaron diferencias en la velocidad de contracción y en ambos cultivos se apreció que las células generaban deformaciones en la matriz de su alrededor. Está reportado que un evento clave en la contracción de una herida es la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos (Desmoulière A et al 2005). Los miofibroblastos son las mayores unidades contráctiles en la cicatrización, morfológicamente se caracterizan por tener haces de microfilamentos de actina que se asocian a proteínas contráctiles (Erllich H P, Hunt TK 2012) Éstas estructuras, conocidas como fibronexus, se encuentran en la superficie del miofibroblasto y forman un complejo de proteínas de adhesión que a través de las integrinas unen el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular (fibrillas de fibrina). Funcionalmente, esto provee un sistema de mecano-transducción, en la cual la fuerza que se genera por las fibras de estrés puede transmitirse a través de la

matriz extracelular y *viceversa* (Tomasek JJ, et al.2002). Dado que nuestro sistema presentó contracción, buscamos evidencia de la presencia de miofibroblastos a través de la expresión de  $\alpha$ -SMA, y como ésta no fue observada, consideramos que el efecto es puramente atribuible a los fibroblastos, que de por sí se sabe contribuyen con la contracción de las heridas *in vivo* (Ehrlich H P. 1988). Más aún, en un ensayo en el cual se probó el papel de  $\alpha$ -SMA durante la cicatrización, se observó que en ratones nulos para  $\alpha$ -SMA no hubo cambio en el cierre de las heridas cuando se comparó con los controles, sugiriendo que la  $\alpha$ -SMA no es la única proteína que contribuye en la contracción durante la cicatrización y que en ausencia de  $\alpha$ -SMA ocurre un efecto compensatorio en los miofibroblastos con otras isoformas de la proteína, como son la actina gamma de músculo liso (SM $\gamma$ A) y la actina alfa de músculo esquelético (SKM $\alpha$ A) (Tomasek J et al.2013). Otro argumento que justifica la ausencia de  $\alpha$ -SMA en nuestros experimentos es que los cultivos tridimensionales en libre flotación no presentan la suficiente tensión en la matriz como para favorecer la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Grinnell Frederick. 2000).

En nuestros cultivos tridimensionales los fibroblastos presentaron una morfología variable la cual tendía hacia un fenotipo fusiforme, alargado y delgado, en algunos casos dendríticos y con prolongaciones citoplasmáticas abundantes de tipo *filopodia*. Está reportado que los fibroblastos que crecen en matrices flotantes de colágena pueden proyectar una red dendrítica interconectada con uniones estrechas. Otra característica propia del modelo de matrices flotantes de baja tensión es que las células se mantienen quiescentes, existe un bajo recambio de la matriz, la señalización de la vía de ERK decrece, así como una baja en los receptores para factores de crecimiento. (Grinnel Frederick. 2003).

No obstante que nuestro sistema no mostró diferencias en la contracción general entre los cultivos control y las matrices con fibrina, sí observamos que los cultivos donde se adicionó la fibrina a la zona del daño presentaron interacción entre esta proteína y la colágena, presencia de células sobre la matriz fibrinosa y acercamiento de los bordes del daño (contracción); efecto que nunca se observó en las matrices puramente colagénicas. La explicación a este fenómeno puede estar dada con los resultados obtenidos del trabajo de Reyhani V y cols, donde observaron que en cultivos colagénicos tridimensionales adicionados con fibrina, ésta puede actuar como proteína de unión entre las

fibras de colágena tipo I y las células a través de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , promoviendo la contracción mediada por células de las estructuras colagénicas (Reyhani V et al .2014). Además, está reportado que los fibroblastos crecidos en monocapa presentan morfologías diferentes de acuerdo a la rigidez del sustrato en el que se encuentran, por ejemplo los fibroblastos que fueron crecidos en sustratos rígidos fueron más largos, expresaban la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , abundantes fibras de estrés citoplasmáticas y  $\alpha$ -SMA, en contraste con las células que crecieron en matrices más flexibles donde las células eran más cortas, expresaban la integrina  $\alpha_2\beta_1$  y presentaban microfilamentos finos sin  $\alpha$ -SMA. (Jones C, Ehrlich P. 2011). Lo anterior podría dar pie a la búsqueda de qué integrinas están siendo expresadas en nuestro sistema experimental, dado que, si bien las matrices que empleamos se encuentran relajadas, el hecho de haber realizado un daño podría haber modificado la tensión matricial y estimular cambios en la expresión de integrinas de manera local al daño.

