

# Obtención de andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio

**Carlos Figueroa Hernández**

correo electrónico: carlosrfh@tesla.cujae.edu.cu

Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Cujae, La Habana, Cuba

**Artículo de Reflexión**

**Reyniel Gómez González**

correo electrónico: reyniel@dcrhmail.cujae.edu.cu

Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Cujae, La Habana, Cuba

**Juan Prohías Martínez**

correo electrónico: prohias@infomed.sld.cu

Hospital Hermanos Ameijeiras. La Habana, Cuba

**Lídice Pascual Expósito**

correo electrónico: lidicep@uclv.edu.cu

Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba

## Resumen

En el presente trabajo se muestra una actualización en el desarrollo de colágenos para la fabricación de matrices o andamios (*scaffolds*), empleados en la restauración de tejidos. Los pasos para obtener *scaffolds* de colágeno entre los que se encuentran, la separación, solubilización en ácido, purificación, precipitación, liofilización y fibrillogénesis son descritos. Se mencionan además las fuentes de obtención de colágenos Tipo I, entre las que se encuentran la piel y tendones de mamíferos, peces y aves. Los métodos de caracterización físico-química como, la electroforesis, la microscopía electrónica de barrido, la microscopía de fuerza atómica, la espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FT-IR), la termogravimetría y los ensayos mecánicos también son descritos. Estas pruebas permiten conocer el comportamiento de los *scaffolds*. La aplicación de enlaces cruzados para estabilizar el colágeno fue objeto de atención en el presente trabajo. Se hace hincapié en las limitaciones que se presentan durante las terapias celulares y en la restauración del tejido del miocardio utilizando andamios, cuestiones que constituyen un reto a superar por la ingeniería de tejidos.

Palabras claves: velocidad básica, vientos extremos, normas de viento

Recibido: 4 de junio del 2015      Aprobado: 3 de octubre del 2016

## INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa tienen un carácter interdisciplinario, que permite dar solución a la reparación de tejidos basado en el uso de andamios con células madres [1, 2, 3, 4]. El andamio no puede actuar solamente como un soporte, el mismo debe permitir el crecimiento y la proliferación celular facilitando el proceso de regeneración [5, 6]. En la actualidad los científicos todavía enfrentan desafíos para obtener andamios multifuncionales y resolver problemas de

vascularización, regeneración de nervios, acoplamiento electromecánico, propiedades estructurales, mecánicas y electrofisiológicas que permitan una mejor función contráctil de los cardiomiocitos y del corazón [7, 8, 9, 10].

Un andamio ideal debe ser biocompatible, biodegradable, promover interacción celular, desarrollar los tejidos y mostrar propiedades físicas y mecánicas compatibles con los requerimientos del tejido que será regenerado. Los andamios deben tener una estructura con una porosidad, interconectividad y distribución de tamaño de

poro adecuada, además de propiedades mecánicas que permitan el funcionamiento de los mismos [11, 12].

Los polímeros de origen natural han sido ampliamente utilizados en la fabricación de andamios, tal es el caso de los colágenos, los cuales tienen una naturaleza proteica. Estas estructuras moleculares pueden simular la matriz extracelular y dirigir el crecimiento, migración y orientación de las células durante los procesos de regeneración, constituyendo el colágeno una fuente importante para la restauración del tejido del miocardio, sobre todo porque este polímero tiene baja inmunogenesidad y es biodegradable [13, 14].

El presente trabajo tiene como objetivos fundamentales mostrar los procedimientos utilizados por diferentes autores en la obtención de andamios de colágenos, las técnicas que son empleadas para caracterizarlos y destacar las deficiencias que aparecen en la aplicación de terapias para la regeneración del tejido del miocardio [15,16].

## **UTILIZACIÓN DE COLÁGENOS PARA LA FABRICACIÓN DE MATRICES (ANDAMIOS) Y SU APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS**

Los andamios para la restauración del miocardio deben estar constituidos de una matriz extracelular basada en colágeno u otro polímero de origen sintético [17], los cuales pueden garantizar las propiedades físicas y biológicas para replicar exactamente el microambiente requerido para restablecer las funciones originales del tejido.

La idea fundamental sobre la cual se prepara dicha matriz consiste en la relación biológica que existe entre función, estructura y propiedades del andamio. Tanto la macro como la microestructura necesitan ser controladas. La geometría y los factores topológicos que son modificados por la macro y la microestructura pueden afectar la adhesión y el movimiento celular. Por eso la matriz de colágeno necesariamente debe tener una estructura cuaternaria, formada de varias cadenas polipeptídicas para regenerar y remodelar el tejido nativo [18, 19, 20].

Para obtener las matrices o andamios existe una variedad de técnicas de procesamiento, las cuales han sido reportadas en la literatura. Estas estructuras pueden ser obtenidas por liofilizado [21, 22, 23], lixiviación de partículas, moldeado por compresión, moldeado por inyección, extrusión, espumado, electrohilado, entre otras [11, 24]. En todos los casos se requiere obtener una arquitectura porosa con diámetro entre 20 y 150  $\mu\text{m}$  e interconectividad total. En el caso de utilizar fibras, las mismas deben estar orientadas de forma tal que garanticen la adhesión, la proliferación celular, la circulación de nutrientes y los procesos de angiogénesis o vascularización [25, 26, 27].

En el caso específico de la restauración del miocardio utilizando andamios de colágeno, la estructura del mismo actuaría como soporte de células para inducir la restauración de las propiedades electromecánicas y fisiológicas del tejido del propio miocardio luego de ocurrir un infarto.

