



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Análisis comparativo de la matriz
extracelular de la dermis de ratón en
condiciones nativas y descelularizadas
en estadíos con distinta capacidad
regenerativa.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

Pamela Rocío Díaz Astudillo

**Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector de Tesis: José Tomás Egaña Erazo**

Marzo 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Análisis comparativo de la matriz extracelular de la piel de ratón en condiciones nativas y descelularizadas en estadíos con distinta capacidad regenerativa.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Pamela Rocío Díaz Astudillo

**Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector de Tesis: José Tomás Egaña Erazo**

MARZO 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Análisis comparativo de la matriz extracelular de la piel de ratón en condiciones nativas y descelularizadas en estadíos con distinta capacidad regenerativa”

Alumno

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Sebastián Andrés San Martín Henríquez en el laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Juan Villena
Presidente Comisión

Dra. Daniela López
Profesor Informante

Dr. Claudio Aguayo
Profesor Informante

Dr. Sebastián Andrés San Martín Henríquez
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2023**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Le dedico esta tesis a mi tía Sandra, que siempre creyó mucho en mí y era mi fan número uno. Sé que me acompaña en estos momentos y desde otro plano celebra feliz la culminación de esta etapa.

Además, quiero agradecer a mis papis y mis hermanas, quienes me acompañan día a día en todos los pasos que doy y todas las decisiones que tomo. A la maca especialmente por las horas trabajando juntas a través de cámara web para darnos apoyo en las tesis y el teletrabajo. Los amo mucho.

A la Kari por el apañe en las noches de estudio y las noches de escritura de tesis escuchando música para mantenernos despiertas. A los chiquillos del team BM por su apañe siempre.

A la Vale Castillo, por llevar este proyecto conjunto, la verdad siento que no tengo como agradecer tu buena onda y excelente disposición siempre durante estos años de tesis en pandemia.

A mis tutores, a Sebastián San Martín, de quien estoy inmensamente agradecida por su confianza y apoyo, que permitieron que estuviera dos meses en España antes de la pandemia y me permitieron luego realizar este trabajo. Y a Tomás Egaña por su apoyo y confianza durante todo el proceso.

Y finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el financiamiento a través de la Beca Nacional de Magister bajo la cual se desarrolló este trabajo.

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico
BMP: Proteína morfogénica ósea, *Bone Morphogenetic Protein*.
Coll XVIII: Colágeno XVIII.
cGAGs: Glicosaminoglicanos carboxilados.
dAdulto: Adulto descelularizada.
dMEC: Matriz extracelular descelularizada.
dFeto: Feto descelularizada.
dsADN: ADN doble hebra.
MEC: Matriz extracelular.
EGF: Factor de crecimiento epidérmico, *Epidermal Growth Factor*.
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos, *Fibroblast Growth Factor*.
GAGs: Glicosaminoglicanos.
HA: Ácido hialurónico.
HSPG2: Heparán sulfato proteoglicano 2, Perlecan.
IHQ: Inmunohistoquímica.
IT: Ingeniería de tejidos.
ILs: Interleuquinas
MEC: Matriz extracelular.
Min: Minutos.
mM: Milimolar
MMPs: Metaloproteinasas de matriz.
PBS: Buffer salino fosfato.
PFA: Para formaldehído.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, *Platelet Derived Growth Factor*
ROI: *Region of interest* o región de interés.
RPM: Revoluciones por minuto.
SEM: *Standard error of median* o error estándar de la media.
sGAGs: Glicosaminoglicanos sulfatados.
SDS: Sodio dodecil
TA: Temperatura ambiente.
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, *Tumor Necrosis Factor Alpha*.
TENC: Tenascina C.
UV: Ultravioleta.
VCAN: Versican.
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, *Endothelial Growth Factor*.

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
METODOLOGÍA	16
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	48

RESUMEN

La piel es la principal barrera anatómica protectora contra patógenos, daños físicos y rayos UV. La capacidad regenerativa de ésta varía según la especie y edad, en mamíferos esta capacidad se pierde en algún momento durante la vida intrauterina, dando paso a la generación de cicatrices. La ingeniería de tejidos tiene como objetivo la generación de constructos funcionales que puedan reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados. Algunos enfoques utilizados en regeneración de piel corresponden a la utilización de matrices dermales descelularizadas, sin embargo, todas las disponibles comercialmente se basan en matrices de piel adulta, la cual no posee la capacidad de regenerar sin cicatrices ni de regenerar los anexos de la piel. En el presente estudio se estableció un protocolo de descelularización en piel de ratón en estadio reparativo (adulta) y regenerativo (fetal, E16.5) y se evaluaron los efectos sobre algunos de los componentes de la matriz extracelular, comparándose también su distribución en condiciones nativas. Se observó la presencia de Agrina, Perlecan, Colágeno XVIII, Versican, Fibromodulina y Tenascina C en el feto y el adulto, principalmente en la epidermis. La descelularización con 0.05% Tritón-KCl con tratamiento de DNasa logró mantener la estructura de la matriz en ambas pieles obteniéndose valores de ADN menores a 50 ng/mg de peso seco y eliminación de núcleos por HE. Se observó una distribución diferencial del ácido hialurónico en los distintos estadios evaluados, así como un significativo aumento de sGAGs en el feto comparado con el adulto, viéndose afectados significativamente por el proceso de descelularización. Los resultados obtenidos en este estudio corresponden a una descripción más amplia de algunas moléculas de la matriz extracelular presentes en condiciones normales en la matriz extracelular de la piel y propone un protocolo para la descelularización de matrices dermales fetales para el uso futuro en ingeniería de tejidos.

Palabras clave: Regeneración, piel, matriz extracelular, cicatrización, feto.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y corresponde a una de las principales barreras protectoras contra patógenos y el ambiente, sin embargo, ésta puede sufrir traumas generando heridas por accidentes, quemaduras, entre otros. A nivel clínico, la cicatrización de la piel puede presentar distintos fenotipos, desde finas líneas a cicatrices queloides, atróficas, hipertróficas y contracturadas. La cicatrización anormal de la piel puede tener consecuencias importantes en la vida del paciente, desde molestias por la apariencia estética, desfiguración con implicancias psicosociales a generar contracturas musculares por inhabilidad en el movimiento (1). Por otra parte, estas heridas pueden volverse crónicas por otras patologías y factores de riesgo como la edad avanzada, diabetes, obesidad, cáncer, entre otros. A nivel global se estima que un 1% de la población posee úlceras crónicas, mientras que en Chile esta corresponde a alrededor de 170.000 pacientes, los cuales a su vez pueden presentar alto riesgo de infección(2). Esto ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías en el área de la ingeniería de tejidos que permitan disminuir los riesgos asociados a las heridas en la piel, así como su falta de reparación.

La piel está compuesta de tres capas, la epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis, corresponde a la capa más externa, es un epitelio escamoso estratificado con un alto grado de recambio celular dado por la descamación continua de las células cornificadas ubicadas en la superficie apical (**Figura 1**)(3). Debajo de la capa celular basal de la epidermis, que contiene el pool de células madre, se encuentra la membrana basal, también llamada unión dermo-epidermal, una compleja red de macromoléculas de la matriz extracelular (MEC) que une estrechamente ambas capas de la piel y actúa como una barrera de permeabilidad entre estas, sirviendo como soporte para los queratinocitos, mediando señales que influyen su comportamiento(4). Luego está la dermis donde se encuentran los denominados anexos de la piel, que corresponden a las glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, folículos pilosos y uñas que cruzan hasta la epidermis. La capa superior de la dermis o dermis papilar, compuesta principalmente por fibroblastos, mastocitos, macrófagos, dendrocitos dermales y matriz extracelular (5). Dentro de esta misma y bajo la dermis papilar se encuentra la dermis reticular, más

gruesa que la anterior, la cual contiene fibroblastos y principalmente fibras de colágeno y elastina. En esta además se pueden observar nervios y vasos sanguíneos que se ramifican hacia la membrana basal (3)(6). Finalmente se encuentra la hipodermis, capa más interna compuesta por adipocitos que funcionan como un depósito de grasa subcutánea desde la cual emergen los vasos sanguíneos hacia la dermis (7).

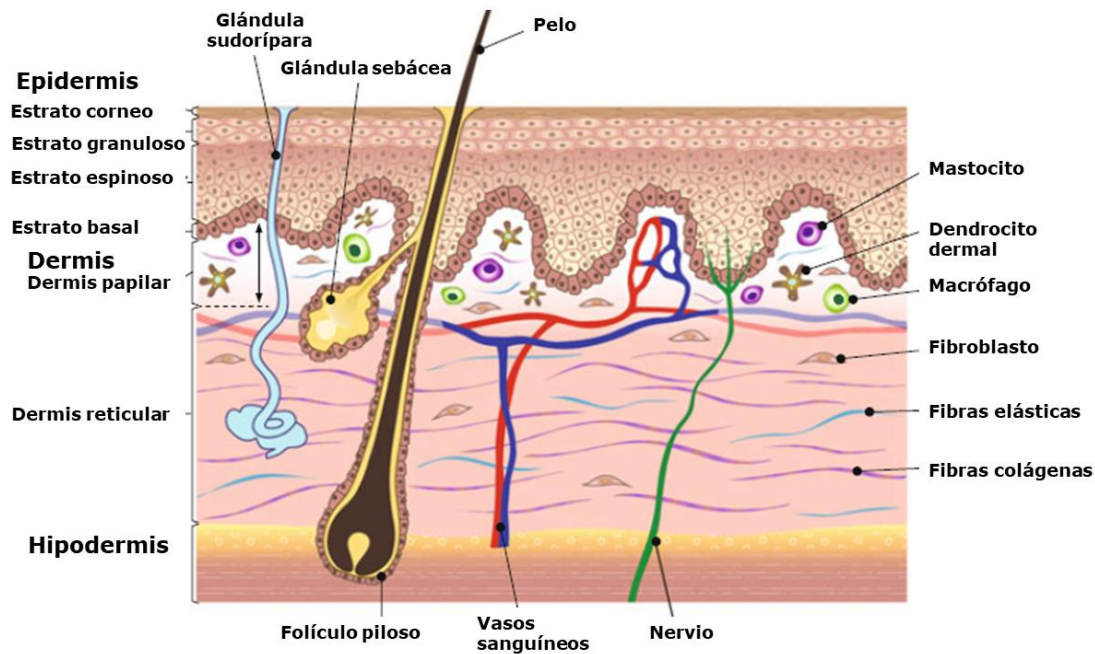


Figura 1: Representación de las tres capas de la piel adulta humana. Se muestran las tres principales capas de la piel, así como los anexos de ella y las células que se pueden encontrar en la dermis. Figura modificada al español (3).

Cuando la piel sufre una lesión pasa por una serie de procesos altamente controlados de reparación y cicatrización del tejido, estas fases comprenden la hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación. (A) La hemostasis, ocurre luego de que se genera una herida en la piel en donde la sangre comienza a llenar el sitio dañado, algunos componentes celulares y humorales como el fibrinógeno y plaquetas actúan para detener el sangrado y forman un coágulo de fibrina que atrapa las plaquetas y junto con los componentes de la ECM se secretan varios factores como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), los cuales contribuirán a las siguientes fases de la reparación. (B) Inflamación, este proceso está caracterizado por la invasión de fagocitos en el sitio de la herida, donde los

neutrófilos liberan citoquinas que contribuyen al reclutamiento de macrófagos y monocitos(3). (C) Proliferación, consiguientemente ocurre la migración y proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales en el sitio, los factores liberados previamente activan a los queratinocitos que en consecuencia liberan metaloproteinasas de matriz (MMPs) que facilitan la migración y la posterior formación de nuevos vasos sanguíneos o vascularización desde células endoteliales, adquiriendo un aspecto granular que gradualmente reemplaza al coágulo de fibrina, junto con la presencia de oxígeno que promueve la proliferación de fibroblastos que secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TFG-b), que además estimulan la producción de colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos y ácido hialurónico (HA).(D) Remodelación, finalmente el sitio de granulación es remodelado a un tejido relativamente bajo en contenido celular que difiere de su contenido a lo observado en la dermis normal, disminuyen las fibras elásticas, el ácido hialurónico y aumenta el depósito de colágeno tipo I, además de un cambio en la organización de las fibras debido a la presencia de MMPs, que finalmente dan origen a una cicatriz (3)(8).