Por otro lado, los fibroblastos son los responsables de sintetizar, organizar y mantener el tejido conjuntivo, tanto en el desarrollo, como al responder a un daño y en patologías fibrosantes (Kendall 2014). Para llevar a cabo esta importante tarea es necesario que interactúen las células con los componentes de la matriz extracelular, así como con proteínas de adhesión e integrinas. Cuando se crecen fibroblastos en matrices tridimensionales se puede obtener una respuesta de las células con su entorno matricial de una forma más cercana a la fisiológica. En la cicatrización un evento clave es el recambio de la matriz provisional por una definitiva, así como la maduración de ésta. En el recambio de la matriz debe de existir un balance entre la síntesis de proteínas de depósito, la expresión de enzimas MMPs entre otras y sus inhibidores TIMPs. Cuando ocurre un desbalance se llega a eventos fibróticos, como en las cicatrices hipertróficas o al desarrollo de heridas crónicas como las úlceras (Toriseva M, et al 2005).

En nuestros ensayos encontramos que los fibroblastos de los cultivos con fibrina producen más colágena en el día 5, mientras que la actividad de MMP-2 y 9 fue similar entre ambas condiciones. En la literatura está reportado que en presencia de colágena tipo I los fibroblastos de piel humana son capaces de activar la gelatinasa latente, proMMP-2, a su forma activa MMP-2 (Zigrino P, et al 2001) efecto que quedó patente en el análisis zimográfico donde se observa una relación directamente proporcional entre el tiempo y la actividad gelatinolítica.

El proceso de cicatrización es un sistema muy complejo de interacciones celulares y humorales. Los estudios *in vivo* han arrojado información sumamente valiosa para entender al proceso, sin embargo, la cantidad de variables presentes en un organismo dificulta la contribución e interacción particular de los elementos vivos y matriciales. Por su parte, los modelos tridimensionales *in vitro* ofrecen una alternativa para aislar una etapa específica de cada proceso, donde los cultivos colagénicos tridimensionales de fibroblastos representan un modelo útil para estudiar las características funcionales (morfología, síntesis de proteínas, expresión de enzimas) y biomecánicas (contracción). En nuestro modelo pretendimos simular la etapa inicial de una lesión incisional y conseguimos que se afrontaran los bordes del daño a través de la interfase de fibrina, que posteriormente fue digerida hasta dejar solamente el ambiente colagénico. Ahí pudimos apreciar cómo las células interactúan con la fibrina que subsecuentemente es remodelada en la zona del defecto. Con respecto al sistema total, no fue posible encontrar diferencias significativas al medir el recambio de la colágena a través de las MMPs en los sobrenadantes del cultivo. En conclusión, el modelo es funcional y permite que en una etapa posterior de estudio se pueda identificar la expresión y localización de las integrinas y los inhibidores de MMPs. En cuanto al modelo en general se podría variar el tipo celular, por ejemplo, se pueden agregar fibroblastos de cicatriz hipertrófica, o agregar queratinocitos en la parte superficial, obteniendo un cocultivo tridimensional donde se aborde el estudio de las interacciones fibroblasto-queratinocito-matriz extracelular.

## LITERATURA CITADA

Sonnemann K, Bement W. Wound Repair: Toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011 jun;27:237-63.

Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014 may; 1-8.

Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.* 2006;4:932-9.

Collen D, Lijnen HR. Fibrin-specific fibrinolysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec 17;667 (1):259-271.

Giorgio-Miller A, Bottoms S, Laurent G, Carmeliet P, Herrick S. Fibrin –induced skin fibrosis in mice deficient in tissue plasminogen activator. *Am J Pathol.* 2005 Sep;167(3):721-732.

Gray AJ, Reeves JT, Harrison NK, Winlove P, Laurent GF. Growth factors for human fibroblasts in the solute remaining after clot formation. *J Cell Sci.* 1990;96:271-274.

Li B, Wang J. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability.* 2011Nov;20(4):108-20.

Clark R. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:355-67.

Werner S, Krieg T, Hans S. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127:998-1008.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:786-801.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008 May15; 453(7193):314-21.

Satish L, Kathju S. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. *Dermatol Res Pract*. 2010 Dec;1-11.

Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49:35-43.

Galagovsky L, Adúriz-Bravo A. Modelos y analogías en la enseñanza de las ciencias naturales. El concepto de modelo didáctico analógico. *Enseñanza de las ciencias*. 2001; 19(2)231-242.

Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:1274-78.

Dallon J, Ehrlich P. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wond Rep Reg* 2008;16: 472-79.

Liang C. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc*. 2007;2:329-33.

