

Obtención de andamios de colágeno de crestas de pollo y piel de cerdo para la reparación del sistema cardiovascular

Obtaining collagen scaffolds from chicken ridges and pigskin for the repairing of the cardiovascular system

Janet Carvajal de la Osa^{1,*}, Amanda Pacheco Leal², Yaimara Nuevo Artiles³, Carlos Rafael Figueroa Hernández¹, Reyniel Gómez González¹, Javier Luis Villegas Santos¹, Yunier Serrano Riverio⁴, Ahmed Valdés Martínez², Tania Rodríguez Moliner¹, Juan Prohías Martínez⁵, Yenisel Díaz Roller¹

¹ Universidad Tecnológica de la Habana. “José Antonio Echeverría”, CUJAE. Calle 114, # 11901, e/Ciclovía y Rotonda, Marianao. La Habana, Cuba.

² Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEAC). Kilómetro 11/2, Carretera de San Antonio, Valle Grande, La Lisa. La Habana, Cuba.

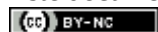
³ Centro Nacional de Electromedicina (CNE). Avenida 1ra e/Calle 36 y 36. La Habana, Cuba.

⁴ Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Avenida 25 y 158. No. 15202. Cubanacan, Playa. La Habana, Cuba.

⁵ Cardiocentro Hospital Hermanos Ameijeiras. San Lázaro No. 701. La Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia: janetco@automatica.cujae.edu.cu

Este documento posee una [licencia Creative Commons Reconocimiento/No Comercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)



Recibido: 23 abril 2021 **Aceptado:** 17 mayo 2021 **Publicado:** 1 de junio 2021

Resumen

En el presente trabajo se obtuvieron andamios de colágeno por el método de liofilización, utilizando como fuente de origen las crestas de pollo y la piel de cerdo. Este proceso se realizó en moldes para obtener la forma y dimensiones requeridas de los andamios. Las caracterizaciones fueron realizadas mediante las técnicas de electroforesis en gel de acrilamida SDS page y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), corroborándose la presencia del colágeno tipo I en todos los casos. Además, se hizo un análisis estereoscópico donde se observa que los andamios poseen una morfología superficial fibrosa empaquetada de manera compacta y con orientación aleatoria y poros interconectados. Las caracterizaciones arrojaron que tanto el colágeno como los andamios cumplen con la composición y morfología requeridas para ser utilizados como biomaterial en la regeneración de tejidos.

Palabras clave: Colágeno, andamios, electroforesis de proteínas, espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier, microscopia electrónica de barrido

Abstract

In the present work, collagen scaffolds were obtained by the lyophilization method, using chicken ridges and pig skin as source of origin. This process was carried out in molds to obtain the required shape and dimensions of the scaffolds. The characterizations were carried out using the SDS page acrylamide gel electrophoresis techniques and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), checking the presence of type I collagen in all cases. In addition, a stereoscopic analysis was made where it was observed that the scaffolds have a fibrous surface morphology packed in a compact way and with random orientation and interconnected pores. The characterizations showed that both

the collagen and the scaffolds comply with the composition and morphology required to be used as a biomaterial in tissue regeneration.

Keywords: Collagen, scaffolds, protein electrophoresis, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy.

1. Introducción

La enfermedad cardiovascular está catalogada como una de las enfermedades no transmisibles más mortíferas en la actualidad. Un análisis estadístico realizado en 2020 por la Organización Mundial de la Salud determinó que mueren actualmente 17,9 millones de personas en el mundo a causas de enfermedades cardiovasculares [1].

Las causas de la aparición de una enfermedad cardiovascular son disímiles. En muchas de ellas cuando el órgano se daña, sufre una ruptura de la matriz extracelular, la que está compuesta entre otros elementos de colágeno; para repararlo se necesita cerrar la ruptura de alguna manera. Para ello se utilizan métodos quirúrgicos, los que de un tiempo a esta parte han involucrado, en su práctica, soportes conocidos como andamios.

De todos los posibles materiales con los que se construyen los andamios, el más popular es el colágeno pues tiene la capacidad de ser biocompatible, bioinerte, resistente, biodegradable, poseer alta adhesión celular, permeabilidad, bioactividad y baja toxicidad; características que lo hacen ser el más usado y estudiado en cuanto a construcción, regeneración y reparación de arterias y tejido cardíaco [2]. Como antecedente del uso de colágeno para reparación o regeneración de arterias se puede citar un trabajo realizado en el año 1986 por Weinberg y col. [3]. Ellos utilizaron colágeno tipo I para la construcción de tubos que semejaban las características morfológicas de las arterias, los que resultaron con pobres propiedades mecánicas, pero con buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y regeneración celular. A estos se les añadió elastina comprobando que mejoraba su resistencia a la deformación y en otro momento, se le incluyó fibrina, lo que le aportó al andamio una mejor elasticidad, fortaleza y resistencia a la presión que ejerce la sangre sobre la pared arterial, pero con baja biocompatibilidad [4,5].