Sin embargo, este proceso ocurre de manera distinta a lo largo de la vida de los mamíferos, puesto que en algún momento de la vida intrauterina la regeneración del tejido ocurre sin dejar cicatriz. En ratón y rata, se ha descrito que la pérdida del fenotipo regenerativo observado en el feto se da en el día E18 de gestación, mientras que en humanos ocurre hasta la semana 22-23 de gestación (9-11). Esto se ha asociado a distintos componentes, por un lado, en la regeneración fetal libre de cicatriz se observa una marcada disminución de la respuesta inflamatoria, existiendo una menor infiltración de macrófagos y menor cantidad de plaquetas, donde los macrófagos no son reclutados hasta el día E14.5 en el caso de heridas fetales. Por otra parte, se han descrito algunos componentes de la matriz extracelular que se expresan y depositan diferencialmente en el feto y el adulto (**Figura 2**) (6)(12)(13)

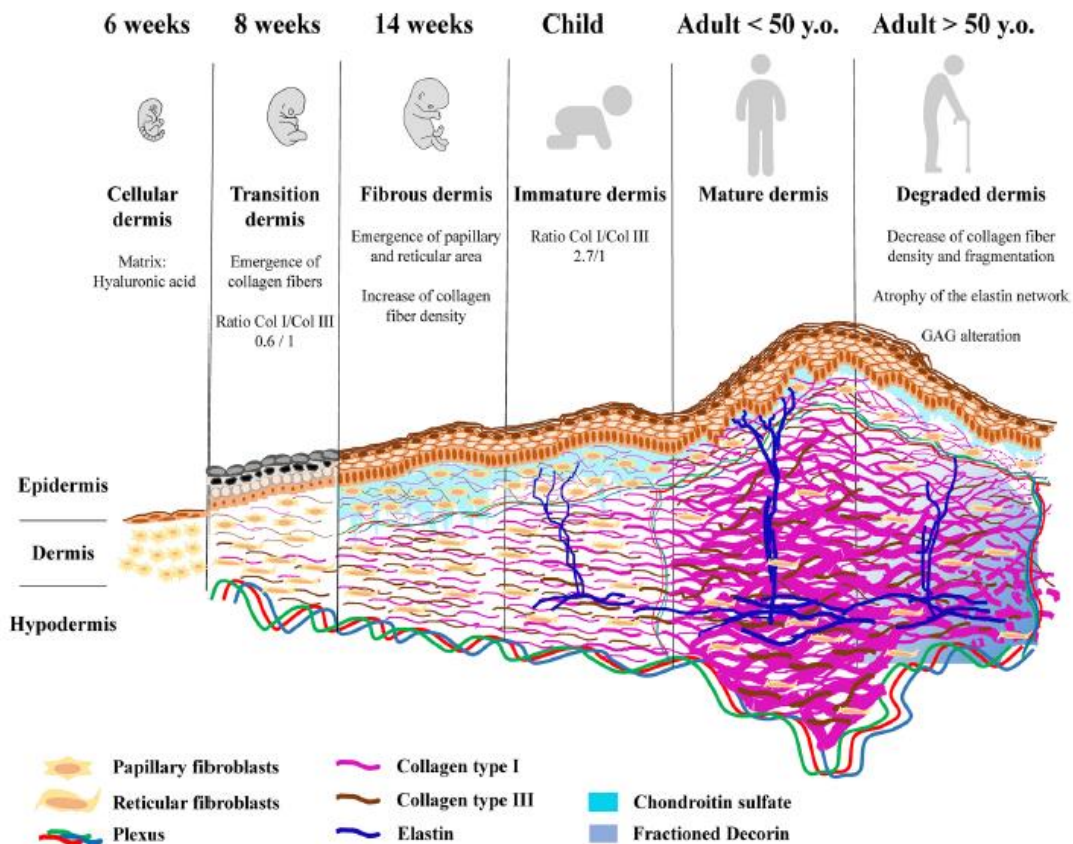


Figura 2. Representación esquemática de la evolución de la piel durante el desarrollo humano (6).

En el proceso de regeneración fetal existe más depósito de colágeno tipo III en contraste con lo que ocurre en adulto, donde hay un aumento del colágeno tipo I. El depósito de fibronectina, asociada al proceso de coagulación ocurre más temprano en el feto que en el adulto.(14) La fibromodulina, que ha demostrado ser necesaria para el fenotipo de regeneración fetal se encuentra en más altas concentraciones (14)(15,16)(15)(16).

Los avances más actuales en las técnicas regenerativas se basan en la ingeniería de tejidos (IT), una rama de la medicina regenerativa que tiene como objetivo la generación de constructos funcionales que puedan reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados. La generación de estos constructos se basa en tres elementos básicos, células, biomateriales y factores de crecimiento (17). Algunas de las cualidades que deben

poseer los biomateriales es ser biomiméticos, tener una porosidad adecuada para la migración celular, promover la adhesión celular, poseer características mecánicas similares al tejido de trasplante, integración con el tejido y biodegradabilidad, entre otros (18). Dentro de los sustitutos de piel disponibles en la actualidad todavía existe un rango de problemas que incluyen baja integración con el tejido, poca vascularización, cicatrices en los bordes del implante y falta de diferenciación de las estructuras formadas (19). Algunos de los enfoques se basan en la ingeniería por la vía de la descelularización, la cual busca mantener las propiedades inherentes a la matriz extracelular del tejido, eliminando el contenido celular, dichas matrices pueden ser sustitutos de matrices epidermales, dermales, dermo-epidermales dependiendo de la fuente que se utilice para generarlos (**Figura 3**)(20)

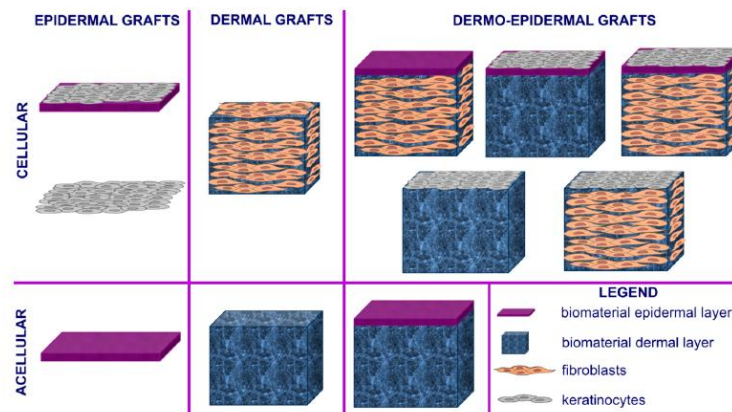


Figura 3. Diferentes variantes de matrices dermales artificiales. Parte superior correspondiente a matrices con contenido celular, parte inferior correspondiente a matrices acelulares. (20)

Si bien se ha sugerido que las mejores matrices para regeneración son las matrices descelularizadas del mismo tejido a regenerar, un estudio reciente llevado a cabo en axolote, un anfibio con capacidad regenerativa libre de cicatrices y que es capaz de regenerar miembros completos, demostró que esto depende del estado de la matriz (21). En este estudio, al usar la matriz extracelular descelularizada de piel de ratón, compuesta principalmente de proteoglicanos de heparán sulfato en una herida de axolote, se observó que dichas matrices son capaces de inducir la regeneración de miembros completos. Interesantemente, los efectos observados podían ser de inducción o inhibición completa de la regeneración dependiendo de los patrones de sulfatación de

los proteoglicanos de la matriz utilizada y que, por tanto, la falta de regeneración en individuos como el humano puede darse debido a la inhibición de manera similar a lo observado en axolote más que a una incapacidad(21). Por otra parte, un estudio realizado en fetos de cordero demostró que al utilizar sustitutos dermales de piel adulta en un feto con capacidad regenerativa, se observa un fenotipo de cicatrización de adulto y no fetal, sugiriendo que algunas de estas propiedades son intrínsecas de la MEC (22).

Además, se han determinado algunos componentes y su comportamiento durante la regeneración fetal, sin embargo, no existe una descripción clara de que ocurre en el momento en que se pierde la capacidad de regenerar y la información respectiva a los proteoglicanos de heparán sulfato en estos estadios es escasa, además de otras moléculas claves en este proceso. Por otra parte, a la fecha son pocos los parches dermales basados en piel fetal y los estudios sobre como estos pueden mejorar la regeneración. Por lo tanto, entender las características y composición de la matriz extracelular de la piel fetal en condiciones nativas en estados regenerativos es de gran importancia para la construcción de parches dermales que simulen estas características. El presente estudio tiene como objetivo estudiar las características de la matriz extracelular de la dermis de ratón en estadios con distinta capacidad regenerativa (E16.5 y adulto), establecer un protocolo de descelularización y evaluar los efectos de estas sobre la MEC.

HIPÓTESIS

La piel obtenida de animales en estadios regenerativos (Feto E16.5) y reparativos (Adulto) posee diferencias en los principales elementos estructurales de la matriz extracelular. A su vez la descelularización del tejido afecta la composición de la MEC en los estadios regenerativos y reparativos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición y distribución de componentes estructurales de la matriz extracelular de piel de ratón en estadios con distinta capacidad regenerativa y los efectos de la descelularización sobre estos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la composición y características estructurales de la matriz extracelular de la piel de ratón en estadio regenerativo (E16.5) y reparativo (Adulto).
2. Establecer un protocolo de descelularización de muestras de piel derivadas de ratones en estadio regenerativo (E16.5) y reparativo (Adulto).
3. Evaluar los efectos de la descelularización sobre la composición y características estructurales de la matriz extracelular de piel de ratón en estadio regenerativo (E16.5) y reparativo (Adulto).

METODOLOGÍA

El presente estudio está enmarcado en el proyecto de investigación Fondecyt Regular N°1200280 denominado “*Towards the development of novel scaffolds for tissue engineering and regeneration. A molecular and functional study of the extracellular matrix derived from animals with exceptional capabilities.*” Algunos de los resultados presentados en este proyecto han sido realizados en colaboración y su autoría es compartida. A continuación, se describe la metodología utilizada en el presente estudio y un esquema representativo del diseño experimental (**Figura 4**)

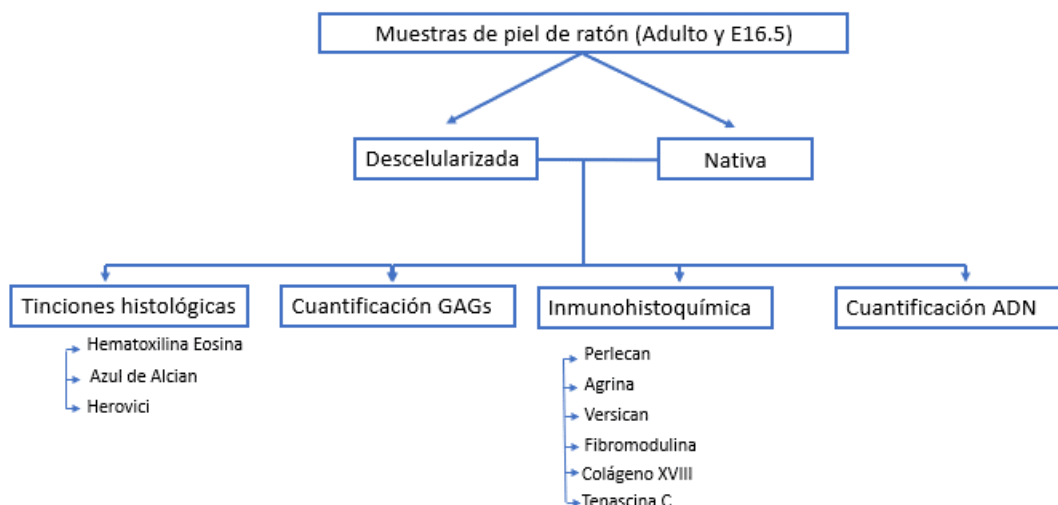


Figura 4. Diseño experimental.

1. Comparar la composición y características estructurales de la matriz extracelular de la piel de ratón en estadio fetal E16.5 y adulto.

1.1. Animales y recolección de piel

En el presente estudio se utilizaron ratones “*wild type*” machos y hembras de la cepa C57/BL6. La utilización de los animales fue aprobada por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad de Valparaíso (Ver ANEXO 1), los machos sólo fueron utilizados para las cruces. Brevemente, el número de animales a utilizar se calculó utilizando el programa G Power 3.1.9.7.(23) Para dicho cálculo se usaron como referencia resultados publicados de cuantificación de

glicosaminoglicanos en piel humana en condiciones nativas y descelularizadas (24). Asumiendo los valores de glicosaminoglicanos reportados por los autores de 27.23 ± 9.94 en condiciones nativas y $16.64 \text{ ug/mg} \pm 7.02$ en condiciones descelularizadas (promedio $\pm$ SD), con un poder de la prueba del 0.8 y 0.05 vel de significancia (prueba de dos colas), se obtuvo un tamaño muestral de $n=9$ animales para cada grupo. Las eutanasias de las hembras preñadas se llevaron a cabo con dióxido de carbono seguido de dislocación cervical. La obtención de piel control adulto fue obtenida de las hembras seguido de la eutanasia. La piel del lomo fue afeitada y luego tratada por dos minutos con crema depilatoria y enjuagada extensivamente, luego disectada con tijeras quirúrgicas y biopsiada con lápiz punzón de biopsias DERMA PUNCH® de 6mm (Dolphin medical, DM0802580).

Para la obtención de fetos E16.5, el día 0 de gestación se identificó por la presencia del tapón vaginal o presencia de espermatozoides en el frotis vagina. La piel de feto se disectó directamente del lomo de los fetos utilizando pinzas y tijeras quirúrgicas guardando cuidado de no rasgar el tejido.

1.2. Histología

Para todos los análisis histológicos posteriores, las muestras de piel control y descelularizadas fueron fijadas en 4% PFA en PBS por 24 horas a TA o methacarn (30% cloroformo, 60% metanol, 10% ácido acético glacial) por 4 horas a 4°C, deshidratadas en baterías crecientes de etanol, aclaradas en xilol y embebidas en parafina (Paraplast, Leica Biosystems) a 60°C. Se cortaron secciones de 5 μm de espesor en el micrótomos Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtomes (Sakura Fineteky) y fueron adheridas a portaobjetos con 0.1% poli-L-lisina (Sigma-Aldrich).

1.3. Estandarización anticuerpos y detección inmunohistoquímica de componentes de la matriz extracelular.

Los anticuerpos fueron estandarizados con distintas concentraciones de anticuerpo primario según lo sugerido por los proveedores, ver **ANEXO 2** para diluciones sugeridas epítome huésped. Para esto se utilizaron muestras de placenta y embrión correspondiente al día gestacional E13 y tráquea de ratón que se encontraban

disponibles en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso. Además, se utilizaron dos fijadores PFA 4% en PBS y methacarn con y sin recuperación antigénica en 10 mM citrato de sodio a pH 6.0 a 95°C por 20 minutos. La **Figura 5** representa un ejemplo del diseño para la estandarización de los anticuerpos.

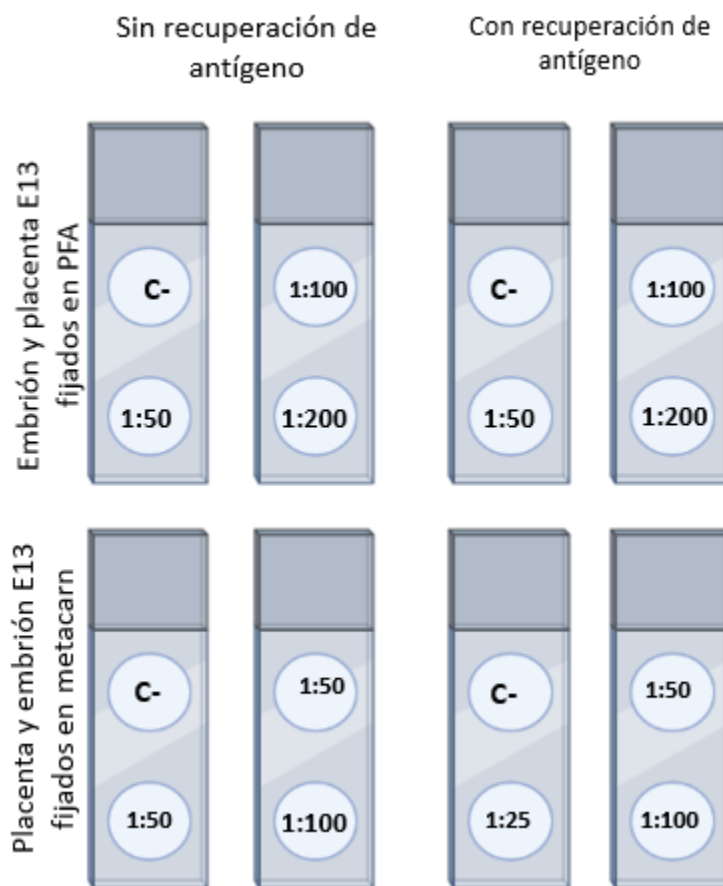


Figura 5. Diseño de experimento estandarización anticuerpos.