La estructura porosa del andamio puede ser modificada variando el origen del colágeno Tipo I, ya sea tendón, piel o mucosa intestinal. Este tipo de colágeno ocupa el 80 % del tejido cardíaco y constituye el andamio estructural de los cardiomiocitos [5, 16]. Otra manera de modificar la estructura porosa del andamio consiste en variar la velocidad y temperatura de congelación durante el proceso de liofilización del colágeno [24].

La resistencia mecánica de las matrices de colágeno se puede incrementar utilizando enlaces cruzados que eleven la estabilidad de las cadenas polipeptídicas. Esto puede provocar que disminuya la biodegradabilidad del biomaterial y se incremente la citotoxicidad, por lo que es un procedimiento que debe ser evaluado convenientemente [19, 28, 29].

## **FUENTES DE OBTENCIÓN DE LOS COLÁGENOS**

La principal fuente de extracción de colágeno es de los residuos de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo [13, 23, 24, 28]. En otras investigaciones se ha obtenido colágeno Tipo I a partir de las crestas del pollo, también se pueden utilizar los miembros inferiores de estas aves [15, 30]. Otros autores refieren también el uso del colágeno de tendón de cabra y piel de la tortuga [16, 19].

Otras alternativas para la obtención de colágeno y evitar la transmisión de algunos tipos de enfermedades de los mamíferos son los que se pueden obtener del medio acuático, entre estas se encuentran la piel, huesos y escamas de pescado. En este sentido se han realizado diferentes estudios para evaluar las propiedades funcionales del colágeno de origen de piel de pescado, tanto de agua dulce como salada [14, 21, 22].

Para las aplicaciones en la restauración del tejido del miocardio se prefiere las fuentes que proporcionen colágeno Tipo I debido a su prevalencia en el corazón. En este caso se evalúa la posibilidad de utilizar la piel, tendones, mucosa intestinal de algunos mamíferos y la piel de los peces.

## **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS COLÁGENOS**

El procedimiento para la obtención de matrices de colágeno desde cualquier tipo de fuente de origen tiene de forma general las mismas etapas.

### Selección de la materia prima

La selección de la materia prima o las fuentes de origen de los colágenos para la obtención de las matrices reviste gran importancia. Como se explicaba anteriormente, el origen puede ser múltiple, aunque se prefiere hacer la selección de una sola especie: aves, mamíferos o peces. Esta selección está en función del tipo de colágeno que se requiere en el andamio. Para la aplicación en la restauración del miocardio se debe utilizar del Tipo I considerando que el mismo es el que predomina en el tejido cardíaco [15, 21].

### Preparación de la materia prima

Esta etapa incluye la limpieza a través de un lavado, separación de las partes del animal, reducción del tamaño por corte o desmenuzando de las muestras. La reducción del tamaño de estos compuestos facilitaría la acción del ácido durante el proceso de solubilización [15, 21, 22].

En el caso de las pieles, estas se cortan en pequeños trozos de 1 cm<sup>2</sup> o 0,5 cm<sup>2</sup>, para después ser desinfectadas con metanol y cloroformo [22, 31].

### Eliminación de grasas

Para eliminar las grasas y pigmentos presente en las pieles es posible emplear detergentes, pero debido a que estos dejan residuos químicos en el producto, su difícil recuperación y altos costos, se recomienda el uso de alcoholes de bajo peso molecular (butílico o etanol) y peróxido respectivamente [21, 22].

### Eliminación de proteínas no colagénicas

Un método común para eliminar las proteínas no colagénicas es el uso del hidróxido de sodio (NaOH), el cual hidroliza las proteínas permitiendo su eliminación con lavados posteriores. La efectividad depende del tiempo, la temperatura y concentración de la solución de NaOH. También se propone el uso del cloruro de sodio (NaCl), además del NaOH para remover las proteínas que no están en el colágeno. El control de esta etapa debe ser cuidadoso debido a que el hidróxido de sodio puede hidrolizar el colágeno presente en las pieles [22, 23].

### Solubilización

La solubilización se realiza en ácido acético 0,5 M a 4 °C. La suspensión se centrifuga a 10 000xg (gravidades) durante 30 min., para eliminar los residuos [19, 21]. El proceso de solubilización también puede ser realizado totalmente con pepsina [21, 24]. La pepsina hidroliza la proteína para que siendo una molécula más pequeña se solubilice, aunque puede desnaturalizarla. Por esta razón es ampliamente utilizado el ácido acético en lugar de la pepsina [15, 22].

### Digestión de los telopéptidos

La digestión de los telopéptidos se hace con pepsina añadida en una concentración de 30 mg/l y agitada suavemente por 48 h. Al eliminar los telopéptidos, el colágeno resulta menos antígeno, más puro y con mejores posibilidades para ser utilizado como biomaterial [19, 24].

### Recuperación del colágeno

En esta etapa varios autores [15, 16, 21, 22, 32] utilizan parámetros de recuperación del colágeno con valores

similares. El mismo se recupera de la solución ácida precipitándolo con una solución de cloruro de sodio a un pH determinado. Esto ocurre gracias a las cargas iónicas que esta sal proporciona a la proteína permitiendo su precipitación. El colágeno en la solución se precipita añadiendo NaCl 5 %. El precipitado resultante es disuelto en ácido acético 0,5 M y ultracentrifugado a 100 000xg durante 60 min., para eliminar los microresiduos, dializado de nuevo con agua desionizada para eliminar los iones cloruro y sodio y finalmente liofilizado. Todos los reportes indican que la temperatura de trabajo es 4 °C.