En 2007 Boccaffoshi y su equipo obtuvieron un andamio tubular de pequeño calibre de colágeno tipo I extraído de rata, el que poseía una mayor resistencia al esfuerzo debido a la orientación dada a las fibras de colágeno de origen natural, las que se enrollaron alrededor de un mandril [6]. Poco tiempo después, se introdujo una estructura de forma tubular construida de colágeno en una solución con elementos de la matriz extracelular que mejoraron las propiedades mecánicas y la morfología, presentando un implante semejante a una arteria nativa, cuyo tiempo de degradación fue demasiado corto [7].

En 2018 un equipo de trabajo liderado por Elyse C. Filipe [8] construyó una estructura tubular de seda por el método de Electrospinning, la que semejaba una arteria de grueso calibre, la cual se introdujo en colágeno tipo I para luego ser implantada en un modelo animal y observar que fue capaz de reemplazar la arteria aorta, sin complicaciones y con características muy semejantes a la natural y además con buena biocompatibilidad. Por otro lado, el uso de parches de colágeno es una opción importante para reparar el miocardio infartado. Un ejemplo de esto se puede apreciar en el estudio denominado MAGNUN, liderado por Chachques [9], en el que se implantaron matrices de colágeno I y III de forma rectangular en una zona infartada para llegar a la conclusión que la misma aumenta el espesor de la zona del infarto creando nuevos tejidos viables, limitando la dilatación ventricular y mejorando la función diastólica. Esta capacidad de la matriz de colágeno de regenerar y reparar el tejido del miocardio con buenos resultados, hizo que aparecieran en el mercado

bioandamios, como el llamado CorMatrix, los que han sido utilizados para reparar corazón desde 2010 hasta la fecha con buenos resultados [10,11].

En 2020 Cui y col. [12], crearon un modelo de andamio 4D de colágeno para reparar el infarto al miocardio el que demostró unas buenas propiedades mecánicas y una integración dinámica con los tejidos del corazón en la zona infartada al ser probado en un modelo animal.

El uso del colágeno para regenerar el tejido cardiovascular ya sea en forma de andamios tubulares o parches, es una opción acertada para la ingeniería de tejidos. Es por este motivo que el objetivo de este trabajo es la obtención de andamios de colágeno tipo I extraídos de tejido animal (cresta de pollo y piel de cerdo), liofilizados en moldes y su caracterización para uso en reparación de arteria aorta y corazón infartado.

2. Materiales y Métodos

Para la elaboración del andamio se utilizaron los materiales y equipamiento siguientes:

En la obtención del colágeno y su caracterización se utilizó 0,5 kg de crestas de pollo de la raza Lego de granja, 1 kg de piel de cerdo de raza Yorkshire Canadiense, ácido acético al 4%, alcohol etílico al 98%, agua destilada, cloruro de Sodio al 98.8% (NaCl) y una Centrífuga CENTRIC 150. Además, un Equipo de electroforesis Modelo MiniV 8.10, Biometra, geles en solución de azul de coomassie (CBB R-250), proteínas estándar de peso molecular conocido y un microscopio Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) IR Prestige 21 SHIMADZU con Intervalo de medición de 350 a 7800 cm^{-1} , modos de operación transmisión y reflexión ATR.

La construcción del andamio se realizó utilizando moldes de poliuretano y acero inoxidable y una máquina de liofilizado marca Martín CHRIST modelo Alpha 2-4 LD plus, con principio de construcción modular.

En la obtención de los andamios se siguieron tres etapas como muestra el esquema de la Figura 1:

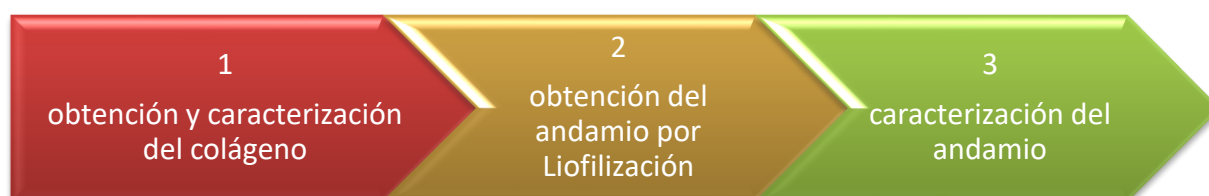


Fig.1 Esquema que muestra las diferentes etapas del proceso de obtención del andamio

En el cumplimiento de cada una de estas etapas se utilizaron diferentes técnicas con los métodos siguientes:

Obtención del colágeno

Se seleccionaron las crestas de pollo y piel de cerdo como fuentes de extracción de colágeno. El material fue lavado con agua común, solución salina, etanol al 70% y agua destilada para arrastrar la mayor cantidad de impurezas posible. Luego del lavado, se trituraron en pedazos de 0,5 cm para una mayor disolución de los mismos en el ácido acético. Las grasas presentes en los tejidos triturados se eliminaron con etanol al 96%, vertiéndolos después en la solución de ácido acético, conservándose a una temperatura de 4°C durante 21 días con agitación intermitente. A los 21 días se filtraron las disoluciones en tamices de 1 mm mediante la utilización del método de decantación y se sometieron a centrifugación. La primera centrifugación se realizó a 489 x g durante 40 min

obteniendo un precipitado, al cual se le recogió el sobrenadante y se añadieron 3 g de NaCl en granos mientras se agitaba. Esta operación se realizó por espacio de 2 horas y se dejó reposar 30 min. Se centrifugó nuevamente 20 min a 1957 x g y se colectó en esta ocasión el precipitado que ya es el colágeno. Luego se sometió el mismo a un proceso de diálisis por espacio de 1 hora para eliminar los iones de sal.