Finalmente, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas, cuando correspondió se hizo recuperación antigénica incubando los portaobjetos a 95°C por 30 min en solución de 10 mM citrato de sodio a pH 6.0. Luego, la peroxidasa endógena fue bloqueada con 3% peróxido de hidrógeno en PBS por 30 min a TA. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con Cas-Block (Thermo scientific) y suero normal de cabra (Gibco) por 30 min cada uno. A continuación, las muestras fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios en PBS con 0.3% (v/v) Tween 20 (Winkler) durante toda la noche a 4°C; datos resumidos en **Tabla 1**. Luego se lavó con 3 cambios de PBS a 60 RPM por

5 min cada uno y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo (Sigma-Aldrich) conjugado con HRP diluido 1:1000 en PBS por 1 hora a TA. La reacción fue revelada utilizando el kit NovaRED (Vector Laboratories). Luego del revelado se realizó la contra tinción con hematoxilina de Harris. Para todas las tinciones se realizó un control sin anticuerpo primario. Se capturaron las imágenes en el microscopio óptico Olympus CX43 acoplado a la cámara digital Euromex 4K Sony Ultra HD VC.3040.

Tabla 1 Resumen anticuerpos y condiciones de uso.

NOMBRE MOLÉCULA	CÓDIGO	FIJADOR	RECUPERACIÓN DE ANTÍGENO	DILUCIÓN
Tenascina C	AB108930	4% PFA	No	1:200
Versican	Abx100119	4% PFA	No	1:150
Perlecan (HSPG2)	Abx176806	Methacarn	No	1:50
Agrina	Abx129847	4% PFA	Si	1:100
fibromodulina	Abx004875	4% PFA	No	1:200
Colágeno XVIII cadena alfa	SAB4503212	4% PFA	No	1:50

1.4. Análisis morfológicos y tinción de proteínas de la MEC.

Para la detección histoquímica de componentes de la MEC, la morfología fue visualizada a través de la tinción de hematoxilina eosina (Hematoxilina C.I 75290- Arquimed, Eosina 900467 -De haen AG), los cGAGs se tiñeron con Azul de Alcian (Alcian Blue 8GX Merck millipore) a pH 2.5 por 1 hora, las fibras elásticas fueron visualizadas con orceína (Bdh chemicals) y las fibras colágenas I y III con la tinción de Herovicii (Azul de Anilina, AppliChem, Fucsina Acida Harleco®, Sigma-Aldrich) en todas las tinciones se omitió la tinción nuclear cuando se realizó semicuantificación densitométrica desde las imágenes.

1.5. Semicuantificación de imágenes

El análisis densitométrico se realizó en el software libre Image J con la herramienta de creación de macros para la automatización de los procesos (Ver **ANEXO 3**). Para estos

análisis se tomaron al menos 5 fotos de distintos campos con un n mínimo de piel de tres ratones distintos. Brevemente, se abre la herramienta de macros que graba todos los pasos a realizar "Plugin->Macro->Record" luego se utilizó la herramienta de deconvolución de colores "Image->Color->Colour deconvolution" utilizándose la sección

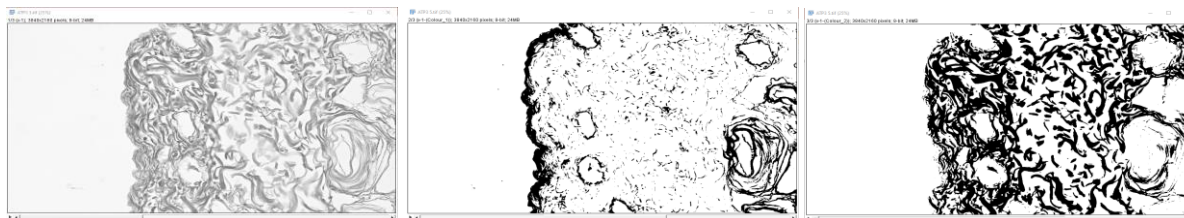


Figura 6: Ejemplo resultado de script creado para tinción de Herovici en piel de ratón adulto.

de "ROI" o región de interés, para esto se seleccionaron cada uno de los tres componentes de las tinciones desde una imagen representativa, en caso de que sólo se contara con dos colores de tinción, para el tercero se seleccionó el fondo. Los valores arrojados por el software fueron utilizados para crear el script automático. Se vuelve a abrir la herramienta "Record" y se hace la deconvolución, pero se selecciona "User defined" en vez de "ROI" y se utilizan los valores anteriormente arrojados. Luego se selecciona la ventana correspondiente al color deseado y se ajusta el umbral usando la herramienta "Image->Adjust->Threshold" evaluando el umbral que mejor se ajuste a las marcas observadas en las imágenes. Finalmente se creó una imagen compuesta creando un "Stack", utilizando la imagen original en blanco y negro y las imágenes de deconvolución de colores con los "thresholds" aplicados, de esta manera se cuantifican los valores seleccionando la misma área total para ambos colores desde la imagen original, una vez seleccionada el área se utilizó la herramienta "Measure" para cuantificar los pixeles. Los resultados fueron expresados en % de área.

1.6. Cuantificación de glicosaminoglicanos sulfatados.

Muestras congeladas de piel fetal (E16) y adulta en condiciones control y descellularizadas fueron liofilizadas por 24 horas a 0.05 Pa y -60°C (SJIA-10N, SJ Lab, Ningbo, China). El análisis de los sGAGs fue realizado con el Kit Blyscan (Biocolor) modificando levemente las instrucciones del proveedor. Brevemente, se extrajeron los glicosaminoglicanos de la matriz con papaína a 65°C por 18 horas, luego se centrifugó

a 10.000 x g. Se descartó el pellet y se agregaron 250 µL del reactivo de detección a tubos con 25 µL de la solución que contenía los GAGs, se agitó con vórtex cada 5 min x 30 min. Se centrifugó a 12.000 x g y se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet para su solubilización en 125 µL de la solución de disociación. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado (n=9) y leídos en el espectrofotómetro GENESYS 10 UV (Thermo Spectronic) a 656 nm. La concentración final de glicosaminoglicanos sulfatados se obtuvo de una curva de calibrado construida con el estándar provisto en el kit y analizada por triplicado ($r^2 = 0.99$ o mayor). Los resultados fueron expresados como promedio $\pm$ SE y estandarizados por peso seco.

2. Establecer un protocolo de descelularización de muestras de piel derivadas de ratones en estadio fetal (E16) y adulto.

2.1. Protocolo de descelularización de muestras de piel derivadas de ratones en estadio fetal E16 y adulto.

La estandarización del protocolo de descelularización se realizó en conjunto con el laboratorio del Dr. Tomás Egaña de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) (**ANEXO 1**). Se evaluaron 7 protocolos de descelularización en piel de adulto y tres protocolos de descelularización en el feto. Las muestras fueron procesadas según el protocolo de histología mencionado anteriormente 1.2 de la metodología y teñidas con hematoxilina eosina.

Muestras piel adulto

- 2.1.1 Buffer hipotónico Adulto: Se incubó por 24 horas a 25°C un corte de piel en buffer hipotónico (10 mM Tris; 0.1% EDTA) pH 7.8. Luego, se lavó con buffer salino fosfato (PBS) 3 veces por 5 min cada lavado. Se incubó con SDS 0.2% en 10 mM Tris pH 7.8 por 24 horas. Se lavó 3 veces con buffer 10 mM TRIS pH x 20 min cada uno, seguido de tres lavados con PBS 1X(25).
- 2.1.2 Triton X-100 0.1%, 0.05% y 0.01%: Se incubaron los cortes de piel de 6 mm con 0.1%, 0.05% o 0.01%. Esto se obtuvo diluyendo la solución de 0.1 % Triton X-

100 en KCl 1,5 M en 50 mM Tris pH 8. Se incubaron las muestras por 24 h. Luego se lavó con Tris 10 mM pH 8 por 3 h, finalmente se lavó con agua desionizada por 3 horas.(26)

2.1.3 Triton X-100 0.05% DNAsa: Se incubaron los cortes de piel con 0.05% Tritón X-100, KCl 0.75 M en 25 mM Tris (pH 8) por 16 horas. Luego se lavó con 500µL de 10 mM Tris (2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) y 50 µL de DNAsa 1 mg/mL pH 8 por 3 horas a temperatura ambiente a 80 rpm. Finalmente se lavó con agua desionizada por tres horas a TA a 80 RPM.

2.1.4 Tripsina al 0.1%: Se incubaron los cortes de piel de 6 mm con tripsina al 0.1%, EDTA 0.02% en PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ por 48 horas, cambiando la solución cada 24h. Se lavó con PBS 1x(27).

Muestras piel fetales

2.1.5 Triton X-100 0,1%, 0.05%y 0,01% Feto: Se incubaron los cortes de piel con 0.1%, 0.05% o 0.01% Tritón X-100. Esto se obtuvo diluyendo la solución de 0,1 % Triton X-100 en KCl 1,5 M en 50mM Tris pH8. Se incubó con la solución por 1 hora. Luego se lavó con Tris 10mM pH8 por 1 hora y finalmente se lavó con agua desionizada por 1 hora.

2.1.6 Triton X-100 0.05% Feto: Se incubaron los cortes de piel con 0.05% Tritón X-100, KCl 0,75 M en 25 mM Tris (pH 8) por 1 hora. Luego se lavó con 500µL de 10 mM Tris (2 mM CaCl₂ 2 mM MgCl₂) y 50 µL de DNAsa 1 mg/mL pH 8 por 1 hora a temperatura ambiente a 80 rpm. Finalmente se lavó con agua desionizada por 1 hora a TA a 80 RPM.

2.2. Evaluación de la descelularización, cuantificación de ADN.

Las muestras de piel control y descelularizadas con Tritón x-100 0.05% y con tratamiento de DNasa de adulto y feto fueron liofilizadas por 24 horas a 0.05 Pa y -60 °C (SJIA-10N, SJ Lab, Ningbo, China). Luego se realizó la extracción de ADN con el kit DNA Isolation Kit for Cells and Tissue (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN total fue cuantificado usando el kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit

(Invitrogen) en el espectrofotómetro de microplaca Epoch2 (BioTek Instruments, Vermont, USA). Los resultados fueron estandarizados por el peso seco de cada muestra (promedio $\pm$ SE). Además, se hizo electroforesis en gel de agarosa al 1% por 30 min a 100V, para ver la integridad del material extraído.

3. Evaluar los efectos de la descelularización sobre la composición y características estructurales de la matriz extracelular de piel de ratón estadio fetal (E16) y adulto.

3.1. Análisis morfológico, tinción de proteínas de la MEC e inmunohistoquímica.

Los efectos de la descelularización en la composición de la matriz extracelular de ratón en distintos estadios se evaluaron utilizando las técnicas descritas en el punto 1.4 a 1.6 de este mismo proyecto.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo en el software Graphpad Prism 9.3. Se evaluó la distribución normal a través del test de Shapiro-Wilk, la igualdad de varianzas, homocedasticidad e independencia de los datos para la determinación del test estadístico. Se estableció un grado de confianza del 95% y un error alfa del 5% para comparar los resultados entre las distintas condiciones experimentales. Dependiendo de la distribución de los datos se utilizó Test T, ANOVA 1 vía o Kruskal Wallis con post test de Dunn para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas se representaron en los gráficos mediante simbología de asteriscos: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Comparar la composición y características estructurales de la matriz extracelular de la piel de ratón en estadio fetal E16 y adulto.

Los distintos componentes de la matriz extracelular estudiados contribuyen a las propiedades mecánicas de la piel, además de ser importantes señalizadores moleculares. Para comparar la estructura de la piel en los estados con distinta capacidad regenerativa se llevó a cabo el análisis histológico por tinción de hematoxilina Eosina (**Figura 7A**), en el día E16 de desarrollo fetal se observaron solo dos capas en la piel, la epidermis y la dermis, esta segunda cualitativamente de menor tamaño que en el adulto. El día E16 no se observó la presencia de anexos de la piel, sin embargo, se evidenció la formación de la placoda del folículo piloso. En la piel de adulto se observó una mayor densidad de fibras teñidas con eosina en la dermis comparada con el feto, además de un tamaño mayor de la dermis y presencia de folículos pilosos, glándulas y ductos sebáceos. Para distinguir entre el colágeno tipo I y tipo III se utilizó la tinción de Herovici (**Figura 7B**), donde se puede observar las fibras de colágeno I de color fucsia y las fibras de colágeno III de color azul, en el feto el colágeno III se encontró principalmente distribuido entre las células epidérmicas y el colágeno uno en la dermis, encontrándose el primero cubriendo una mayor superficie de área ($p=0.0054$). Mientras que en el adulto se observó una distribución inversa a la de estos en el feto, encontrándose el colágeno III en la epidermis y rodeando los anexos de la piel y el colágeno I en la dermis, su abundancia en % de área fue significativamente mayor para el colágeno I en el adulto ($p<0.0001$). Además, se puede evidenciar desde el análisis densitométrico que la cantidad de colágeno III en % de área es mayor en el feto que en el adulto ($p < 0,0001$) ocurriendo el efecto inverso con respecto al colágeno I ($p= 0.0076$) (**Figura 7D**) lo cual a su vez se ve reflejado en la razón colágeno III/I que representa la proporción en la que se encuentran dichas moléculas (**Figura 7E**). Por otra parte, se analizó la presencia de fibras elásticas en ambas pieles utilizando la tinción de orceína (**Figura 7C**), estas sólo se encontraron en la piel de adulto, localizándose en la unión dermo-epidermal, formando parte importante del tejido conectivo de la dermis reticular y con presencia en dermis papilar y alrededor de las glándulas y ductos sebáceos.