Mark A. Carlson MD, Longaker M. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Rep Reg*. 2004 march;12(2):134-147.

Montesano R, Orci L. Transforming growth factor B stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85:4894-97.

Kuhn MA, Smith PD, Hill DP, Ko F, Meltzer DD, Vande Berge JS, Robson MC. *et al*. *In vitro* fibroblast populated collagen lattices are not good models of *in vivo* clinical wound healing. *Wond Rep Reg*. 2000;8:270-76.

Grinnell F, Petroll MW. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:335-61.

Miller CC, Septier D, Bonnefoix M, Lecolle S, Lebreton-Decoster C, Coulomb, Pellat B, Godeau G. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clin Oral Invest.* 2002; 6:39-50.

Brown RA. In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models?. *Exp Cell Res.* 2013; 16:2460-9.

Ehrlich PH, Rajaratnam JBM. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell.* 1990; 22(4):407-17.

Freshney RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* Wiley-Liss 2005

Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961 May; 93:440-7.

Bell E, Ivarsson, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 Mar;76(3):1274-78.

Mosmann Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005; 38(1):73-83.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003 jul; 200(4):500-3.

Koolwijk P, deMaat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:932-9.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier CHC, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat rev Mol cell Biol.* 2002 may; 3:349-63.

Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their Inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem cell Biol.* 2008 Oct 26; 40:(6-7)1334-47.

Schultz GS, Davidson MJ, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regen.* 2011 Mar; 19(2):134-148.

Farahani MR, Kloth LC. The hypothesis of "biophysical matrix contraction": wound contraction revisited. *Int Wound J.* 2008;5:477-82.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005 Jan13;(1):7-12.

Ehrlich HP, Hunt TK. Collagen organization critical role in wound contraction. *Adv Wound care (New Rochelle).* 2012 Feb;1(1)3-9.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat rev Mol cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.

Ehrlich HP. Wound close: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye (Lond).* 1988;2:149-57.

Tomasek JJ, Haaksma CJ, Schwartz J, Howard EW. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Rep Reg.* 2013; 21:166-76.

Grinnell F. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends Cell Biol.* 2000 Sep;10(9):362-5.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003 May; 13(5):264-69.

Reyhani V, Seddigh P, Guss B, Gustafsson R, Lars R, Kristofer. Fibrin binds to collagen and provides a bridge for  $\alpha V\beta 3$  integrin-dependent contraction of collagen gels. *Biochem J.* 2014 Aug 15; 462(1):113-123.

Jones C, Ehrlich HP. Fibroblast expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha 2\beta 1$  integrin and  $\alpha v\beta 3$  integrin: influence of surface rigidity. *Exp Mol Pathol.* 2011 Aug; 91(1):394-399.

Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014 May; 5:1-13.

Toriseva M, Ala-aho R, Karvinen J, Baker A, Marjomäki HJ, Kähäri V. Collagenase-3 (MMP-13) enhances remodeling of three-dimensional collagen and promotes survival of human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2007 Jan; 127(1):49-59.

Zigrino P, Drescher C, Mauch C. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Eur J Cell Biol.* 2001 Jan; 80(1):68-77.

## ANEXO

En el presente anexo se presenta la preparación de las soluciones para evidenciar la actividad de las gelatinasas MMP-2 Y 9.

### Preparación de soluciones para el zimograma

#### Gel separador 7.5%

Acilamida 30%, Bis 1%	2.5	ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5	ml
SDS 10%	100.3	µl
Gelatina 1%	2	ml
Agua destilada	2.8	ml
Persulfato de Amonio 10%	22.3	µl
TEMED	11.5	µl

#### Gel Concentrador 4%

Acilamida/ Bis (30%/ 1%)	1.3	ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	2.5	ml
Agua destilada	6	ml
SDS 10%	200	µl
Persulfato de Amonio 10%	50	µl
TEMED	10	µl

#### Amortiguador de Corrida 5X pH 8.3

Tris base	15gr
Glicina	72gr
SDS	5gr

Ajustar a pH 8.3 y llevar a 1L con agua destilada

#### Buffer de incubación CaCl<sub>2</sub>

Tris-Hcl	6.057gr
Cacl <sub>2</sub>	0.735gr

Ajustar a 1L con agua destilada.

#### Solución de teñido Coomassie al 2.5%

Azul brillante de Coomassie	0.25 gr
Metanol	50 ml
Ácido acético	10 ml
Agua destilada	40 ml

### **Solución desteñidora**

Metanol	20 ml
Ácido acético	10 ml
Agua destilada	70 ml