Caracterización del colágeno

Electroforesis en gel de acrilamida SDS-Page

Se realizó una prueba de electroforesis de proteínas para determinar qué concentración y tipo de colágeno poseía la muestra extraída. Se utilizaron geles de acrilamida SDS-Page, tiñendo la muestra con solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1%, y utilizando para comparar un patrón de peso molecular Broadrange Protein Molecular Weight marker (Promega), insertando las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis, donde se preparó el tampón de electroforesis a partir de la solución concentrada que se añadió en los reservorios interior y exterior. Se retiraron las burbujas de aire y restos de acrilamida del interior de los pocillos, introduciendo tampón de electroforesis en los mismos. Se aplicaron las muestras con ayuda de una micropipeta en un orden predeterminado y previamente anotado. Se añadió en un carril la solución de proteínas estándar, de peso molecular conocido conectándose los electrodos a la cubeta de electroforesis y a la fuente de alimentación aplicándose corriente eléctrica. Cuando el frente de azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel, se desconectó la fuente de alimentación, retirándose los electrodos y sacando los geles de la cubeta de electroforesis. Se eliminó el gel concentrador y se orientó la posición de las muestras realizando una muesca en una de las esquinas. Se tiñó el gel con azul de coomassie para visualizar las bandas, agitando suavemente durante al menos 30 min. Se eliminó la solución de tinción, añadiendo solución decolorante para eliminar el exceso de coloración hasta que sólo quedaron las proteínas teñidas de azul añadiéndose agua destilada para eliminar impurezas.

Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó una Espectrometría Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) por la técnica ATR (Reflexión Total Atenuada). Esta se realizó para detectar contaminantes comunes, subproductos de la degradación y ciertos aditivos dentro de las muestras, tanto para la caracterización del colágeno como para el andamio en cuanto a pureza y composición. Se tomó una muestra de 1mm y se colocó sobre el diamante con limpieza previa, ejerciendo presión y dejando pasar un rayo de luz infrarroja, hasta que la frecuencia de excitación coincidió con la frecuencia de energía absorbida en cada longitud de onda, reflejándola en forma gráfica.

Cálculo del rendimiento del colágeno obtenido en la extracción

El rendimiento al extraer cualquier material, se calcula para conocer si es rentable la realización de ese proceso para ese material. Para este propósito se utiliza una fórmula que involucra el cociente del pesaje de la cantidad del producto obtenido y de la cantidad del material inicial utilizado, llevado a porcentaje, como expresa la fórmula a continuación:

$$\%rendimiento = \left(\frac{\text{gramos de producto}}{\text{gramos de materia prima}} \right) * 100 \quad (1)$$

Obtención de los andamios mediante proceso de liofilizado

El proceso de liofilizado consta de tres etapas principales: 1) congelado, 2) secado principal, 3) secado final, como se muestra en la Figura 2. En este trabajo se definió el mismo proceso a seguir para todos los casos:

1ra etapa: Congelación. Esta etapa depende de varios factores, como la cantidad y concentración del producto y una congelación adecuada que permita la conservación de las propiedades del material y la obtención de la morfología requerida. En este caso se seleccionó la temperatura de -40°C .

2da etapa: Secado principal. Se realizó a bajas presiones. Para que ocurra este fenómeno, el disolvente debe encontrarse en estado sólido. En esta etapa el material congelado es sometido al vacío para que tenga lugar la sublimación. En este momento es cuando ocurre la eliminación de la mayor parte del disolvente presente en el producto. Se utilizó como valor de presión 0,12 Mbar para una temperatura de -40°C y un tiempo de 4 h. Al estar los tres parámetros relacionados, al variar uno de ellos se modificarán los otros. Solo finaliza esta fase en el momento en que se ha sublimado la última porción de hielo existente en la muestra.

3ra etapa: Secado final. Se eliminan las últimas trazas de disolvente que puedan existir en el producto. La temperatura que se alcanzará en esta fase será inferior a la temperatura de desnaturalización del producto. Es importante en esta fase lograr las condiciones de presión que permitan la eliminación de las cantidades residuales de disolvente que permanezcan en el producto. Para que la sublimación tenga lugar el producto debe estar sometido a temperatura y presión parcial inferior al punto triple del disolvente que se desea eliminar. Para esta etapa se fijaron valores de temperatura de -10°C , una presión de 2,6 Mbar y un tiempo de 4 h; tres para el secado final y una para terminar el proceso.