## MÉTODOS PARA OBTENER MATRICES (ANDAMIOS) DE COLÁGENO

### Liofilizado

Este procedimiento incluye la formación de cristales de hielo dentro de la solución de colágeno durante la congelación que se realiza entre -20 y -45 °C, estos cristales actúan como agentes porogénicos en la etapa de secado al vacío, resultando finalmente un andamio poroso tridimensional. La sublimación se realiza a 0o durante 24 h utilizando presiones de 0,1 Mbar [15, 28].

Por otro lado ha sido demostrada la influencia del origen del colágeno en las dimensiones de los poros. La estructura obtenida desde un colágeno de tortuga y otro de origen bovino se diferencian sustancialmente. El autor [16] muestra a partir de un proceso de liofilización la influencia del origen del colágeno en las dimensiones de los poros. En el caso del tendón de cabra estos tienen diámetros entre 50-80 µm y para la piel de bovino 20-60 µm.

### Fibrillogénesis

La construcción de la matriz extracelular artificial utilizando colágeno como material base debe hacerse en primer lugar, con la preparación de un material formado por fibras. La geometría o tipología que aparecen producto de la macro y microestructura pueden afectar la adhesión celular y su movimiento in vivo, por eso es necesaria la preparación de una estructura apropiada a partir de un proceso de fibrillogénesis. La adición de 0,9 % en peso de NaCl/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en una solución acuosa de colágeno activa la fibrillogénesis [13, 19]. En la figura 1 se puede apreciar un esquema de la formación de fibrillas en los geles de colágeno.

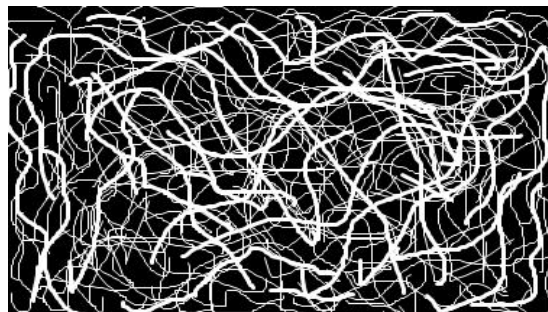


Fig. 1. Esquema de las fibrillas en geles de colágeno.



## TÉCNICAS Y PARÁMETROS A CARACTERIZAR EN LAS MATRICES DE COLÁGENO

Existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para caracterizar los andamios de colágeno, estas permiten determinar los rasgos morfológicos, la pureza, la composición química, estructura direccional y propiedades mecánicas entre otras. Con una buena caracterización y un buen conocimiento de la muestra es fácil prever una respuesta biológica deseada y relacionar los resultados con las características de la estructura producida [33, 34].

### Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Diferentes autores muestran el empleo de esta técnica para caracterizar colágenos [15, 16, 19, 21]. Con la electroforesis en gel, las proteínas y sus partes pueden ser separadas sobre la base de su tamaño. Es posible observar los fragmentos por muestras de proteínas en partes bien pequeñas de gel, las cuales bajo una carga de campo eléctrico aplicado viajan a través de la matriz de gel en dependencia de su tamaño. Las grandes quedan atrapadas en la red del gel. Esto permite comparar las muestras analizadas con colágenos obtenidos de otras fuentes tomados como referencia.

### Determinación de la composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos puede ser determinada por un analizador de aminoácidos, utilizando una columna de intercambio catiónico. Después de la derivación poscolumna con nihidrina, la prolina y la hidroxiprolina se pueden determinar utilizando una longitud de onda específica. La cuantificación de estos se lleva a cabo con un aminoácido estándar como referencia. El contenido de aminoácidos puede ser expresado por el número de residuos/1 000 unidades [19].

La composición de los aminoácidos que puede ser determinada es la siguiente: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, hidroxilisina, lisina, histidina, arginina, hidroxiprolina y prolina [19]. El contenido de colágeno en la muestra es igual al contenido de hidroxiprolina multiplicado por 7,46 [22].

### Determinación de la temperatura de desnaturalización

La temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de los colágenos es importante tenerla en consideración para conocer su influencia en la estructura y en las aplicaciones biomédicas. La misma permite conocer la estabilidad del colágeno con el incremento de la temperatura y se puede medir por el análisis óptico rotacional. A la muestra liofilizada se le añaden a 100 ml de HCl diluido (pH 3) a una concentración de 5 mg/ml y se agita durante 12 h a 4 °C, dando una solución de colágeno. El análisis óptico rotacional se mide en un polarímetro con un incremento

paso a paso de la temperatura, la cual se mantiene por 5 min., en cada paso (1 °C). La temperatura donde el cambio en rotación fue la mitad del máximo valor es tomada como la  $T_d$  [16, 19, 21, 22].

### Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica permite investigar e identificar la composición química de una muestra, del mismo modo la presencia de colágenos y eventualmente sus diferentes tipos. Mediante esta se puede conocer la diferencia entre los colágenos que son tratados con pepsina y aquellos que no lo son [14, 19, 21].

### Caracterización morfológica de las matrices de colágeno

Para caracterizar los rasgos morfológicos se utilizan la microscopía electrónica de barrido, la microscopía de transmisión y la microscopía de fuerza atómica. Estas son técnicas poderosas para adquirir imágenes de las muestras de colágeno y conocer la presencia y organización de las fibrillas [13, 16, 19].

Las fibrillas de colágeno se pueden observar mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio de fuerza atómica (MFA), también los poros de pequeño tamaño estructurados por el entramado de las fibras de colágenos pueden ser identificados. Se recomienda utilizar para el MFA un microcantilévver de silicio. El MEB puede indicar el éxito en la preparación del gel de colágeno fibrilado. Esta técnica requiere del deshidratado y secado de los geles de colágeno y su recubrimiento con oro a través de un emisor de iones y se opera entre 5 y 15 KV con magnificaciones de 10 000 a 30 000X [27, 34].