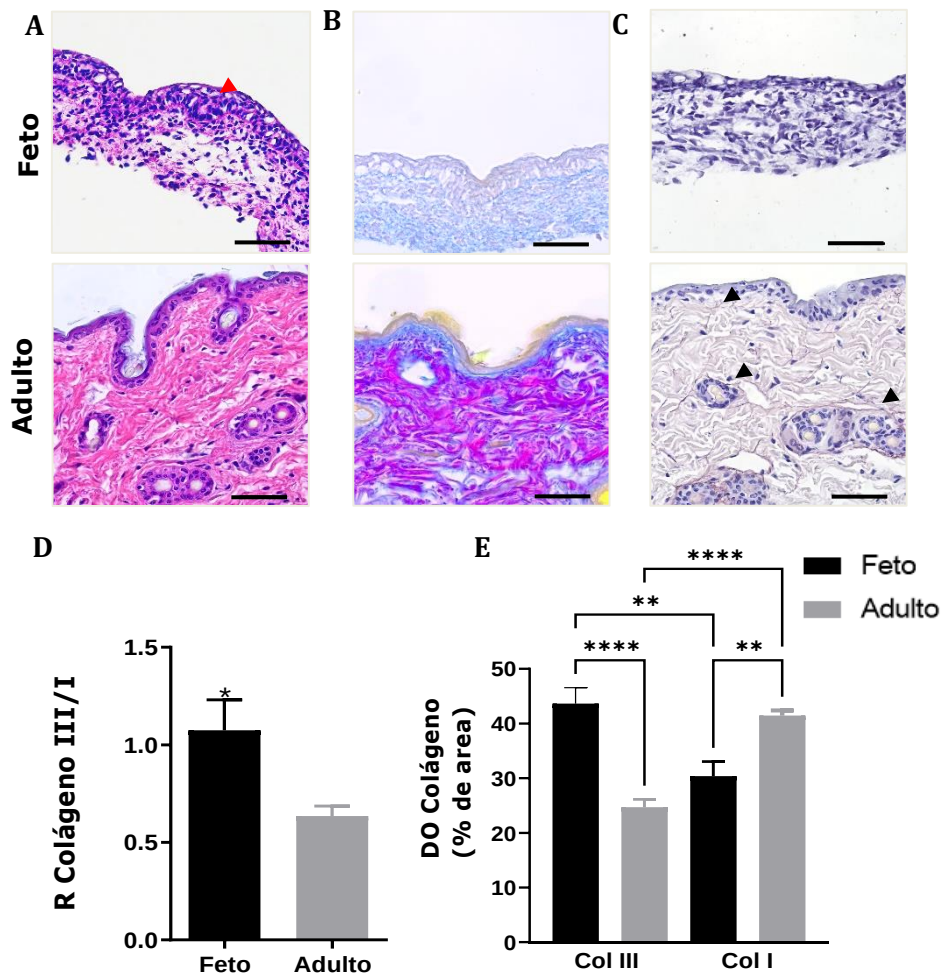


Figura 7. Características estructurales de la piel con distinta capacidad regenerativa y distribución de proteína fibrilares. (A) Visualización de la morfología con hematoxilina eosina, flecha roja indica formación de la placoda. (B) Tinción de Herovici para colágeno I (fucsia) y III (azul). (C) Tinción de fibras elásticas con Orceína, flechas negras indican presencia de fibras. (D) Análisis densitométrico de colágeno I y III (E) Razón Colágeno III/I. Resultados expresados como promedio + SEM. Test T no pareado o test de comparación múltiple Kruskal Wallis, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Barra de 50 μm magnificación 40X.

Otros componentes importantes de la matriz extracelular analizados fueron los glicosaminoglicanos, estos pueden dividirse en dos grandes grupos según la modificación de sus grupos secundarios, glicosaminoglicanos sulfatados (sGAGs) o carboxílicos

(cGAGs), siendo los segundos los más abundantes, razón por la cual se visualizaron mediante la tinción de azul de alcian a pH 2.5. Según se observa en la **Figura 8 A y B** los cGAGs se encuentran mayoritariamente distribuidos en la dermis de la piel fetal, mientras que en el adulto se encuentran predominantemente en el tejido epidermal. Adicionalmente, se realizó el análisis densitométrico de las imágenes, donde se observa una proporción significativamente mayor de estos componentes en el feto comparado con el adulto ($p < 0.001$), correspondiente a 1.5 veces más (**Figura 8C**). Por otra parte, los glicosaminoglicanos sulfatados fueron cuantificados con el kit Blyscan, el contenido de estos en la piel fetal correspondió a $200.8 \pm 6.07 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco y a $21.51 \pm 1.003 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, siendo significativamente más alto en el estadio regenerativo ($p < 0.0001$), alrededor de 10 veces mayor que en el adulto (**Figura 8D**).

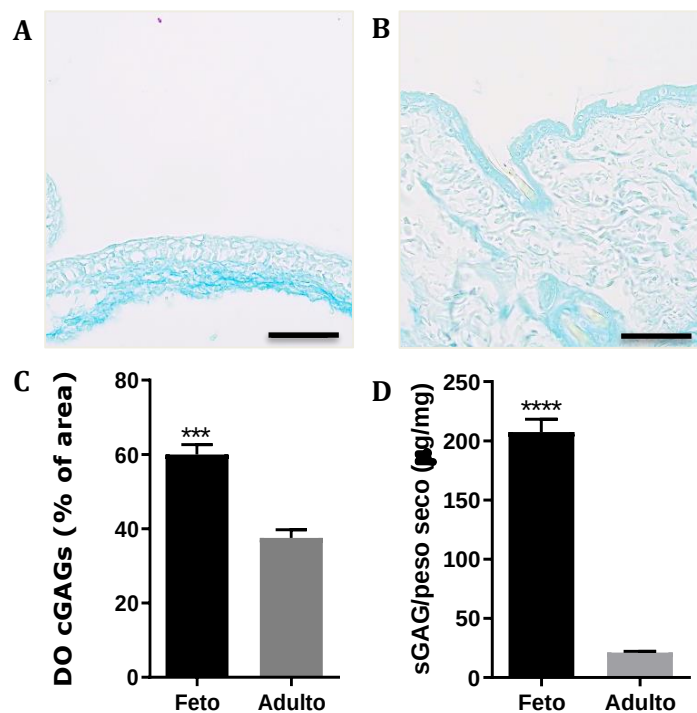


Figura 8. Distribución y cuantificación de glicosaminoglicanos en piel con distinta capacidad regenerativa. (A) Glicosaminoglicanos carboxilados en piel de feto (B) Glicosaminoglicanos carboxilados en piel de adulto ambos teñidos con azul de alcian a pH 2.5.(C) Análisis densitométrico de cGAGs (D) Cuantificación de glicosaminoglicanos sulfatados con Blyscan. Resultados representados como promedio + SEM analizados con Test T no pareado. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$. Barra de escala 50 μm .

Para la detección inmunohistoquímica de proteoglicanos y glicoproteínas de interés se estandarizaron los anticuerpos utilizando como control placenta y embrión correspondientes a la edad gestacional E13. Los anticuerpos fueron probados en dos fijadores y a distintas concentraciones según lo sugerido por el proveedor, además se determinó el tiempo de revelado para obtener la marca. Los resultados obtenidos de la estandarización de los anticuerpos pueden observarse en la **Figura 9**, donde en todos los casos se observa una marca específica en el tejido y no se obtuvo marca inespecífica en los controles negativos (ANEXO 4)

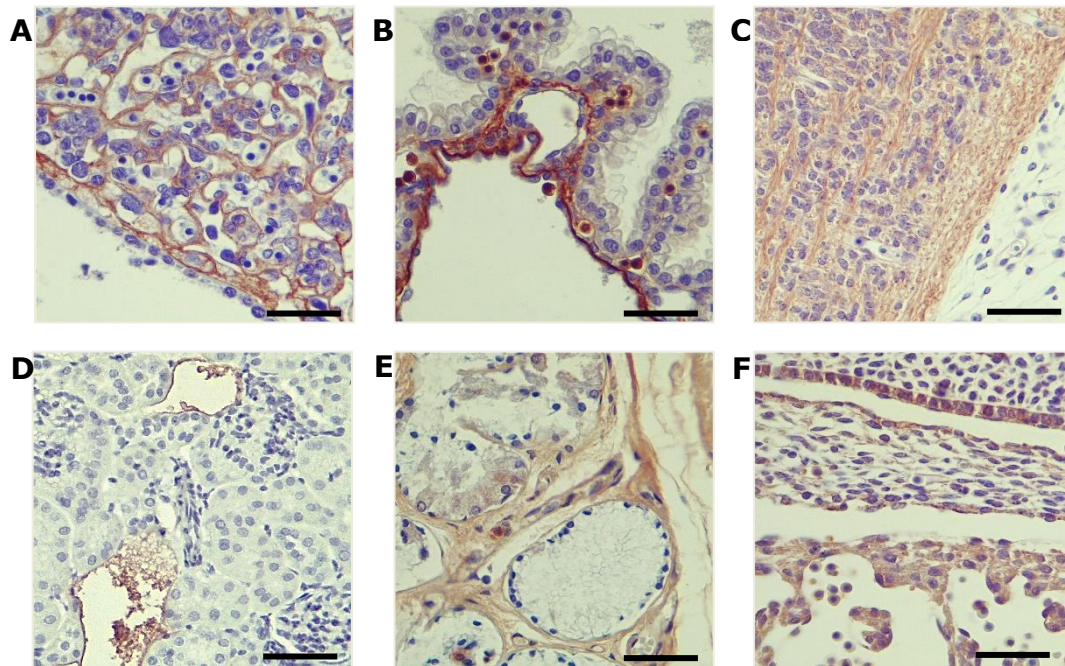


Figura 9: Estandarización anticuerpos para inmunohistoquímica. (A) Versican (B) Tenascina-C (C) Perlecan (D) Colágeno XVIII (E) Fibromodulina (F) Agrina. Aumento 40X, barra de tamaño correspondiente a 50 μm .

Se analizaron cualitativamente tres proteoglicanos de heparán sulfato; Perlecan, agrina y colágeno XVIII (**Figura 10A**), el condroitin sulfato Versican, el queratán sulfato Fibromodulina (**Figura 10B**) y la glicoproteína Tenascina C (**Figura 10C**). El Perlecan se encontró distribuido en un patrón granulado en la piel fetal, principalmente en el espacio pericelular de la epidermis y una tinción más homogénea y en menor medida en la dermis, mientras que, en el adulto, si bien se mantiene la distribución

mayoritariamente epidermal y en las glándulas y ductos sebáceos, esta corresponde a una marca homogénea y no a un patrón granulado. La agrina por su parte presenta una tinción de patrón granulado en las células en la sección epidermal tanto en el feto como en el adulto, así como también en las glándulas sebáceas. En contraste, el Colágeno XVIII demostró una menor deposición que el resto de las moléculas de heparán sulfato en el estadio regenerativo E16.5. En contraste, se observa una alta presencia, aparentemente ubicua a nivel dermal como epidermal en el adulto.

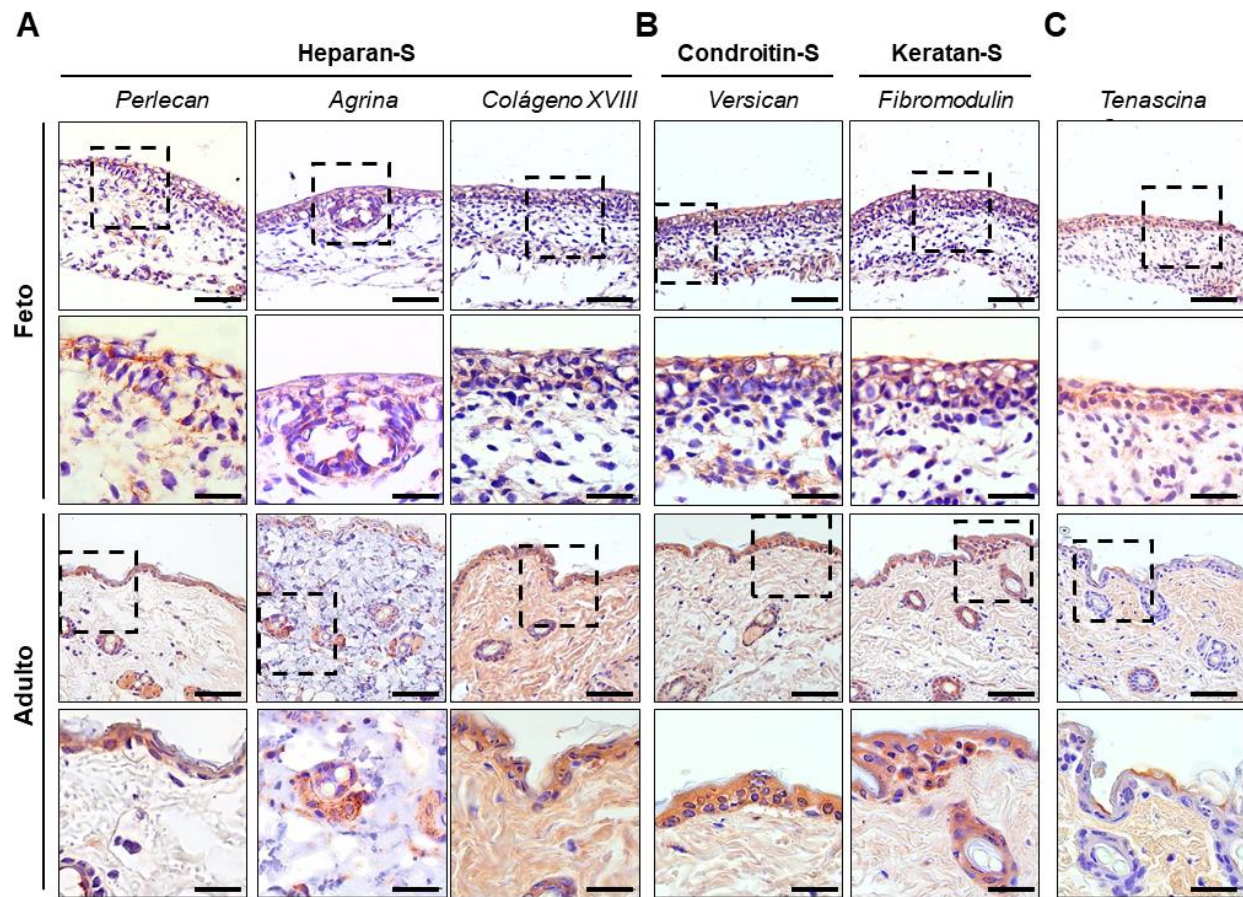


Figura 10. Detección inmunohistoquímica de proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz extracelular de piel de ratón de feto E16 y adulto. (A) Heparán sulfatos: Perlecan, Agrina y Colágeno XVIII. (B) Condroitin sulfato Versican y queratán sulfato Fibromodulina (C) Glicoproteína Tenascina C. Imágenes en 40X y 100X, cuadrado en línea punteada representa sector de magnificación. Barras indican 50 μ m y 30 μ m respectivamente.