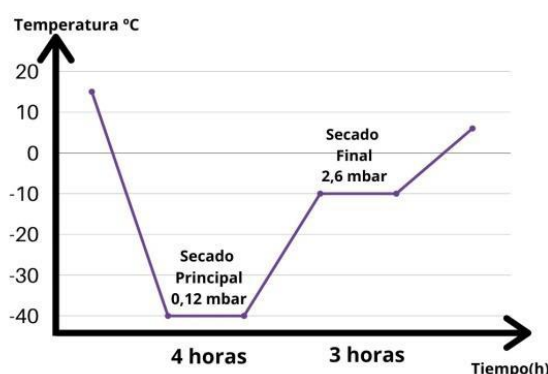


Fig.2 Intervalo de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) vs. tiempo (h) durante la etapa de liofilizado

1- Caracterización de los andamios obtenidos

Se caracterizó la pureza mediante una prueba de FTIR, la cual fue descrita en el apartado de caracterización del colágeno y seguida de la misma manera para caracterizar los andamios. Una caracterización morfológica es realizada de manera estereoscópica, valorándose la estructura superficial y la distribución de poros, los cuales están presentes debido al proceso de liofilizado.

3. Resultados y Discusión

Obtención y caracterización del colágeno

La sustancia obtenida fue de color blanco y constitución gelatinosa como se muestra en la Figura 3. La muestra A presentó un rendimiento del 17,6% para una obtención de 80 g de colágeno extraído de 454 g de material disuelto para las crestas de pollo. La muestra B tuvo un rendimiento del 30% para una obtención de 272,4 g de colágeno extraídos de 908 g de piel de cerdo.



Fig.3 Colágeno extraído: A- de crestas de pollo, B- de cerdo

Las pruebas para la caracterización tanto del colágeno como del andamio fueron realizadas siguiendo las metodologías descritas en el acápite de materiales y métodos arrojando los resultados siguientes:

Electroforesis en gel de acrilamida SDS-Page

En la Figura 4 se observa el resultado de la prueba de electroforesis realizada al colágeno extraído de las crestas de pollo y la piel de cerdo. En la misma se muestran 9 columnas. De la columna 1 a la 4 son los resultados obtenidos acerca del colágeno de la piel de cerdo con diferentes concentraciones de geles, cuyas bandas se encuentran entre los 120 kDa y los 225 kDa. Las columnas de la 5 a la 8 son los resultados para el colágeno obtenido de las crestas de pollo cuyas columnas se encuentran entre los 100 kDa y 225 kDa. La columna M es el patrón estándar de peso molecular conocido. Las bandas conseguidas entre 100 y 150 kDa pertenecen a las cadenas α_1 y α_2 . Las representadas sobre los 225 kDa a los componentes β , lo que sugiere la presencia de colágeno tipo I, representado por dos cadenas α_1 , una α_2 entre 100 y 150 kDa y un componente β por encima de los 200 kDa [13].

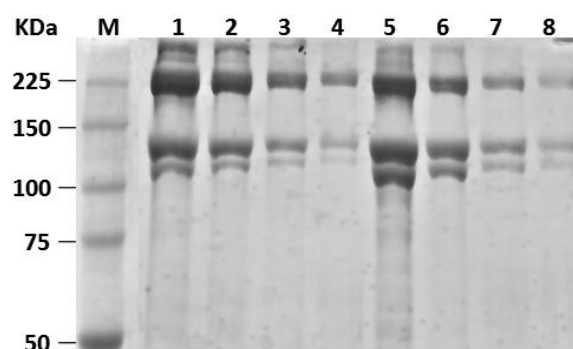


Fig.4 Electroforesis realizada al colágeno. De la columna 1 a la 4 colágeno de la piel de cerdo, columnas de la 5 a la 8 colágeno de las crestas de pollo, columna M patrón de peso molecular conocido

El rendimiento para cresta de pollo que se reporta en la literatura es de 2,44%. Este se encuentra por debajo del obtenido para este trabajo, que es 17,8%. En cuanto a la piel de cerdo el resultado logrado es de 30% coincidiendo con Knight [15]. En la prueba de electroforesis, las bandas observadas se encuentran situadas por sobre los 100 KDa para las cadenas α_2 y por debajo de los 150 KDa para las cadenas α_1 y los componentes β por sobre los 225 KDa. Teniendo como

referencia los valores reportados en la literatura para patas de pollo por Suparno [14] y Da Silva Araujo [16] y piel de cerdo por Knigh [15] y Fiodorovich [17], estos valores y la estructura de la representación de las bandas corresponden al colágeno tipo I.

Prueba de FTIR del colágeno

En la prueba realizada a la muestra de colágeno de crestas de pollo mostrada en la Figura 5-A, se observan dos secciones representativas de las amidas. En la primera sección perteneciente a las amidas A y B se observan picos en los valores de longitud de onda 3286 , 3088 y 2927 cm^{-1} . En la segunda sección representativa de las amidas I, II y III se encuentran picos significativos en las longitudes de onda 1627 , 1550 y 1238 cm^{-1} correspondiente a las mismas respectivamente. Todos estos valores antes mencionados se encuentran dentro de los intervalos establecidos para cada grupo de amidas, siendo para la amida A las bandas entre $(3400-3300)$ relacionada con el estiramiento de N-H. La amida B entre $(3100-2800)$ relacionada con el estiramiento asimétrico y simétrico de enlaces C-H; las amidas I entre $(1700-1600)$, II entre $(1550-1300)$ y III entre $(1250-1000)$ [14].