### Control de la fibrillogénesis del colágeno

La fibrillogénesis del colágeno se puede monitorear por el cambio de turbidez utilizando un espectrofotómetro. La formación de las fibrillas resultantes es monitoreada por la absorbancia a una determinada longitud de onda. El cambio de turbidez ocurre a una determinada longitud de onda. La temperatura óptima para la fibrillogénesis varía dependiendo de la  $T_d$  del colágeno [19].

### Evaluación de la resistencia mecánica

El andamio debe tener resistencia a la compresión y mantener un adecuado espacio vital para que las células que se adhieren al mismo puedan proliferar [24].

El comportamiento mecánico a la compresión de las matrices de colágeno se puede determinar utilizando una máquina universal de ensayos mecánicos (tracción-compresión-fatiga). Las muestras se comprimen a una velocidad de 0,05 a 0,1 mm/s. La deformación unitaria se determina como la razón de deformación respecto a la altura inicial de las probetas [13, 17]. Con los resultados de este tipo de ensayo se construyen las curvas de tensión deformación y se calcula el módulo de elasticidad del andamio o matriz colagénica.

### Crecimiento y proliferación celular

La caracterización biológica permite hacer una evaluación de la biocompatibilidad del colágeno en

presencia de las células y con esto conocer de antemano el futuro comportamiento del tejido al ser implantado.

El crecimiento celular puede ser evaluado midiendo el contenido de ADN de las células y utilizando la microscopía electrónica de barrido [16, 19]. Después que los geles de colágeno son digeridos con colagenasa a 37 °C por 3 h, la suspensión de las células se centrifuga por 5 min. Las células son lisiadas y colocadas en una solución a la temperatura ambiente protegidas de la luz. La intensidad de la emisión fluorescente excitada a 485 nm de la muestra se mide a 535 nm utilizando un espectrofotómetro. En la figura 2 se puede apreciar el esquema de la proliferación celular sobre las fibrillas de colágeno.

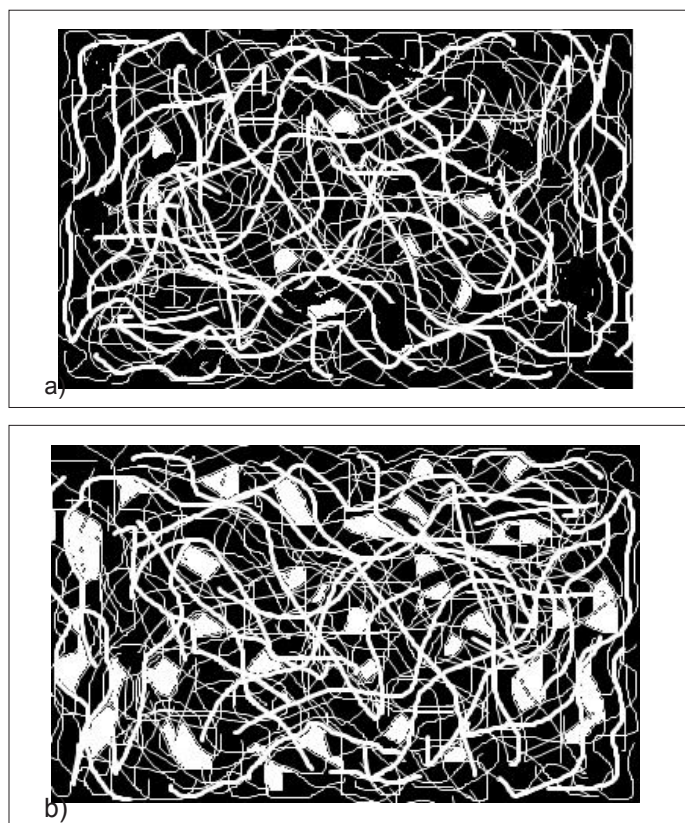


Fig. 2. Esquema de la proliferación celular sobre las fibrillas de colágeno: a) etapa inicial; b) etapa final.

#### Ensayo de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua del colágeno se determina midiendo el índice de hinchamiento (*swelling*) en agua a 37 °C. Una masa de colágeno previamente conocida se coloca en agua, después de 24 h. de incubación se determina la masa húmeda. El índice de swelling ( $W_{sw}$ ) se determina con la expresión siguiente (1).

$$W_{sw} = ((W_{24h} - W_o) / W_o) \quad (1)$$

donde:

$W_{24h}$ : Masa del *scaffold* después de 24 h. de incubación.  
 $W_o$ : Masa inicial del *scaffold* [16, 31].

#### Biodegradación de los andamios

La biodegradación del *scaffold* se estudia exponiéndolo a un ambiente bacteriano (colagenasa bacteriana Tipo I) con solución búfer salina a 37 °C. La biodegradación se puede calcular en porcentaje de pérdida de masa utilizando la fórmula siguiente (2).

$$((W_o - W_n) / W_o) \cdot 100 \quad (2)$$

donde:

$W_n$ : Masa seca del *scaffold* después de  $n$  horas de incubación en solución búfer salina.

$W_o$ : Masa inicial [16].

#### PRINCIPALES LIMITACIONES DURANTE LAS TERAPIAS DE REGENERACIÓN DEL MIOCARDIO

Durante las terapias celulares empleadas en la regeneración del miocardio, un grupo de autores han reportado limitaciones importantes, las cuales han motivado estudiar el tema y proponer nuevos diseños experimentales. A continuación se muestran las más significativas.