Adicionalmente, el condroitin sulfato Versican y el queratán sulfato Fibromodulina, presentaron el mismo patrón de tinción celular en los anexos de la piel y la epidermis. En contraste, en el feto se observó una marcada tinción en la epidermis de ambas moléculas, pero sólo se observó una fuerte marca en la región dermal basal en este estadio para el Versican. Finalmente, la glicoproteína Tenascina C se encontró distribuida de manera discontinua en la superficie de las células que conforman la epidermis y rodeando los ductos sebáceos y con menor intensidad en la dermis. Mientras en el feto se encontró depositada mayoritariamente en la epidermis y menormente en la región profunda de la dermis.

Objetivo específico 2: Establecer un protocolo de descelularización de muestras de piel derivadas de ratones en estadio fetal (E16) y adulto.

Dado que para el análisis de los protocolos en piel fetal se necesitó usar un individuo por experimento, primero se analizó histológicamente con tinción de hematoxilina eosina el efecto de los protocolos sobre la estructura de la matriz extracelular de la piel de adulto y se evaluó la presencia de núcleos, con el fin de elegir el protocolo que eliminara las células, pero mantuviera mejor la estructura de la matriz más que es más rígida que la fetal. De los tres protocolos evaluados (**Figura 11**) el de Triton X-100 al 0.1% demostró mantener una mejor estructura de la matriz extracelular comparado con la tripsina y el buffer hipotónico, mientras que con el buffer hipotónico se mantuvieron algunas

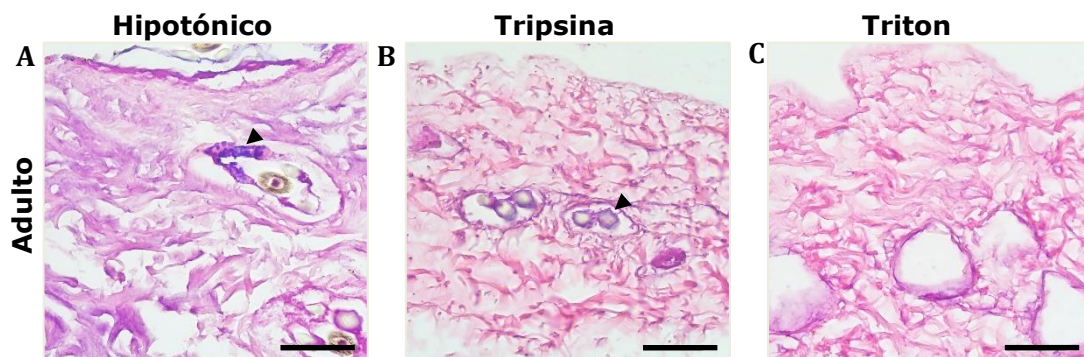


Figura 11 Evaluación protocolos de descelularización con distintos agentes en piel de ratón adulto. (A) Descelularización con solución hipotónica. (B) Descelularización con tripsina 0,1% (C) Descelularización con Triton X-100 al 0.1%. Barra correspondiente a 50 μ m, magnificación 40x.

estructuras celulares, como se observa por la presencia de núcleos en la **Figura 11A** con la tinción de hematoxilina eosina.

En base a los resultados histológicos obtenidos en el adulto se evaluaron distintas concentraciones de Triton X-100 que pudieran tener los efectos deseados tanto en la piel fetal como en piel de adulto. Al evaluar el protocolo de descelularización de Triton X-100 al 0.1% en el feto se observó que se pierde la integridad de la matriz de la dermis (**Figura 12B**). En contraste, cuando se bajó la concentración a 0.05% Triton X-100 se observó conservación de la integridad de la matriz tanto en la dermis como la epidermis del feto y el adulto y no se evidenció presencia de núcleos en la tinción con hematoxilina eosina (**Figura 12C**). Finalmente, se analizó la concentración menor de Triton x-100 correspondiente a 0.01%, obteniéndose buenos resultados en cuanto a eliminación de contenido celular y conservación de la estructura de la MEC en el caso del feto, sin embargo, se evidenció la presencia de células tanto a nivel de la epidermis como en los folículos y glándulas sebáceas, según se indica con flechas en la **Figura 12D**.

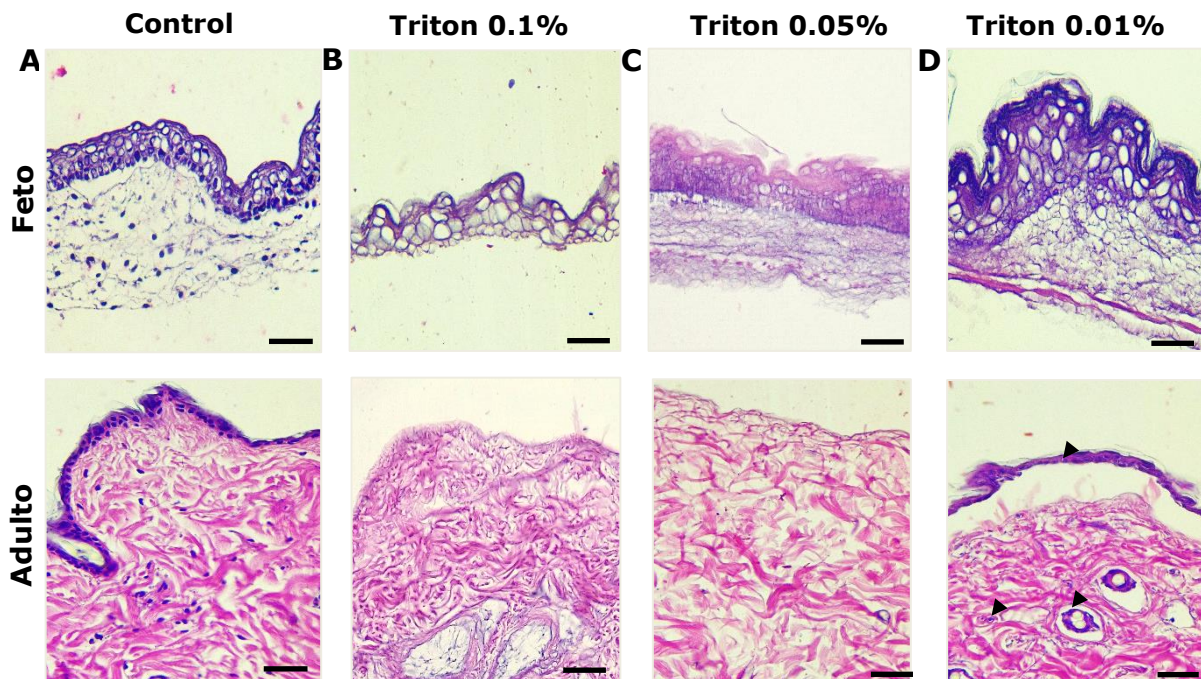


Figura 12. Estandarización protocolo de descelularización con Triton X-100 (A) Control, (B) 0.1% Tritón KCl, (C) 0.05% Tritón KCl, (D) 0.01% Tritón KCl. Imágenes adquiridas a 40X. Barra 50 μ m.

Objetivo específico 3: Evaluar los efectos de la descelularización sobre la composición y características estructurales de la matriz extracelular de piel de ratón en estadio fetal (E16) y adulto.

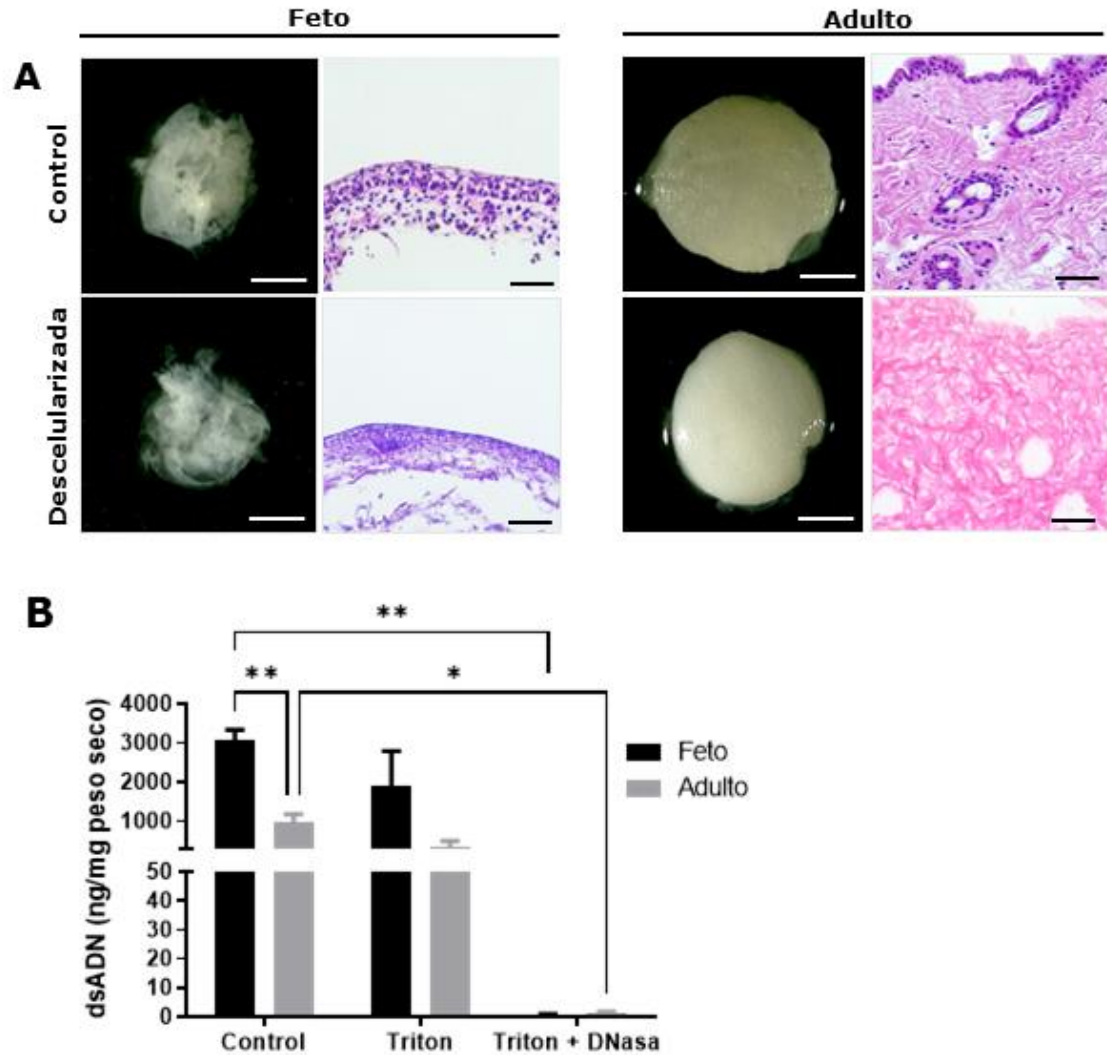


Figura 13. Biopsia de piel de feto y adulto control y descelularizadas y tinción H&E. (A) Apariencia macroscópica y microscópica de la piel fetal y adulta en condiciones nativas y descelularizadas con 0.05% Triton KCL tratada con DNAsa. (B) Cuantificación de ADN estandarizado por peso seco en muestras control, descelularizadas con 0.05% Triton KCL y descelularizadas con 0.05% Triton KCL + DNAsa (n=3). Escala representa 1 mm en imágenes macroscópicas y 50 μ m H&E.