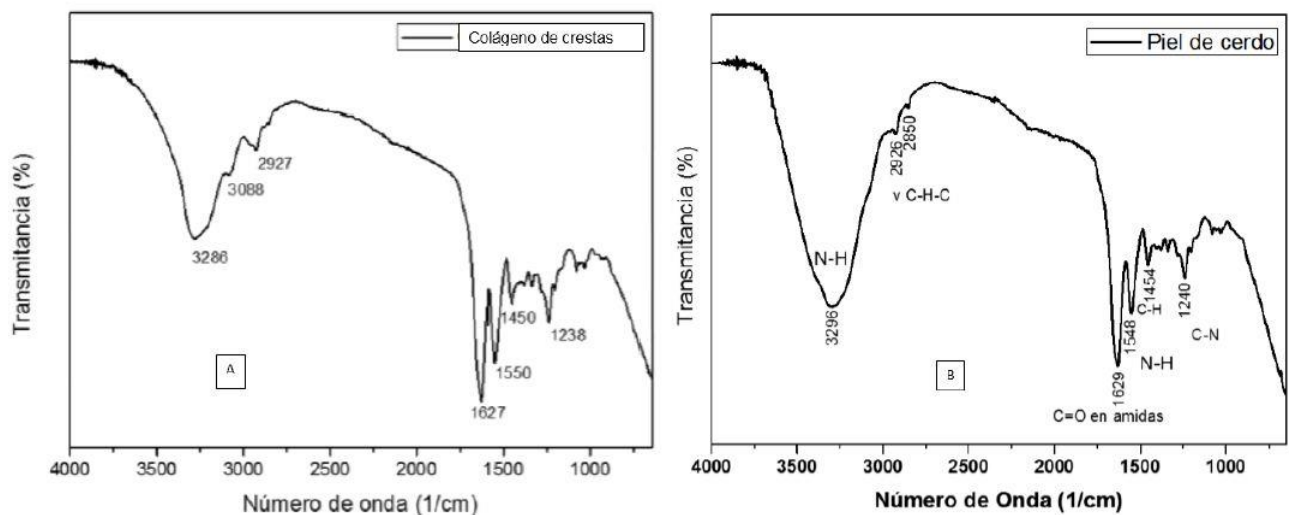


Fig.5 FTIR realizado al colágeno. A – crestas de pollo, B- piel de cerdo

En la Figura 5-B se observa el resultado de la prueba de FTIR realizada al colágeno obtenido de piel de cerdo. En ella aparecen picos en la longitud de onda 3296 , 2926 , 2850 , 1629 , 1548 , 1454 y 1240 cm^{-1} . Los tres primeros valores obtenidos se encuentran en la zona de las amidas A y B y el resto en la zona representativa de las amidas I, II y III como se explicó anteriormente. Se observa que los valores de longitud de onda se encuentran dentro de los intervalos establecidos para las clasificaciones de las amidas.

Obtención de los andamios

Liofilización

Del proceso de liofilizado del colágeno, se obtuvo el andamio mostrado en la Figura 6-A. El mismo posee una estructura tubular, la que fue provista mediante un molde de poliuretano confeccionado para este fin. Este andamio posee dimensiones que asemejan a las de la arteria aorta con un diámetro interior de 18 mm y un espesor de la pared de 2 mm . También se puede observar una superficie porosa con determinado nivel de interconexión, lo cual debe facilitar los procesos de proliferación celular y con esto una regeneración efectiva del tejido vascular.

El andamio obtenido de la piel de cerdo se obtuvo en forma de parche sobre un molde de acero inoxidable, con un espesor de 5 mm. Este andamio que se muestra en la Figura 6-B, posee una superficie irregular, con poros interconectados como se observa en el corte realizado en la Figura 7, que proveen una posibilidad de motilidad celular en la regeneración del tejido. Este andamio se está desarrollando con el objetivo de doparlo con células madre, preferiblemente del tipo mesenquimales para utilizarlo en la regeneración de la zona infarta del miocardio.



Fig.6 Andamios resultantes del proceso de liofilización del colágeno. A- andamio de crestas de pollo, B- andamio de piel de cerdo

Caracterización del andamio

Análisis estereoscópico

Se tomaron imágenes de tamaño natural sobre a una sección a la que se le practicó un corte transversal. Esto puede ser apreciado en la Figura 7.



Fig.7 Corte realizado a una sección de cada uno de los andamios. A- andamio de crestas, B- andamio de piel de cerdo

FTIR de los andamios

En las pruebas de FTIR mostradas en la Figura 8 A y B, aparecen picos pronunciados en las bandas representativas de las amidas que caracterizan al colágeno como se había mencionado anteriormente. En esta ocasión los valores fueron 3309 cm^{-1} representando a la amida A, 2922 cm^{-1} la amida B y amidas I, II con $1629, 1548\text{ cm}^{-1}$ y amida III en los valores 1238 y 1452 cm^{-1} respectivamente para el andamio de cresta de pollo(A), aunque aparecen también nuevas bandas con picos poco pronunciados. Con respecto al andamio de piel de cerdo (B), los picos aparecen en el $3315, 2920$ y 2850 cm^{-1} en la sección de las amidas A y B, para las amidas I y II. Los valores aparecen en $1629, 1546$ y para amidas III en 1460 y 1238 cm^{-1} .