En los procedimientos sin el empleo del andamio (*scaffold*) las células implantadas no colonizan más que la superficie o unos pocos micrómetros de espesor, no lográndose el restablecimiento total de la zona dañada. Por otro parte la supervivencia de las células en ocasiones es limitada [18, 35, 36].

La estructura geométrica y morfológica de los andamios no siempre permite mantener un flujo permanente de nutrientes y oxígeno entre las células dispuestas en su interior y el microambiente que las rodea, lo que no contribuye a facilitar una migración eficaz y la supervivencia dentro del tejido isquémico [37, 38, 39].

El tejido cardíaco no siempre reproduce las propiedades estructurales, mecánicas y electrofisiológicas óptimas para mantener viables las células trasplantadas. Esto evita que se logre de manera efectiva el acoplamiento electromecánico entre el tejido huésped y el receptor [40, 41, 42, 43, 44].

Los problemas anteriormente identificados muestran la necesidad de crear un andamio que luego de ser poblado con las células adecuadas permita establecer un acoplamiento celular electromecánico, una función contráctil estable y una vascularización funcional del corazón [45, 46, 47, 48, 49, 50].

#### CONCLUSIONES

Los procesos de extracción y purificación de colágenos para fabricar los andamios, independientemente del origen de la materia primaria tienen similitud en los procedimientos utilizados, siendo la fibrillogénesis una condición necesaria para construir matrices de colágeno,

esta permite la creación de una estructura cuaternaria garantizando la adhesión celular.

En las terapias regenerativas utilizadas en la restauración del miocardio existen limitantes, entre estas se destacan, la falta de un acoplamiento celular electromecánico, una función contráctil estable y una vascularización funcional del corazón.

La estructura porosa del andamio de colágeno constituye el soporte celular que facilita la inducción del proceso de restauración del tejido del miocardio, garantizando las propiedades mecánicas y electrofisiológicas del corazón después del infarto. Una modificación de esta estructura permitiría una mejora de las propiedades y funciones antes mencionadas.

## REFERENCIAS

1. **CHANJUAN, Dong; YONGGANG, Lv.** "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives". *Polymers*. February 2016, vol. 8, núm. 42, pp. 1-20. ISSN: 2073-4360. Disponible en Web: <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/2/42/htm> [consultado enero 2016].
2. **WICKHAM, A.** *Multifunctional biomimetic scaffolds tailored for cardiac regeneration*. Printed in Sweden by LiU-Tryck, 2015, 80 pp. ISBN: 978-91-7519-021-1. Disponible en Web: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:848329/COVER01.pdf> [consultado enero 2016].
3. **FERDOUS, Khan; MASARU, Tanaka; SHEIKH RAFI, Ahmad.** "Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices". *Journal of Materials Chemistry B*. 2015, vol. 3, pp. 8224-8249. ISSN: 2050-750. Disponible en Web: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/TB/C5TB01370D> [consultado febrero 2016].
4. **GAVIRA GÓMEZ, Juan José; GARCÍA DE YÉBENES CASTRO, Manuel et. al.** "Efecto del implante epicárdico de matrices de colágeno con o sin células madre derivadas del tejido adiposo en un modelo experimental porcino de infarto de miocardio". *Revista Española de Cardiología* 66. 2013. Supl 1:350. 4045-6. ISSN: 1885-5857. Disponible en Web: <http://www.revespcardiolog.org/controladores/congresos-herramientas.p?idCongreso=5&idSesion=608&idComunicacion=5453> [Consultado abril 2016].
5. **CHACHQUES, Juan Carlos; HERREROS, Jesús.** "Ingeniería tisular y miocardio bioartificial". *Cirugía Cardiovascular*, julio-septiembre 2011, vol. 18, núm. 3, pp. 217-224. ISSN: 1134-0096. Disponible en Web: <http://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-cardiovascular-358-articulo-ingeneria-tisular-miocardio-bioartificial-S1134009611700572> [Consultado agosto 2016].
6. **SHIAO-WEN, Tsai; HAU-MIN, Liou et. al.** "MG63 Osteoblast-Like Cells Exhibit Different Behavior when Grown on Electrospun Collagen Matrix versus Electrospun Gelatin Matrix". *PLoS ONE*. February 2012, vol. 7, pp. 1-11. ISSN 1932-6203. Disponible en Web: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031200> [Consultado agosto 2016].
7. **SINGH, Deepti; SINGH, Dolly.** "Macroporous matrix for cartilage tissue engineering" *Research communications*. Current Science. March 2013, vol. 104, núm. 5, pp. 622-626. ISSN: 0011-3891. Disponible en Web: <http://www.currentscience.ac.in/Volumes/104/05/0622.pdf> [Consultado agosto 2016].
8. **RODRIGUEZ, Marita L.; GRAHAM, Brandon T.** "Measuring the Contractile Forces of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes With Arrays of Microposts". *Journal of Biomechanical Engineering*. May 2014, vol.136/051005-1-10, pp. 1-10. ISSN: 0148-0731. Disponible en Web: [http://faculty.washington.edu/nsniadec/pdf/29\\_Rodriguez\\_JBME2014.pdf](http://faculty.washington.edu/nsniadec/pdf/29_Rodriguez_JBME2014.pdf) [Consultado junio 2016].
9. **BONAFEDE, Roberto J.; VALLÉS, Roberto Sergio.** "Cardiomioplante autólogo de células madre de médula ósea en territorios miocárdicos necróticos" *Insuficiencia cardíaca*. 2013, vol. 8, núm. 4, pp157-164. ISSN: 1850-1044. Disponible en Web: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ic/v8n4/v8n4a03.pdf> [Consultado junio 2016].
10. **LI, Xiaorong; ZHANG, Fengxiang.** "Intramyocardial injection of pig pluripotent stem cells improves left ventricular function and perfusion: A study in a porcine model of acute myocardial infarction". *PLOS ONE*. June 2013, vol. 8, pp. 1-12. ISSN: 1932-6203. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689724/pdf/pone.0066688.pdf> [Consultado agosto 2016].
11. **DUARTE, Ana Rita; SANTO, Víctor E. et. al.** "Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine". *The Journal of Supercritical Fluids*. July 2013, vol. 79, pp. 177-185. ISSN: 0896-8446. Disponible en Web: [www.3bs.uminho.pt/.../17450-review%20JSUPFLU%202013.pdf](http://www.3bs.uminho.pt/.../17450-review%20JSUPFLU%202013.pdf) [Consultado julio 2016].
12. **MADDEN, Luran R.; MORTISEN, Derek J.** "Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering". *Medical Science*. August 24, 2010, vol. 107.núm. 34, pp. 15211-15216. ISSN: 2076-3271. Disponible en Web: <http://www.pnas.org/content/107/34/15211.full.pdf> [Consultado septiembre 2016].
13. **NAM, Kwangwoo; SAKAI, Yuuki et. al.** "Engineering a collagen matrix that replicates the biological properties