Luego de la descelularización se procedió a cuantificar el ADN de las muestras (**Figura 13C**), se obtuvo una cantidad significativamente más alta de ADN en las muestras

controles fetales ($3071 \pm 266 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) que las adultas ($976 \pm 196 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) Por otra parte, se observó una disminución de este en las muestras tratadas con Triton X-100, a $1909 \pm 878 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco en el feto y $347 \pm 145 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco en el adulto, sin embargo, esta no fue significativa. En base a estos resultados se decidió añadir un paso de tratamiento con DNasa para eliminar el ADN libre dentro del tejido. El paso de tratamiento con DNasa permitió una eliminación significativa del contenido de ADN en las matrices dermales de adulto ($1.341 \pm 0.448 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) y feto ($0.079 \pm 0.257 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco). Además, se tomaron imágenes macroscópicas y se repitió la tinción de HE luego del tratamiento de DNasa

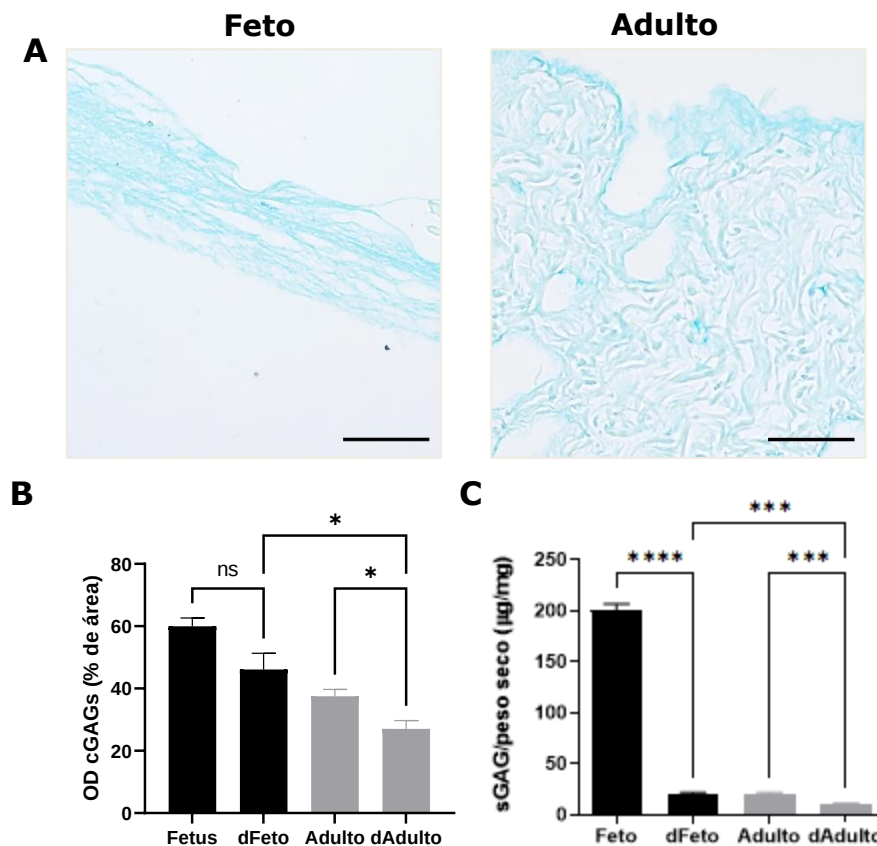


Figura 14. Distribución y cuantificación de Glicosaminoglicanos en muestras de piel descellularizadas. (A) Glicosaminoglicanos carboxilados en piel de feto y adulto teñidos con azul de alcian a pH 2.5 (B) Análisis densitométrico de cGAGs de muestras descellularizadas comparada con controles. (D) Cuantificación de sGAGs de muestras descellularizadas comparadas con controles. Resultados representados como promedio + SEM analizados con Test ANOVA una Vía y Kruskal-Wallis. ns: no significativo *p < 0.05 ***p < 0.0001. Barra de escala 50 μm .

para evaluar el efecto de esta sobre la estructura de la matriz. En ambos casos se observó una conservación de la estructura de la matriz luego del tratamiento (**Figura 13 A y B**). En adelante los experimentos se llevaron a cabo utilizando el protocolo de 0.05% Triton X-100 con DNasa.

También se analizó el efecto del proceso de descelularización sobre algunos componentes de la matriz extracelular. Se visualizó la distribución de los cGAGs con azul de alcian, observándose una disminución de estos en la dermis del feto y también una

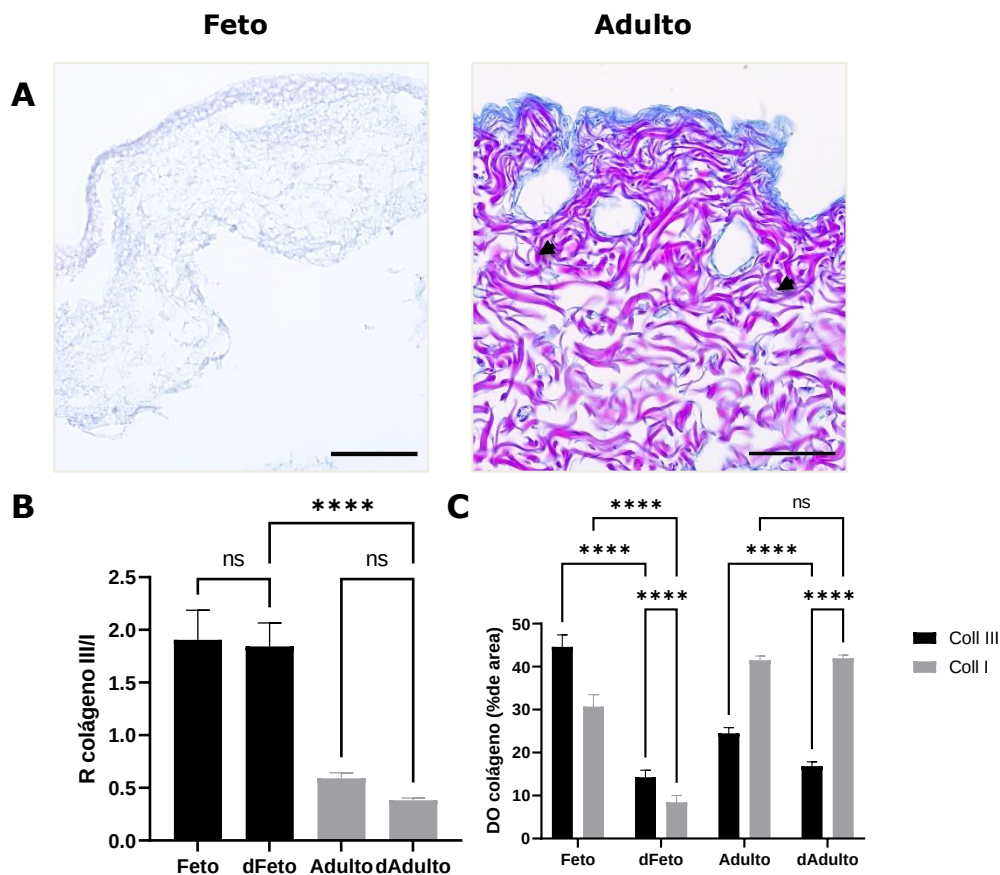


Figura 15. Distribución de colágeno I y III en matrices de piel descelularizada. (A) Tinción de Herovici para colágeno I (fucsia) y III (azul) en matriz de piel descelularizada de feto y adulto. (B) Razón Colágeno III/I en matrices descelularizadas comparadas con controles. (C) Análisis densitométrico, % de área de colágeno I y III. Resultados expresados como promedio + SEM. Anova una vía y Mixed effects model (no paramétrico), ns: no significativo, **** $p < 0.0001$. Flecha indicativa de folículo piloso y glándula sebácea. Barra de 50 μ m magnificación 40X.

disminución en la epidermis y anexos en el adulto (**Figura 14A**). Esto se vio reflejado en el análisis densitométrico de las imágenes donde se observa una disminución en el feto del 23%, no significativa y una disminución del 28% significativa en el adulto ($p=0.0246$) (**Figura 14B**). De la cuantificación de sGAGs (**Figura 14C**), se evidenció una disminución significativa de estos en el feto obteniéndose $21.42 \pm 1.08 \mu\text{g/mg}$ de peso seco ($p<0.0001$) y de $10.98 \pm 0.8 \mu\text{g/mg}$ de peso seco en el adulto ($p=0.0002$), correspondientes a una disminución de 89.33% y un 48.96% respectivamente, siendo a su vez diferentemente significativas entre si ($p=0.0148$).

En cuanto a la evaluación del colágeno I y III por tinción de Herovici (**Figura 15A**), se observa una disminución de ambos colágenos a simple vista por la disminución de la tinción comparado con el control (**Figura 7**), si bien no se logra identificar correctamente su localización desde la imagen, desde el análisis densitométrico se logró identificar que la razón entre ambos componentes se mantuvo (**Figura 15B**), pero hubo una disminución significativa de ambos componentes ($p<0.0001$). En el caso del adulto, no se observaron efectos sobre el colágeno I, sin embargo, se observó una disminución significativa del colágeno III ($p<0.0001$) principalmente alrededor de las glándulas sebáceas y el folículo piloso, ambos indicados por flechas en la imagen (**Figura 15C**).

DISCUSIÓN.

La MEC es una compleja red de moléculas que da soporte y participa en la adhesión, diferenciación y proliferación celular de los tejidos. Esta está constituida principalmente por proteínas fibrilares, proteoglicanos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (28). Las diferencias entre los mecanismos de cicatrización del feto y el adulto son múltiples además de ocurrir como cambios sutiles en el tiempo, existiendo varios estudios que describen los cambios ocurridos en estos además de distintos ensayos experimentales que han probado algunas manipulaciones que permiten reducir la cicatrización en el adulto (7). Sin embargo, todavía existe un vacío en cuanto a las características de la MEC en condiciones normales, así como los efectos de los procesos de descelularización sobre matrices dermales de origen fetal. Como se puede observar de la tinción de hematoxilina eosina en el estadio regenerativo E16.5 se comienza a observar la formación de la placoda (flecha roja), que corresponde al primer paso para la formación del folículo piloso, donde los queratinocitos epidermales se agrupan, luego crecen y se elongan para continuar el proceso de desarrollo del folículo (29,30). Además, se observó una menor densidad de fibras en la matriz de la dermis, que se coincide con lo encontrado para las fibras colágenas en la tinción de Herovici. Mientras que en el adulto se observan ya formados completamente los folículos pilosos, glándulas y ductos sebáceos, la proporción de la dermis es notablemente mayor que en el feto con una mayor cantidad de tejido conjuntivo.

De acuerdo con la tinción de Herovici la cantidad total de ambos colágenos es menor en el feto comparado con el adulto, esto dado por la intensidad de la tinción, razón por la cual además de expresar los valores como % de área se realizó la transformación de estos valores a razón colágeno III/I a razón colágeno. En la literatura, se observa una mayor cantidad de colágeno III en el sitio de la herida fetal comparada con el adulto, además se ha observado que la disminución de este está asociada a una mayor generación de cicatrices (31). A su vez, se ha asociado una mayor razón de colágeno III/I con el fenotipo regenerativo observado en el feto, en parte asociado a que una mayor cantidad de colágeno I se asocia a una mayor contractibilidad de la herida y es más difícil de remodelar (14).

Además del colágeno, las fibras elásticas corresponden a otro tipo de macromolécula fibrilar presente en la piel que se ha asociado a una mejor regeneración de la piel en adultos. Si bien se ha reportado que en la piel de ratón la tropoelastina se empieza a detectar en el día embrionario E10 (32), contrario a lo observado en la piel humana donde esta no es detectada en el periodo intrauterino (33). Los resultados reportados aquí indican que al menos hasta el día E16.5 la tropoelastina todavía no ha madurado en fibras elásticas. Mientras que la localización de las fibras elásticas en el adulto poseen una distribución similar a la piel humana, en el ratón también se observan a la altura de la unión dermo-epidermal, no así en la piel humana (33). Una mayor biodisponibilidad de tropoelastina podría estar asociada a una mejor reorganización y formación de las fibras elásticas durante la formación de heridas, ya que el recambio y la reorganización de estas en el adulto es lenta y poco eficiente y se ha asociado a una mayor formación de cicatrices(34) (35).

Longaker y colaboradores describieron que el fluido de las heridas fetales poseen una alta cantidad de ácido hialurónico (HA) que no poseen las heridas de adulto y que este glicosaminoglicano está asociada a un microambiente que promueve la motilidad celular y la proliferación, que contribuye al fenotipo observado en el periodo fetal(14)(22). Los resultados aquí expuestos demuestran que, independientemente de lo observado en los procesos asociados a la generación de heridas, el HA, detectado por azul de alcian a pH 2.5, se encuentra en mayores cantidades en el feto que en el adulto, encontrándose principalmente en la dermis. Por tanto, este microambiente que promueve la regeneración por sobre la cicatrización podría ser una propiedad intrínseca de la piel fetal en condiciones nativas.

Adicionalmente, se ha demostrado que heridas adultas trasplantadas al ambiente fetal mantiene el fenotipo de reparación con generación de cicatrices, observándose, sin embargo, que esto no ocurre en la interfase adulto-feto donde regenera sin cicatrices (22)(36). En adición a eso, la piel fetal humana ha demostrado mantener su capacidad regenerativa cuando es trasplantada en ratones adultos atímicos (10)(37). Estos resultados sugieren que el entorno extracelular posee componentes clave para la regeneración libre de cicatrices. Estudios recientes han demostrado que el grado de sulfatación de la matriz extracelular de piel de ratón adulto sirve como guía para la

restauración o inhibición de la formación de miembros completos en axolote (21), Según lo aquí reportado se encontró que la cantidad de glicosaminoglicanos sulfatados fue significativamente más alta en la matriz fetal que en la del adulto, siendo hasta 10 veces mayor. Sin embargo, no sólo el grado de sulfatación es relevante si no los patrones de sulfatación de estos, ya que de esta manera se puede regular la biodisponibilidad de distintos factores de crecimiento, elucidar estos mecanismos permitiría utilizar sustitutos de sGAGs en las matrices dermales para emular lo encontrado en la piel fetal(38).

Las moléculas de heparán sulfato, por ejemplo, pueden unirse a una importante cantidad de proteínas en la célula, a la ECM, además de factores de crecimiento (FGF, VEGF, TGF- β , PDGF, entre otros) y citoquinas (ILs, TNF- α , Wnt entre otros), sirviendo así de reservorios y modulando la proliferación y migración, por nombrar algunos(39).

Distintos proteoglicanos sulfatados fueron evaluados también por métodos inmunohistoquímicos. Se describió la presencia y distribución de tres proteoglicanos de heparán sulfato en la MEC del feto E16.5 y adulto. La agrina, ha sido asociada a la regeneración osteocondral y de corazón a largo plazo (40) (41) y más recientemente se ha asociado a la regeneración de la piel mejorando la mecanorecepción en el sitio de la herida en adultos, mostrando una distribución similar a la aquí reportada (42). El perlecan, por su parte contiene en su secuencia un inhibidor de la angiogénesis llamado endorepentina, además de poseer dominios de unión a distintos factores implicados en la regeneración como lo son FGF, PDGF, VEGF y BMP, interacciones que promueven en el embrión la proliferación, diferenciación y desarrollo del tejido(43). Mientras que en el adulto se ha sugerido estar asociado al ciclo del folículo piloso. El patrón observado en la piel fetal tanto de perlecan como de agrina sugieren la posibilidad de que estos se encuentran almacenados como gránulos en las células epiteliales y secretados para regular el desarrollo del tejido en este estadio del desarrollo. Adicionalmente, el colágeno XVIII, también heparán sulfato, posee un fragmento en su región C-terminal que sirve como un reservorio de endostatina, una molécula ampliamente conocida por su capacidad anti-angiogénica vía supresión de la proliferación y migración de las células endoteliales. Se ha descrito que los ratones knock out para Colágeno XVIII poseen una respuesta acelerada en la regeneración de heridas, aunque asociadas a una mayor

desorganización del tejido. En contraste, su sobre expresión ha sido asociada a un retraso en la cicatrización de heridas y pérdida de la integridad de esta, asociada al desprendimiento de la epidermis(44). Adicionalmente, es una de las moléculas que se deposita temprano durante la re-epitelización en ratones, sugiriéndose como una molécula de anclaje para el colágeno IV (45). Según los resultados obtenidos, su expresión es menor en el feto que en el adulto y localizada principalmente en la epidermis, donde podría favorecer la re-epitelización del tejido y favorecer la cicatrización, no así en el adulto donde se observa una mayor presencia de esta. Sin embargo, más estudios son necesarios para evaluar la contribución de estas moléculas a la regeneración libre de cicatrices en el feto.