En los resultados alcanzados en las pruebas de FTIR tanto al colágeno como al andamio, para ambas fuentes de extracción, se puede observar que, aunque los mismos se encuentran entre los intervalos correspondientes al colágeno, existen ligeras diferencias entre la amplitud y extensión de los picos, así como pequeños corrimientos de algunos valores, lo que se debe al proceso de liofilizado. Es por este motivo que cuando se analiza el caso de los resultados para la fuente de extracción cresta de pollo, la amida A en ambos casos, aunque presenta una cresta que se encuentra entre $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, lo que sugiere presencia de enlaces de hidrógeno, se observa que la misma se ensancha y el pico es más pronunciado para cuando se liofiliza. Esto también ocurre para la amida B cuyos valores representan un estiramiento asimétrico del grupo CH_2 y se encuentran, en el caso del colágeno, en pico de pequeña elongación con valor de 3088 cm^{-1} y para el andamio en un pico muy pronunciado de 2922 cm^{-1} . La amida I representa la estructura secundaria reflejando bandas para los componentes β entre $1700\text{--}1650$ y componentes α entre $1660\text{--}1620$, en el caso en cuestión, en el colágeno esta banda tomó el valor de 1627 y para el andamio de 1629 , sugiriendo presencia de cadenas α [18].

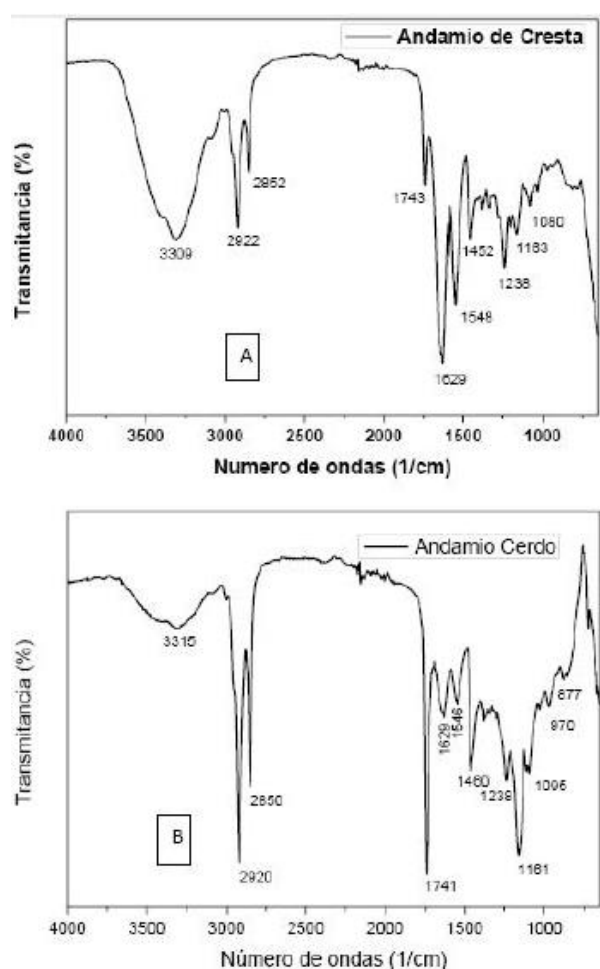


Fig.8 FTIR realizados a los andamios de colágeno. A- andamio de crestas de pollo, B- andamios de piel de cerdo

La amida II en soluciones ácidas sugiere un fuerte enlace con moléculas de hidrógeno alrededor de los 1500 cm^{-1} . En este caso los valores se encuentran entre 1550 y 1548 para el colágeno y el andamio respectivamente, valores que no difieren mucho entre ellos, pero sí de los preestablecidos. Este corrimiento con respecto al valor señalado en la literatura se le puede atribuir a modificaciones locales que sufren las frecuencias de vibración y rotación durante los procesos de extracción [19]. Para el caso de la amida III, cuando adoptan valores alrededor de los 1450 y 1235 expresan que la

estructura molecular fue preservada durante la extracción [18,20], lo que es sugerido donde el valor obtenido fue 1238cm^{-1} en picos pronunciados para ambos casos y un pequeño pico en 1452 aparecido después del liofilizado en el FTIR del andamio.

Para el caso de los resultados de la fuente de piel de cerdo, los picos en el colágeno se observan en: amidas A en 3296cm^{-1} , B en 2926cm^{-1} , I en 1629cm^{-1} , II en 1548cm^{-1} y la III tiene una doble representación de dos picos poco prolongados en los valores 1454 y 1240cm^{-1} . Para el FTIR realizado al andamio en la representación de la amida A, se observa una pequeña cresta sin pico representativo en el valor de 3315cm^{-1} . Los valores antes y después del liofilizado se encuentran en el límite del intervalo de valores reconocido para el colágeno por lo que se puede decir que la presencia de enlaces de hidrógeno es débil. También se puede observar un pico casi imperceptible en el valor 2920cm^{-1} representando a la amida B y el estiramiento asimétrico del grupo CH_2 . Para la amida I después del liofilizado aparece un pico poco pronunciado pero que coincide con el valor de 1629cm^{-1} obtenido en el colágeno, que como se explicó anteriormente representa a las cadenas α características del colágeno tipo I, para la amida II 1546cm^{-1} y para la amida III aparecen picos en dos valores 1460 y 1238 , los que sugieren como se dijo para el caso anterior que la estructura molecular fue preservada durante el proceso de extracción ácida.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a los colágenos y andamios, determinaron que el mismo cumple los requisitos de longitud de onda y peso molecular pertenecientes al colágeno tipo I, para ambos casos. En cuanto al análisis estereoscópico realizado sobre las muestras a tamaño natural, este mostró que los andamios poseen una morfología superficial fibrosa expuesta como un denso grupo de fibrillas compactas orientadas aleatoriamente, además de la presencia de poros interconectados. Esta estructura en forma de constructo es la recomendada para asegurar el proceso de siembra y proliferación celular durante las etapas de cultivo in vitro y posterior funcionamiento del andamio, como parte de la regeneración del tejido dañado.