- of native extracellular matrix". *Journal of Biomaterials Science*. 2011, vol. 22, pp. 1963–1982. ISSN: 1568-5624. Disponible en Web: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1163/092050610X529182> [Consultado mayo 2016].
14. **CASTRO PIEDRA, Silvia; CALVO CASTRO, Laura A. et. al.** "Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas: evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos" *Tecnología en Marcha, Edición especial Ingeniería de Tejidos* 60. 2015, pp.58-68. ISSN: 0379-3982. Disponible en Web: [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/2220/2015](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2220/2015) [Consultado septiembre 2016].
15. **CASTRO VARGAS, Christian David.** "Obtención de colágenos a partir de cresta de pollo". Director: Herminsul de Jesús Cano. Proyecto de grado, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias Básicas, Escuela de Química, 2012. Disponible en Web: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/478/2/145358.pdf> [Consultado agosto 2016].
16. **BANERJEE, Indranil; MISHRA, Debasish et. al.** "Caprine (Goat) Collagen: A Potential biomaterial for skin tissue engineering". *Journal of Biomaterials Science*. 2012, vol. 23, pp. 355–373. ISSN: 1568-5624. Disponible en Web: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/092050610X551943> [Consultado agosto 2016].
17. **DELAINE SMITH, Robin M.; NICOLA H., Green et. al.** "Monitoring Fibrous Scaffold Guidance of Three-Dimensional Collagen Organisation Using Minimally Invasive Second Harmonic Generation". *PLOS ONE*. February, 2014, vol. 9, pp. 1-14. ISSN: 1932-6203. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938545/pdf/pone.0089761.pdf> [Consultado septiembre 2016].
18. **KO, Kap; LEE, Sang Jin et. al.** "In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment". *Experimental & Molecular Medicine*. November 2013, vol. 45, pp. 2-11. ISSN: 1226-3613. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3849571/pdf/emm2013118a.pdf> [Consultado agosto 2016].
19. **NAGAI, N.; KOBAYASHI, H.** "Preparation and characterization of collagen from soft-shelled turtle (Pelodiscus Sinensis) skin for biomaterial applications". *Journal of Biomaterials Science*. 2009, vol. 20, pp. 567–576. ISSN: 1568-5624. Disponible en Web: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856209X426394> [Consultado mayo 2016].
20. **NURZYNSKA, Daria; PADIN IRUEGAS, Maria Elena. et. al.** "Application of biotechnology in myocardial regeneration-tissue engineering triad: cells, scaffolds, and signaling molecules". *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, pp. 1-3. ISSN: 2314-6133. Disponible en Web: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/236893/> [Consultado enero 2016].
21. **SILVA, Tiago H.; MOREIRA-SILVA, Joana.** "Marine origin collagens and its potential applications". *Marine Drugs*. 2014, vol. 12, pp. 5881-5901. ISSN: 1660-3397. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278207/pdf/marinedrugs-12-05881.pdf> [Consultado agosto 2016].
22. **CAROLINA SERRANO, Jenifer;** "Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de filete de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*)". Director: Mario Enríque Velásquez. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Bogotá, Colombia, 2011. Disponible en Web: [www.bdigital.unal.edu.co/4880/1/jenifercarolinasserranogaona.2011.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/1/jenifercarolinasserranogaona.2011.pdf) [Consultado agosto 2016].
23. **PARDO, Helena; FACCIO, Ricardo.** "Obtención de piel artificial de bajo costo". *Investigación aplicada – Desarrollo, Uruguay Ciencia*. 2011, núm. 13, pp. 20-22. ISSN: 1688- 3934. Disponible en Web: [www.uruguay-ciencia.com/articulos/UC13/Piel%20artificial%20UC%2013.pdf](http://www.uruguay-ciencia.com/articulos/UC13/Piel%20artificial%20UC%2013.pdf) [Consultado febrero 2016].
24. **RATNER, Buddy D.** *Biomaterials science*. San Diego. California. USA, 1996. 485 pp. ISBN: 0-12-582460-2. Disponible en Web: <http://www.efn.uncor.edu/escuelas/biomedica/Plandeestudios/materias%20completas/biomateriales/Biomaterials%20Science%20-%20An%20Introduction%20to%20Materials%20in%20Medici.pdf> [Consultado septiembre 2016].
25. **TONDON, Abhishek; KAUNAS, Roland.** "The direction of stretch induced cell and stress fiber orientation depends on collagen matrix stress". *PLOS ONE*. February 2014, vol. 9, pp. 1-10. ISSN: 1932-6203. Disponible en Web: <http://2015.biomaterials.org/sites/default/files/abstracts/141.pdf> [Consultado agosto 2016].
26. **CAÑAS, Ana Isabel; GARTNER, Carmiña.** "Preparación de soportes de quitosano-gelatina para su aplicación en la ingeniería de tejidos". *Revista Colombiana de Materiales*. 2014, núm. 5, pp. 21-27. ISSN: 2256-1013. Disponible en Web: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/materiales/article/view/19082/16474> [Consultado julio 2016].
27. **ARAÑA, Miriam; PEÑA, Estefanía et. al.** "Preparation and characterization of collagen based ADSC-carrier sheets for cardiovascular application". *Acta Biomaterialia*. 2013, núm. 9, pp. 6065-6083. ISSN: 1742-7061. Disponible en Web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112005995?np=y> [Consultado agosto 2016].