La fibromodulina, un queratán sulfato, ha demostrado ser esencial en el fenotipo de regeneración sin cicatrices. Cuando es usada de manera exógena en heridas de adulto esta es capaz de revertir la generación de cicatrices, adquiriendo un fenotipo "*Fetal like*" (15,16). En este estudio se encontró que esta se encuentra expresada en la piel fetal en condiciones nativas sin heridas. Según reportado por otros autores el versican en el adulto ha sido relacionado con la maduración y el ciclo del desarrollo del folículo piloso, aquí se demuestra su expresión en la epidermis y dermis de la piel fetal en el día E16.5, cuyo rol podría ser similar al descrito en el adulto dado que en esta etapa del desarrollo se comienza la formación de la placoda que dará origen a los folículos (46)(47). Durante el proceso de reparación de la piel adulta, los queratinocitos son la principal fuente de deposición de Tenascina C, glicoproteína con varias repeticiones de motivos proteicos EGF-like que participan del proceso de remodelación (48). Aunque existe una vasta información del rol de esta proteína en el proceso de regeneración, en este trabajo se describió su presencia en la piel de feto y adulto en condiciones normales, libre de daño. Aunque en el adulto su presencia fue menor y más localizada, se ha reportado su disminución asociada al envejecimiento en ratones adultos y se ha asociado a la integridad de la MEC(49). Mientras que la expresión encontrada en el embrión podría estar asociada a la remodelación del tejido (48)

Interesantemente, la mayoría de las moléculas evaluadas por inmunohistoquímica se encontraron principalmente localizadas entre las células epidérmicas y los anexos de la

piel en el adulto, lo cual puede guardar relación con la capacidad de las heridas superficiales de regenerar sin cicatrices, no así las heridas que comprenden todas las capas de la piel.

Según Neishaburi y colaboradores, existen distintos pasos que se deben seguir o cumplir para la generación de constructos tridimensionales a partir de tejidos descelularizados. Primero se encuentra la elección del tejido apropiado a descelularizar, luego un protocolo efectivo con alta eficiencia de descelularización que permita disminuir la inmunogenicidad del constructo, seleccionar un proceso de esterilización biocompatible, optimizar los procesos, evaluar los efectos sobre la dMEC y modificar la matriz para mejorar sus propiedades. Luego de esto proceder a los ensayos *in vivo*, *in vitro* y ensayos clínicos(50).

En cuanto a la selección del protocolo de descelularización, se ha descrito que los distintos agentes utilizados pueden afectar de distinta manera las propiedades de la matriz, así como obtener distintos resultados(50,51). Por su parte, los buffers hipotónicos suelen mantener mejor la integridad de la matriz extracelular, pero tener baja eficiencia para la eliminación del debris celular, razón por la cual se utilizó además una concentración baja de SDS, sin embargo, estas en conjunto no fueron suficientes para eliminar por completo las células, lo que se tradujo en la observación de núcleos en el tejido(26,50). El caso de la tripsina se ha determinado que esta tiene mayor efecto sobre la estructura de la matriz ya que existe una ruptura de los enlaces proteicos, esto también se vio reflejado en los resultados obtenidos en los protocolos evaluados en el adulto. Por su parte en la literatura se ha descrito el Triton X-100 como un detergente suave que permite eliminar efectivamente el debris celular manteniendo la integridad de la ECM usando concentraciones de hasta 0.5% (26). Según los resultados aquí expuestos, dado que la piel fetal es más delgada y menos rígida, con menos cantidad de colágeno y sin presencia de fibras elásticas, se debió utilizar una concentración más baja de Triton que permitiera mantener las características de la matriz.

Crapo y colaboradores sugirieron, basándose en la literatura disponible que el estándar para la descelularización de un tejido debe ser una cantidad de dsADN menor a 50 ng por mg de ECM seca, que no se pueda visualizar material nuclear en tinciones de HE o

DAPI y alternativamente fragmentos de ADN menores a 200 pares de bases (52). Por otra parte, la evaluación macroscópica se ha utilizado como primer acercamiento para evaluar la transparencia de las matrices descelularizadas. Según los resultados obtenidos, se observa la transparencia de ambas matrices con el protocolo seleccionado, así como también una remoción de dsADN por bajo los niveles máximos aceptados descritos anteriormente, así como tampoco se visualizó restos celulares ni material nuclear.

En conjunto con el análisis llevado a cabo anteriormente respecto a los distintos roles de las moléculas de la MEC en los procesos de regeneración. Si bien tanto en el adulto como en el feto se observó una disminución de HA, los resultados obtenidos en el feto no fueron significativos, lo cual puede contribuir a mantener el microambiente descrito para las pieles fetales (14). Sin embargo, los sGAGs se vieron disminuidos significativamente, alcanzando valores similares a los reportados para la piel nativa de adulto. Estos resultados podrían modificar la disponibilidad de factores de crecimiento y su biodisponibilidad, sin embargo, se ha sugerido en la literatura el uso de sGAGs sintéticos en conjunto con andamios para la regeneración que permitan mejorar las propiedades de estos. Se observó que el protocolo estandarizado para las matrices dermales tuvo efectos significativos sobre el colágeno III tanto en el feto como en el adulto, no así en el colágeno I. Las matrices ricas en colágeno I han sido sugeridas como barreras que impiden la contracción de la herida.

Una de las limitaciones de este estudio es que se llevó a cabo la cuantificación de algunas moléculas de manera semicuantitativa y si bien, en la actualidad sigue siendo un método aceptado para la cuantificación de moléculas desde imágenes. Por una parte, no es posible determinar el punto en el cual la tinción se encuentra "saturada" y por otra, el uso del "threshold" introduce un sesgo asociado a que la información se transforma en binaria, 0 y 255, o blanco y negro, perdiéndose la información de la intensidad de los píxeles. Sin embargo, corresponde a un método eficaz cuando no se cuenta con otros métodos de cuantificación. Adicionalmente, otros estudios fueron realizados de manera paralela, pero no se encuentran incluidos en este trabajo, que corresponden a caracterización mecánica de la matriz, capacidad fluídica, lípidos de membrana, proteínas totales, entre otros.

En conjunto la descripción de las moléculas de la MEC en condiciones nativas que comprende este trabajo sienta una base para el estudio de los efectos que puedan tener al utilizar matrices dermales fetales en regeneración de tejido, siendo necesario evaluar protocolos de esterilización y sus efectos sobre las moléculas de la matriz de manera cuantitativa para su posterior uso *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSIONES

1. Se describió la diferencia espacio-temporal del HA, cGAGs, sGAGs, Agrina, Colágeno XVIII, Perlecan, Fibromodulina, Versican y Tenascina C en la matriz extracelular de piel de ratón con distinta capacidad regenerativa en condiciones nativas, que puede estar asociada a las distintas capacidades de regeneración.
2. Se estableció un protocolo para la descelularización de piel de ratón fetal y adulta, correspondiente a incubación con 0.05% Tritón KCl con tratamiento de DNasa.
3. Se logró obtener los estándares mínimos necesarios de cantidades de dsADN menor a 50 ng/mg de peso seco para la generación de matrices dermales de origen fetal para su uso posterior en IT.
4. Se determinaron los efectos del protocolo de descelularización estandarizado sobre moléculas de la MEC.
 - I. Disminución significativa de cGAGs en la piel de adulto.
 - II. Disminución significativa de sGAGs en ambas pieles.
 - III. Disminución de colágeno III en ambas matrices y de colágeno I en el feto, sin efectos significativos sobre la razón Col III/I.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MWJ. Skin scarring. *Br Med J*. 2003;326(7380):88–92.
2. Silva V, Marcoleta A, Silva V, Flores D, Aparicio T, Aburto I, et al. Prevalencia y perfil de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de úlceras crónicas infectadas en adultos. *Rev Chil infectología*. 2018;35(2):155–62.
3. Kawasumi A, Sagaqa N, Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals. *Curr Top Microbiology Immunol*. 2013;367:33–49.
4. Roig-Rosello E, Rousselle P. The human epidermal basement membrane: A shaped and cell instructive platform that aging slowly alters. *Biomolecules*. 2020;10(12):1–32.
5. Ochoa MT, Loncaric A, Krutzyk SR, Becker TC, Modlin RL. “Dermal dendritic cells” comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol [Internet]*. 2008;128(9):2225–31.
6. Haydont V, Bernard BA, Fortunel NO. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech Ageing Dev [Internet]*. 2019;177(March 2018):150–6.
7. Moore AL, Marshall CD, Barnes LA, Murphy MP, Ransom RC, Longaker MT. Scarless wound healing: Transitioning from fetal research to regenerative healing. *Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018;7(2).
8. Pratsinis H, Mavrogonatou E, Kletsas D. Scarless wound healing: From development to senescence. *Adv Drug Deliv Rev [Internet]*. 2019;146:325–43.
9. Ihara S, Motobayashi Y, Nagao E, Kistler A. Ontogenetic transition of wound healing pattern in rat skin occurring at the fetal stage. *Development*. 1990;110(3):671–80.
10. Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP. Mammalian fetal organ regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005;93:83–100.
11. Whitby DJ, Ferguson MWJ. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development*. 1991;112(2):651–68.
12. Monavarian M, Kader S, Moeinzadeh S, Jabbari E. Regenerative Scar-Free Skin

- Wound Healing. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2019;25(4):294–311.
13. Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci.* 1994;107(5):1159–67.
 14. Satish L, Kathju S. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010(1).
 15. Zheng Z, James AW, Li C, Jiang W, Wang JZ, Chang GX, et al. Fibromodulin reduces scar formation in adult cutaneous wounds by eliciting a fetal-like phenotype. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(May).
 16. Zheng Z, Zhang X, Dang C, Beanes S, Chang GX, Chen Y, et al. Fibromodulin Is Essential for Fetal-Type Scarless Cutaneous Wound Healing. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2824–32.
 17. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc.* 2016;11(10):1775–81.
 18. Chantre CO, Hoerstrup SP, Parker KK. Engineering biomimetic and instructive materials for wound healing and regeneration. *Curr Opin Biomed Eng [Internet].* 2019;10:97–106.
 19. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials [Internet].* 2007;28(34):5100–13. Available from:
 20. Przekora A. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro? *Cells.* 2020;9(7):1–29.
 21. Phan AQ, Lee J, Oei M, Flath C, Hwe C, Mariano R, et al. Positional information in axolotl and mouse limb extracellular matrix is mediated via heparan sulfate and fibroblast growth factor during limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration.* 2015;2(4):182–201.
 22. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MWJ, Lorenz HP, Harrison MR, Adzick NS. Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation. *Ann Surg.* 1994;219(1):65–72.
 23. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res*

Methods. 2007 May;39(2):175–91.

24. Bondioli E, Fini M, Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M, Cenacchi G, et al. Development and evaluation of a decellularized membrane from human dermis. *J Tissue Eng Regen MED* [Internet]. 2012;8(4):325–36. Available from:
25. Silva AC, Oliveira MJ, McDevitt TC, Barbosa MA, Nascimento DS, Pinto-do-Ó P. Comparable Decellularization of Fetal and Adult Cardiac Tissue Explants as 3D-like Platforms for In Vitro Studies. *J Vis Exp*. 2019;(145):1–8.
26. Dussoyer M, Michopoulou A, Rousselle P. Decellularized scaffolds for skin repair and regeneration. Vol. 10, *Applied Sciences* (Switzerland). 2020.
27. Liu GF, He ZJ, Yang DP, Han XF, Guo TF, Hao CG, et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(15):1398–406.
28. Huang J, Heng S, Zhang W, Liu Y, Xia T, Ji C, et al. Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2022;128:137–44.
29. Forni MF, Trombetta-Lima M, Sogayar MC. Stem cells in embryonic skin development. *Biol Res*. 2012;45(3):215–22.
30. Duverger O, Morasso MI. Epidermal patterning and induction of different hair types during mouse embryonic development. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2009;87(3):263–72.
31. Volk SW, Wang Y, Mauldin EA, Liechty KW, Adams SL. Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(1):25–37.
32. Egging DF, Van Vlijmen I, Starcher B, Gijzen Y, Zweers MC, Blankevoort L, et al. Dermal connective tissue development in mice: An essential role for tenascin-X. *Cell Tissue Res*. 2006;323(3):465–74.
33. Coolen NA, Schouten KCWM, Middelkoop E, Ulrich MMW. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(1):47–55.
34. Baumann L, Bernstein EF, Weiss AS, Bates D, Humphrey S, Silberberg M, et al. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthetic Surg J Open Forum*. 2021;3(3):1–8.
35. Cohen BE, Geronemus RG, McDaniel DH, Brauer JA. The role of elastic fibers in

- scar formation and treatment. *Dermatologic Surg.* 2017;43:S19–24.
36. Sullivan KM, Meuli M, MacGillivray TE, Adzick NS. An adult-fetal skin interface heals without scar formation in sheep. *Surgery.* 1995;118(1):82–6.
 37. Whitby DJ, Longaker MT, Harrison MR, Adzick NS, Ferguson MWJ. Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *J Cell Sci.* 1991;99(3):583–6.
 38. Freudenberg U, Sommer JU, Levental KR, Welzel PB, Zieris A, Chwalek K, et al. Using mean field theory to guide biofunctional materials design. *Adv Funct Mater.* 2012;22(7):1391–8.
 39. Dreyfuss JL, Regatieri C V., Jarrouge TR, Cavaleiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: Structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):409–29.
 40. Eldridge SE, Barawi A, Wang H, Roelofs AJ, Kaneva M, Guan Z, et al. Agrin induces long-term osteochondral regeneration by supporting repair morphogenesis. *Sci Transl Med.* 2020;12(559).
 41. Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, Shadrin IY, Umansky KB, Yifa O, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nat Publ Gr [Internet].* 2017;547(7662):179–84.
 42. Chakraborty S, Sampath D, Yu Lin MO, Bilton M, Huang CK, Nai MH, et al. Agrin-Matrix Metalloproteinase-12 axis confers a mechanically competent microenvironment in skin wound healing. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–18.
 43. Hayes AJ, Farrugia BL, Biose IJ, Bix GJ, Melrose J. Perlecan, A Multi-Functional, Cell-Instructive, Matrix-Stabilizing Proteoglycan With Roles in Tissue Development Has Relevance to Connective Tissue Repair and Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10(April):1–23.
 44. Seppinen L, Sormunen R, Soini Y, Elamaa H, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T. Lack of collagen XVIII accelerates cutaneous wound healing, while overexpression of its endostatin domain leads to delayed healing. *Matrix Biol.* 2008;27(6):535–46.
 45. Maeba T, Yonezawa T, Ono M, Tomono Y, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, et al. Collagen XVIII deposition in the basement membrane zone beneath the newly forming epidermis during wound healing in mice. *Acta Med Okayama.* 2019;73(2):135–46.