La morfología, composición y dimensiones de los andamios obtenidos permiten que los mismos sean candidatos para ser utilizados como biomateriales en la regeneración de tejidos del sistema cardiovascular. Esto se fundamenta, debido a que los parches o matrices utilizados para la regeneración del miocardio deben manufacturarse con las dimensiones de la zona dañada del corazón y se fabrican en forma rectangular o cuadrada. En el caso de la presente investigación se utilizó el proceso de liofilizado en un molde de acero inoxidable con las dimensiones requeridas, donde las principales son la longitud y el ancho. Con relación a la composición del colágeno, el que se obtuvo es del tipo I, el cual es recomendado porque la matriz extracelular del miocardio está constituida por un 80% de este colágeno, lo que garantizará una regeneración efectiva de la misma [9,10]. Por otro lado, los andamios obtenidos poseen la estructura de constructo requerida para garantizar los procesos de siembra y proliferación celular durante las etapas de preparación in vitro del andamio y su posterior función regenerativa, mediante la diferenciación celular a cardiomiocitos.

4. Conclusiones

Andamios de colágeno tipo I fueron obtenidos mediante un proceso de liofilizado, utilizando como fuente de materia prima las crestas de pollo; los mismos tienen la geometría y dimensiones características de una arteria aorta abdominal. Andamios de colágeno tipo I se obtuvieron a partir de la piel de cerdo utilizando un proceso de liofilizado, lográndose una geometría y dimensiones que semejan los parches empleados para la regeneración del tejido del miocardio infartado. Las caracterizaciones arrojaron que tanto el colágeno como los andamios cumplen con la composición y morfología requeridas para ser utilizados como biomateriales en la regeneración de tejidos. La caracterización físico-química realizada mediante las técnicas de electroforesis y FTIR a las

muestras de colágeno, evidenciaron las potencialidades reales que tienen estas fuentes de materia prima como biomateriales para la reparación de partes del sistema cardiovascular.

Referencias

1. World Health Organization, *World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*, 2020. Geneva. ISBN: 978-92-4-000510-5.
2. Nosrati, H., Pourmotabed, S., Sharifi, E., *A Review on Some Natural Biopolymers and Their Applications in Angiogenesis and Tissue Engineering*. J. Appl. Biotechnol. Rep., 2018. 5(3): p. 81-91. DOI: <https://doi.org/10.29252/jabr.05.03.01>.
3. Weinberg, C.B., Bell, E., *A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells*. Science, 1986. 231(4736): p. 397-400. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2934816>.
4. Niklason, L.E., Abbott, W., Gao, J., Klagges, B., Hirschi, K.K., Ulubayr, K., Conroy, N., Jones, R., Vasanawala, A., Sanzgiri, S., Kanger, R. *Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries*. Journal of Vascular Surgery, 2001. 33(3): p. 628-638. DOI: <https://doi.org/10.1067/mva.2001.111747>.
5. Cummings, C.L., Gawlitta, D., Nerem, R.M., *Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures*. Biomaterials, 2004. 25: p. 3699-3706.
6. Boccafroschi F., Rajan, N., Habermehl, J., Mantovani, D., *Preparation and Characterization of a Scaffold for Vascular Tissue Engineering by Direct-Assembling of Collagen and Cells in a Cylindrical Geometry*. Macromol Biosci, 2007. 7: p. 719-726. DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.200600242>.
7. Syedain, Z.H., Meier, L.A., Lahti, M.T., Johnson, S.L., Tranquillom, R.T., *Implantation of Completely Biological Engineered Grafts Following Decellularization into the Sheep Femoral Artery*. Tissue Engineering: Part A, 2014. 20(11-12): p. 1726-1737, DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0550>.
8. Filipe, E.C., Santos, M., Hung, J., Lee, B.S.L., Yang, N., Chan, A.H.P, Martin, K.C., Ng, R.K., Wise, S.G., *Rapid Endothelialization of Off-the-Shelf Small Diameter Silk Vascular Grafts*. J Am Coll Cardiol Basic Trans Science, 2018. 3(1): p. 38-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.12.003>.
9. Trainini, J.C., Chachques, J.C., Lago, N., *Asistencia miocárdica con matrices bioartificiales*. Rev Argent Cardiol, 2006. 74: p. 401-405.
10. Scholl, F.G., Boucek, M.M., Chan, K.C., Valdes-Cruz, L., Perryman, R., *Preliminary experience with cardiac reconstruction using Decellularized porcine extracellular matrix scaffold: human applications in congenital heart disease*. J Pediatr Congenit Heart Surg, 2010. 1: p. 132-136. DOI: <https://doi.org/10.1177/2150135110362092>.
11. Mewhort, H.E.M., Turnbull, J.D., Satriano, A., Chow, K., Flewitt, J.A., Andrei, A.C., Guzardi, D.G., Svystonyuk, D.A., White, J.A., Fedak, P.W.M., *Epicardial infarct repair with bioinductive extracellular matrix promotes vasculogenesis and myocardial recovery*. J Heart Lung Transplant, 2016. 35: p. 661-670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.01.012>.
12. Cui, H., Liu, C., Esworthy, T., Huang, Y., Zu-xi, Y., Zhou, X., San, H., Se-jun, L., Hann, S.Y., Boehm, M., Mohiuddin, M., Fisher, J.P., Zhang, L.G., *4D physiologically adaptable cardiac patch: A 4-month in vivo study for the treatment of myocardial infarction*. Sci. Adv., 2020. 6: p. eabb5067. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5067>.
13. Pham, X.K., Phan, B.V., Dao, V.H., Le-Ho, K.H., Thu-Hong, N., Thi, T.D., Phuong-Anh, N., *Investigation of protein patterns and antioxidant activity of collagen hydrolysates from skin of fan-bellied leatherjacket monacanthus chinensis by various enzymes*. Journal of Marine Science and Technology, 2018. 18(4A): p. 141-150. DOI: <https://doi.org/10.15625/1859-3097/18/4A/13642>.