28. **HE, Zeqiang; XIONG, Lizhi.** "Evaluation of biological properties of collagen/hyaluronic acid composite scaffolds". *Polymers & Polymer Composites*. 2013, vol. 21, núm. 7, pp. 457-461. ISSN: 1478-2391. Disponible en Web: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=e1d29ba9-3d9a-4188-8138-47d99675720e%40sessionmgr103&vid=1&hid=118> [Consultado mayo 2016].
29. **MURPHY, Ciara M.; MCKIERNAN, Rossc C. et. al.** "Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds". *Tissue Engineering*. 2011. Part A, pp. 1-8. ISSN: 2152-4947. Disponible en Web: <http://www.tara.tcd.ie/bitstream/handle/2262/55329/Crosslinking%20and%20mechanical%20properties%20significantly%20influence%20cell%20attachment,%20proliferation,%20and%20migration%20within%20collagen%20glycosaminoglycan%20scaffolds.pdf?sequence=1> [Consultado junio 2016].
30. **LIU D., C.; LINK, Y. K.; CHEN, M. T.** "Optimum condition of extracting collagen from chicken feet and its characteristics". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2001, vol. 14, núm. 11, pp. 1638-1644. ISSN: 1011-2367. Disponible en Web: <http://ajas.info/upload/pdf/14-246.pdf> [Consultado abril 2016].
31. **CAPPUCCIO DE CASTRO, Karine; SILVA PRADO, Ivan et. al.** "Obtention and characterization of collagen and chitosan based cements for bone regeneration. Part 1: extraction and characterization of collagen". *Materials Science Forum*. 2014, vol. 775-776, pp. 29-33. ISSN: 0255-5476. Disponible en Web: [www.scientific.net/MSF.775-776.29](http://www.scientific.net/MSF.775-776.29) [Consultado septiembre 2016].
32. **ABRAHAM, L. C.; ZUENA, E. et. al.** "Guide to collagen characterization for biomaterial studies". *Journal of Biomaterials Research*. Part B. October 2008, vol. 87B, pp. 264-285. ISSN: 1552-4981. Disponible en Web: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.31078/epdf> [Consultado octubre 2016].
33. **KUNJALUKKALPADMANABHAN, Sanosh; GERVASO, Francesca et. al.** "Preparation and characterization of Collagen/hydroxyapatite microsphere composite scaffold for bone regeneration". *Key Engineering Materials*. 2014, vol. 587, pp. 239-244. ISSN: 1662-9795. Disponible en Web: [www.scientific.net/KEM.587.239](http://www.scientific.net/KEM.587.239) [Consultado septiembre 2016].
34. **CHAJRA, H.; ROUSSEAU, C. et. al.** "Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects" *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2008, vol. 18, pp. 33-45. ISSN: 0959-2989. Disponible en Web: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334722) [Consultado agosto 2016].
35. **GÁLVEZ MONTÓNA, Carolina; PRAT VIDALA, Cristina et. al.** "Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial". *Revista Española de Cardiología* 2013, vol. 66, núm. 5, pp. 391-399. ISSN: 0300-8932. Disponible en Web: <http://www.revespcardiol.org/es/ingenieria-tisular-cardiaca-corazon-bioartificial/articulo/90198747/> [Consultado septiembre 2016]
36. **TRAININI, J. C.; CHACHQUES, J. C.** "Asistencia miocárdica con matrices bioartificiales". *Revista Argentina de Cardiología*. 2006, vol. 74, pp. 401-405. ISSN: 1850-3748. Disponible en Web: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-37482006000600013](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-37482006000600013) [Consultado agosto 2016].
37. **SEPANTAFAR, Mohammadmajid; MAHERON-NAGHSH, Reihan et. al.** "Stem cells and injectable hydrogels: Synergistic therapeutics in myocardial repair". *Biotechnology Advances*. 2016, vol. 34, pp. 362-379. ISSN: 1134-0096. Disponible en Web: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975016300222](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975016300222) [Consultado marzo 2016]
38. **VUNJAK NOVAKOVIC, Gordana; ESCHENHAGEN, Thomas; MUMMERY, Christine.** "Myocardial tissue engineering: In vitro models". *Cold Spring Harbor Perspective Medicine*. August 2014, vol. 12, pp. 1-15. ISSN: 2157-1422. Disponible en Web: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/3/a014076.full> [Consultado marzo 2016]
39. **MASUMOTO, Hidetoshi; IKUNO, Takeshi et. al.** "Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration". *Scientific Reports* 4. 2014, núm. 6716, pp. 1-7. ISSN: 2045-2322. Disponible en Web: [www.nature.com/articles/srep06716](http://www.nature.com/articles/srep06716) [Consultado febrero 2016].
40. **JAWAD, Hedeer; LYON, Alex R. et. al.** HARDING, Sian E; ALI, Nadire. "Myocardial tissue engineering". *British Medical Bulletin*. 2008, vol. 87, núm. 1, pp. 31-47. ISSN: 0007-1420. Disponible en Web: <http://bmb.oxfordjournals.org/content/87/1/31.full> [Consultado mayo 2016].
41. **SHIBA, Yuji; FILICE, Dominic et. al.** "Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model" *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. Febrero 2014, vol. 19, núm. 4, pp. 368-381. ISSN: 1074-2484. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4127378/pdf/nihms570665.pdf> [Consultado enero 2016].
42. **ZHOU, Jin; SHU, Yao.** "The Spatiotemporal Development of Intercalated Disk in Three-Dimensional Engineered Heart Tissues Based on Collagen/Matrigel Matrix" *PLoS ONE*. November 2013, vol. 8, núm. 11, pp. 1-9. ISSN: 1932-6203. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3829928/pdf/pone.0081420.pdf> [Consultado agosto 2016].