46. Sorrell JM, Carrino DA, Baber MA, Caplan AI. Versican in human fetal skin development. *Anat Embryol (Berl)*. 1999;199(1):45–56.
47. Du Cros DL, LeBaron RG, Couchman JR. Association of versican with dermal matrices and its potential role in hair follicle development and cycling. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1995;105(3):426–31.
48. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3–4):287–310.
49. Choi YE, Song MJ, Hara M, Imanaka-Yoshida K, Lee DH, Chung JH, et al. Effects of tenascin c on the integrity of extracellular matrix and skin aging. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–17.
50. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10(April):1–21.
51. Farrokhi A, Pakyari M, Nabai L, Pourghadiri A, Hartwell R, Jalili R, et al. Evaluation of Detergent-Free and Detergent-Based Methods for Decellularization of Murine Skin. *Tissue Eng - Part A*. 2018;24(11–12):955–67.
52. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(12):3233–43.

ANEXOS

ANEXO 1. Acta de evaluación bioética, enmienda fondecyt y certificado de curso de manejo de animales de laboratorio.



ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA CÓDIGO: BEA173-21

El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV), con fecha 30 de septiembre de 2021 declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

INVESTIGADOR RESPONSABLE (UV) : Sebastián San Martín Henríquez

TÍTULO DEL PROYECTO : Hacia el desarrollo de nuevos andamios para la ingeniería y regeneración de tejidos. Un estudio molecular y funcional de la matriz extracelular derivada de animales con capacidades excepcionales.

FINANCIAMIENTO : FONDECYT regular 2020 N°1200280

PROTOCOLO EXPERIMENTAL : BEA173/2021

Para su evaluación, el Comité revisó los antecedentes presentados en el formulario CICUAL-F-01-FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

En la valoración bioética, el Comité consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, **el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprueba este protocolo experimental por un periodo de 3 años a contar de la fecha de aprobación.**

El Investigador Responsable se debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en el formulario de solicitud se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste.

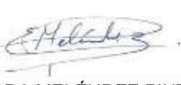
Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos, entre otros, deberá enviar una SOLICITUD DE ENMIENDA (CICUAL-F-03-FORMULARIO) al correo cicual@uv.cl. Estos cambios no se deben iniciar hasta que el CICUAL-UV no haya aprobado la enmienda.

Una vez terminado el proyecto de investigación, se solicita informar al CICUAL-UV para proceder al cierre del protocolo.

Es deber del Investigador Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CICUAL-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado.

El no cumplimiento de este protocolo puede significar la revocación de esta aprobación bioética.




EDDA MELÉNDEZ PINTO
Presidenta CICUAL-UV

Montaña 885, Viña Del Mar | E-mail: cicual@uv.cl
www.uv.cl

Tomás Egaña
Universidad Católica
IBM
jte@uc.cl

21 Octubre 2020

SOLICITUD DE ENMIENDA PROYECTO APROBADO POR EL CEC

Sres. CEC para el Cuidado de Animales y Ambiente

De mi consideración:

El motivo de esta carta es solicitar la aprobación ética de una enmienda al protocolo Nº 190613020, titulado *Towards the development of novel scaffolds for tissue engineering and regeneration. A molecular and functional study of the extracellular matrix derived from animals with exceptional regenerative capabilities*, cuyo investigador y académico responsable es José Tomás Egaña Erazo.

La enmienda consiste en incorporar al protocolo ratonas preñadas C57/BL6 cuyos embriones se encuentren en estadio E15 y E18 para, luego de ser eutanasiados, obtener muestras de piel para la posterior descelerización y generación de matrices de regeneración dermal. Para ello ratonas preñadas serán dormidas con CO₂ y posteriormente eutanasiadas. Luego se realizará una cesaria y los embriones serán liberados del saco amniótico para ser inmediatamente decapitados con una tijera quirúrgica, dejando el cadáver libre para la obtención de la piel. Dicha piel aislada será sometida a un protocolo de descelerización estándar que se basan en lavados en soluciones salinas y detergentes, luego de lo cual serán evaluadas *in vitro* e *in vivo* según se describe en el protocolo Nº 190613020.

Desde un punto de vista práctico, esta enmienda se justifica en que, debido a la crisis sanitaria, nuestro colaborador en estos momentos no tiene las capacidades de enviar los tejidos descelerizados a Chile, por lo que tendremos que generarlos nosotros mismos. Desde un punto de vista teórico, esta enmienda se justifica porque la comparación de matrices descelerizadas es el objetivo principal del proyecto actualmente en ejecución. En este contexto, está bien descrito que las capacidades regenerativas de los mamíferos varían según el estadio de desarrollo de los animales, por lo que la propuesta de este proyecto es que la edad induce cambios en la matriz extracelular de los tejidos, lo que modifica su potencial regenerativo. Para demostrar esto se utilizarán explantes de piel obtenidos de animales en estadios adulto y embrionario (E15 y E18). En este último caso se han establecido diferencias en la transición de los estadios embrionarios, identificados



uOttawa

L'Université canadienne
Canada's university

Certificate of Completion

Pamela Diaz Astudillo

For successfully completing all 12 modules of the Canadian Council
on Animal Care (CCAC)

National Institutional Animal User Training (NIAUT) Program



Animal Care & Veterinary Service
Animal Care Committee

Certificate #: 1919

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "D. Diaz Astudillo".

May 17, 2017

ANEXO 2. Tabla anticuerpos primarios.

NOMBRE MOLÉCULA	HUÉSPED	EPÍTOPE	MARCA	CÓDIGO	RANGO DILUCIÓN
Tenascina C	Conejo monoclonal	péptido sintético	Abbexa	AB108930	1:25 - 1:100
Versican	Conejo policlonal	Asn3058-Ile3299	Abbexa	Abx100119	1:25 - 1:100
Perlecan (HSPG2)	Conejo policlonal	HSPG2 de ratón recombinante	Abbexa	Abx176806	1:30 - 1:130
Agrina	Conejo policlonal	Arg1130-Cys1401	Abbexa	Abx129847	1:50 - 1:200
fibromodulina	Conejo policlonal	FMOD humana recombinante	Abbexa	Abx004875	1:50 - 1:200
Colageno XVIII cadena alfa	Conejo policlonal	alfa1 C-terminal	Sigma-Aldrich	SAB4503212	1:50 - 1:100

ANEXO 3. Plugins creados para automatización de análisis de imágenes en Image J

3.1 Azul de Alcian pH 2.5

```
rename("x");  
run("Duplicate...", " ");  
run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] [r1]=0.8742642 [g1]=0.41067678  
[b1]=0.3368798 [r2]=0.67695117 [g2]=0.5433243 [b2]=0.49652374 [r3]=0.6194936  
[g3]=0.6185133 [b3]=0.4833932");  
selectWindow("x-1-(Colour_3)")  
close();  
selectWindow("x-1-(Colour_2)")  
close();  
selectWindow("x-1-(Colour_1)")  
setAutoThreshold("Default");  
//run("Threshold...");
```

```
call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");  
//setThreshold(0, 170);  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask");  
selectWindow("Colour Deconvolution");  
close();  
selectWindow("x");  
close();  
selectWindow("x-1");  
run("8-bit");  
run("Images to Stack", "use");
```

3.2 Azul de alcian pH 1.0

```
rename("x");
run("Duplicate...", " ");
run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] [r1]=0.8742642 [g1]=0.41067678
[b1]=0.3368798 [r2]=0.67695117 [g2]=0.5433243 [b2]=0.49652374 [r3]=0.6194936
[g3]=0.6185133 [b3]=0.4833932");
selectWindow("x-1-(Colour_3)")
close();
selectWindow("x-1-(Colour_2)")
close();
selectWindow("x-1-(Colour_1)")
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");
//setThreshold(0, 206);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
selectWindow("Colour Deconvolution");
close();
selectWindow("x");
close();
selectWindow("x-1");
run("8-bit");
run("Images to Stack", "use");
```

3.3 Herovici colágeno III (azul) y I(rosado.

```
rename("x");
run("Duplicate...", " ");
run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] [r1]=0.8189533 [g1]=0.5210416
[b1]=0.2778614 [r2]=0.33246154 [g2]=0.88700646 [b2]=0.32045096
[r3]=0.11154124 [g3]=0.09881065 [b3]=0.98883516");
selectWindow("x-1-(Colour_3)")
close();
selectWindow("x-1-(Colour_1)")
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
//setThreshold(0, 180);
run("Convert to Mask");
selectWindow("Colour Deconvolution");
close();
selectWindow("x-1-(Colour_2)")
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
//setThreshold(0, 180);
run("Convert to Mask");
selectWindow("x");
close();
selectWindow("x-1");
run("8-bit");
run("Images to Stack", "use");
```

ANEXO 4. Controles estandarización de anticuerpos por IHQ.

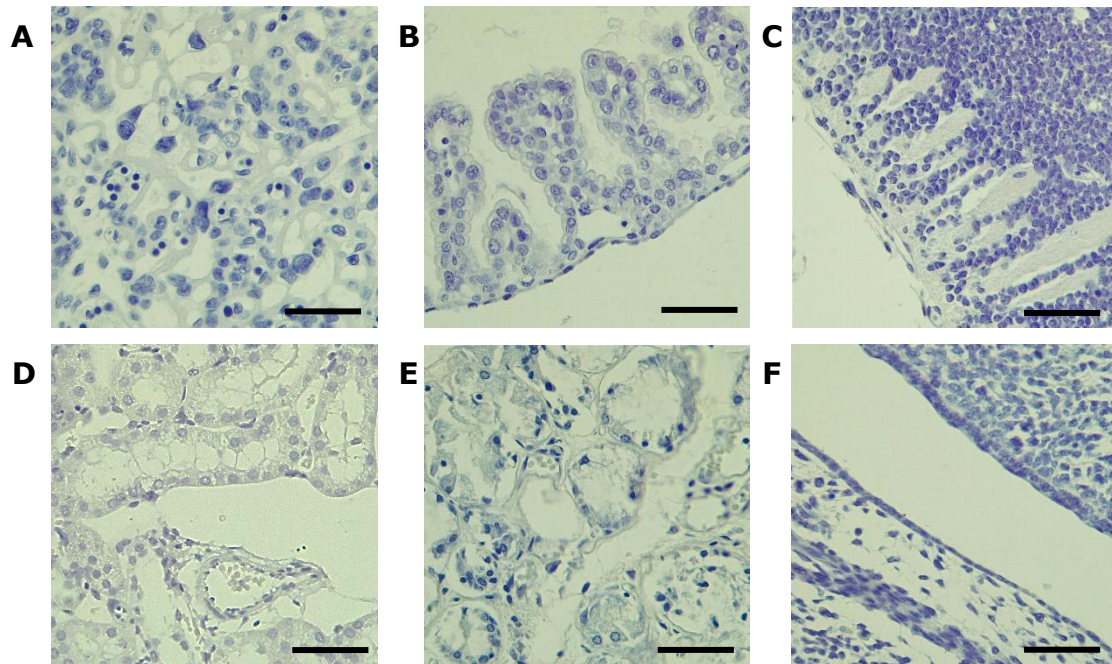


Figura 16. Controles negativos estandarización anticuerpos para inmunohistoquímica. (A) Versican (B) Tenascina-C (C) Perlecan (D) Colágeno XVIII (E) Fibromodulina (F) Agrina. Aumento 40X, barra correspondiente a 50µm.



Article

Comprehensive characterization of mouse skin derived from regenerative versus reparative stages: a comparative analysis.

Valentina Castillo^{1,†}, Pamela Díaz-Astudillo^{2,†}, Rocio Corrales-Orovio^{1,3}, Sebastián San Martín² and José Tomás Egaña^{1,*}

¹ Institute for Biological and Medical Engineering, Schools of Engineering, Biological Sciences, and Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Biomedical Research Center, School of Medicine, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

³ Division of Hand, Plastic and Aesthetic Surgery, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany.

* Author to whom correspondence should be addressed.

[†] These authors are equal contributors.

Abstract: Tissue regeneration capacities vary significantly during lifespan. For instance, mammals can fully regenerate until certain specific developmental stages and thereafter can only repair without reestablishing the original tissue architecture and function. The high regenerative potential of such fetal stages has been attributed to several factors, such as stem cells, the immune system, specific growth factors, and the presence of extracellular matrix molecules upon damage. To better understand the local differences between regenerative and reparative tissues, in this work, a comparative analysis of skin derived from mice at regenerative and reparative stages was carried out, finding that both skins differ in their molecular composition, structure, and functionality. The results showed a significant increase in cellular density, nucleic acid content, neutral lipids density, Collagen III, and glycosaminoglycans in regenerative versus reparative stages. Moreover, regenerative skin had significantly higher porosity, metabolic activity, water absorption capacity, and elasticity than reparative skin. Finally, results also showed that lipid distribution, extracellular matrix pore size, and proteoglycans showed significant differences between both groups. This work provides comprehensive data about the molecular and structural clues that allow full tissue regeneration in fetal stages and may contribute to developing novel biomaterials and strategies for tissue engineering and regeneration.