14. Suparno, O., Prasetyo, N.B., *Isolation of collagen from chicken feet with hydro-extraction method and its physico-chemical characterization*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 2019. **335**: p. 012018IOP. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/335/1/012018>.
15. Knight, K.R., Mccann, J.J., Vanderkolk, C.A., Coe, S.A., Mc. O'brien, B., *Microsurgery The redistribution of collagen in expanded pig skin*. British Journal of plastic Surgery, 1990. **43**: 565-570.
16. Braz Da Silva, I., Alves, T.K., Silva, E., De Almeida, C.A., Santi-Gadelhat, T., Madruga, M.S., *Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization*. Food Sci. Technol. 2018. **38**(1): p. 167-173. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.27517>.
17. Fiodorovich, I., Ivanovich, E., Viacheslavovich, G., Ivanovna, M., Yurievich, A., Saferbegovich, R., Ivanovich, A., Yurievna, E., Viktorovna, E., Vladimirovna, E., *Collagen from porcine skin: a method of extraction and structural properties*. International Journal of Food Properties, 2018. **21**(1): p.1031-1042. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1466324>.
18. Dang, Q.F., Liu, H., Yan, J.Q., Liu, C.S., Liu, Y., Li, J., Jing, L.J., *Characterization of collagen from haddock skin and wound healing properties of its hydrolysates*. Biomed. Mater., 2015. **10**: p. 015022. DOI: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015022>.
19. Shanmuganathan, S., Shanmugasundaram, N., Adhirajan, N., Ramyaa, L.T., Babu, M., *Diseño de una matriz de soporte compuesta de colágeno de piel de tiburón-aloe para ingeniería tisular*. Ars Pharm, 2008. **49**(4): p. 321-340.
20. Kumar, P.G., Suresh, P.V., *Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen*. Materials Science and Engineering C, 2017. **70**: p. 32-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.047>.

Conflicto de Intereses

No existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Janet Carvajal de la Osa. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7954-8359>

Participó en la concepción, el diseño de la investigación y análisis de los resultados. Participó en la escritura del manuscrito.

Amanda Pacheco Leal. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1966-4096>

Participó en la concepción de la investigación, la obtención del colágeno y andamio y análisis de los resultados. Participó en la revisión final del manuscrito.

Yaimara Nuevo Artiles. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-20287582>

Participó en la concepción de la investigación, la obtención del colágeno y andamio y análisis de los resultados. Participó en la revisión final del manuscrito.

Carlos Rafael Figueroa Hernández. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3821-8748>

Participó en la concepción, diseño de la investigación y análisis de los resultados. Participó en la revisión final del manuscrito.

Reyniel Gómez González, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8720-6065>

Participó en el diseño de la investigación y el análisis de los resultados de las pruebas de FTIR. Participó en la revisión de la versión final del manuscrito.

Javier Luis Villegas Santos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2773-3469>

Participó en la obtención del colágeno y análisis de los resultados. Participó en la revisión final del artículo.

Yunier Serrano Rivero ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1575-9530>

Realizó y analizó las pruebas de electroforesis de proteínas. Participó en la revisión final del manuscrito.

Ahmed Valdés Martínez, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7544-3303>

Realizó y analizó las pruebas de FTIR, participó en la obtención del colágeno. Participó en la revisión final del manuscrito.

Tania Rodríguez Moliner. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6995-2948>

Participó en el análisis de los resultados de la investigación. Participó en la revisión final del manuscrito.

Juan Prohías Martínez. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1274-6320>

Participó en la elaboración del diseño de investigación y en el análisis de los resultados. Participó en la revisión final del manuscrito.

Yenisel Díaz Roller. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6574-9675>

Participó en el análisis de los resultados de la investigación y en la obtención de colágeno. Participó en la revisión final del manuscrito.