43. **BLANPAIN DALEY, George Q.; HOCHEDLINGER, Konrad; PASSEGUÉ Emmanuelle.** "Stem cells assessed". *Nature Reviews | Molecular Cell Biology*. July 2012, vol.13, pp. 471-476. ISSN: 1471-0072. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678486> [Consultado agosto 2016].
44. **BARSLUND, Silvia Andrea; HONNORAT, Egle Vanesa.** "Aplicacion de stem cells en la regeneracion del miocardio insuficiente". *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*. Diciembre 2006, núm. 164, pp. 23-26. ISSN: 1515-8764. Disponible en Web: [http://med.unne.edu.ar/revista/revista164/7\\_164.pdf](http://med.unne.edu.ar/revista/revista164/7_164.pdf) [Consultado enero 2016].
45. **SUH, Carol Y.; WANG, Zelun et. al.** "Advancements in induced pluripotent stem cell technology for cardiac regenerative medicine". *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. March 2014, vol. 4, núm. 19, pp. 330-339. ISSN: 1074-2484. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169350/pdf/nihms586850.pdf> [Consultado septiembre 2016].
46. **HANEEF, Kanwal; LILA, Nermine et. al.** "Development of bioartificial myocardium by electrostimulation of 3D collagen scaffolds seeded with stem cells" *Heart International*. Jun 2012, vol. 7, núm. 2, pp. 70-76. ISSN: 1826-1868. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504306/pdf/hi-2012-2-e14.pdf> [Consultado agosto 2016].
47. **HUGHEY, Curtis C.; MA, Lianli et. al.** "Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: therapeutic potential for insulin resistance beyond the heart" *Cardiovascular Dialectology*. Sep. 2013, vol. 12, núm. 128, pp 1-14, ISSN: 1475-2840. Disponible en Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3847505/pdf/1475-2840-12-128.pdf> [Consultado octubre 2016].
48. **FERIC, Nicole T.; RADISIC, Milica.** "Strategies and challenges to myocardial replacement therapy". *Stemcells Translational Medicine*, 2016, vol. 5, pp. 410-416. ISSN: 2157-6564. Disponible en Web: <https://pdfs.semanticscholar.org/a903/90898697bf18c85a5d9396b1f23e-e203d120.pdf> [Consultado septiembre 2016].
49. **BOGOSLAVSKY LEVY, Andrea; FERRO, Marcelo; et. al.** "Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly". *Medicina* (Buenos Aires) 2012, vol. 72, núm. 3, pp. 216-220. ISSN: 0025-7680. Disponible en Web: <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/22763158.pdf> [Consultado julio 2016].
50. **MIKOL, Ramos; ZAMORA, Vanessa.** "Andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en bioconjugados colágeno-quitosano como potencial

biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos". *Revista del laboratorio tecnológico del uruguay innotec*, 2012, núm. 7, pp. 43-48. ISSN: 1688-6607. Disponible en Web: <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/viewFile/202/202> [Consultado octubre 2016].

## AUTORES

### Carlos Figueroa Hernández

Ingeniero Mecánico, Doctor en Ciencias Técnicas, Profesor Titular, Universidad Tecnológica de La Habana, José Antonio Echeverría, Cujae, La Habana, Cuba

### Reyniel Gómez González

Ingeniero Mecánico, Máster en Recursos Humanos, Profesor Asistente, Universidad Tecnológica de La Habana, José Antonio Echeverría, Cujae, La Habana, Cuba

### Juan Prohías Martínez

Doctor en Medicina, Profesor Auxiliar, Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba. Miembro de American College of Cardiology

### Lídice Pascual Expósito

Ingeniera Mecánica, Máster en Ciencias, Profesora Auxiliar, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Villa Clara, Cuba

## **Obtaining Collagen Scaffolds for the Restoration of Myocardium Tissue**

### **Abstract**

This paper shown an update in the development of collagens for the manufacture of scaffold which are used in tissue regeneration. The steps to obtain collagen scaffolds such as isolation, acid solubilization, purification, precipitation, lyophilization and fibrillogenesis were described. As collagen sources, which provide collagen, Type I such as skin and tendon of mammals, fish, and birds were mentioned. The physics-chemical characterization using several methods by electrophoresis analysis, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric and mechanical assay were described. These tests permits to know the behavior of scaffolds. Applied cross-link method to improve physically stabilized to collagen were explained. Emphasis is placed on the limitations encountered during cell therapies and on the restoration of myocardial tissue using scaffolding, which are a challenge to be overcome by tissue engineering.

Key words: scaffolds, collagen, myocardium, regeneration, tissue