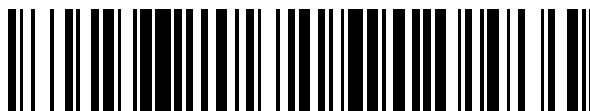


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 281**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013** **PCT/GB2013/051158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013** **WO13164635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013** **E 13726813 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2844307**

54 Título: **Matriz extracelular - Armazón de piel sintético**

30 Prioridad:

03.05.2012 GB 201207781

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2018

73 Titular/es:

**SMART MATRIX INTELLECTUAL PROPERTY
LIMITED (100.0%)**

**Leopold Muller Building Mount Vernon Hospital
Northwood Middlesex HA6 2RN, GB**

72 Inventor/es:

**DYE, JULIAN F.;
SHARMA, VAIBHAV;
GARCÍA-GARETA, ELENA y
BLACKWOOD, KEITH ALAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 668 281 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Matriz extracelular - Armazón de piel sintético

5 Introducción

Smart Matrix™ (armazón de piel sintético, reemplazo dérmico sintético (SDR)) es un armazón de reemplazo dérmico sintético de biomaterial intrínsecamente proangiogénico, diseñado para resolver el problema de la integración retardada o comprometida en la zona de una herida. Es una Matriz Extracelular (ECM) en forma de un material compuesto de fibrina con alginato (u otro agente formador de volumen adecuado), estabilizada mediante la reticulación de glutaraldehído, que da lugar a un material citoadherente reabsorbible poroso y biocompatible que facilita la infiltración celular rápida. La formulación básica para la fabricación de Smart Matrix™ implica una reacción enzimática con la proteína de fibrinógeno y el agente de coagulación (trombina). Con el fin de proporcionar volumen y soporte al armazón, se usa un agente formador de volumen (alginato) (Colorante, documento WO2007/144644-A, 2007). Inicialmente, se había previsto que el uso de iones de calcio en la formulación de fabricación funcionaría para soportar el efecto de formación de volumen del alginato a través de la gelificación, además de una interacción coligativa con fibrina. Sin embargo, aunque podría formarse un armazón estable y funcional *in vitro* que apoyara el ingreso celular rápido, se observó que esta formulación generaba una respuesta inflamatoria inaceptable en el lecho de una herida de espesor total *in vivo* (modelo porcino), que aumentaba entre el día 7 y el día 14. Se encontró que esta respuesta se atenúa al disminuir la concentración de calcio usada en la formulación de fabricación (Edwards *et al.*, 2011).

Sin embargo, no basta con limitar la concentración de iones de calcio a 2 mM en la etapa de fabricación para causar la gelificación del alginato, lo que es incapaz de mantener una estructura de espuma durante el tiempo suficiente para producirse la coagulación del fibrinógeno y unirse a toda la mezcla. Esto presentaba un problema de fabricación que se abordaba mediante el uso de tensioactivos y agentes estabilizantes. Los tensioactivos son compuestos que reducen la tensión superficial entre los líquidos, que actúan como detergentes, emulsionantes o agentes formadores de espumas.

Los "Span" también se conocen como ésteres de sorbitano, y son una familia de tensioactivos de acil-azúcar no iónicos lipófilos usados como agentes emulsionantes en la preparación de emulsiones, cremas y pomadas.

El OGP pertenece a otra familia de tensioactivos de acil-azúcar. El OGP ya se conoce en la técnica como un detergente usado para disolver proteínas integrales de membrana. Se usa ampliamente con proteínas, porque se puede eliminar fácilmente del extracto de proteína final. Otros miembros de la clase de los tensioactivos de acil-azúcar son el hexil-β-D-glucopiranosido (HGP), octil-β-D-1-thiogluconopiranosido (TGP), decil-β-D-glucopiranosido (DGP), dodecil-β-D-glucopiranosido (DdGP), N-octil-β-D-maltósido (ODM) y decil-β-D-maltopiranosido (DMP). Otros miembros incluyen ciclohexil-etanol-maltósido y n-decil- y -dodecil-sacarosa.

La familia de tensioactivos Pluronic, que incluyen F127, F-68, L101, son copolímeros de bloques no iónicos de óxido de etileno y de propileno, bien conocidos por sus propiedades tensioactivas.

El tensioactivo inicial investigado fue Pluronic F127, un copolímero de bloques con alta biocompatibilidad y uso médico, y la propiedad a alta concentración de gelificarse espontáneamente a aproximadamente 37 °C. Esto produjo un armazón poroso que resultó integrarse bien. Por el contrario, el armazón hecho con Pluronic L101 (antiespumante) produjo un armazón homogéneamente denso. Hubo una notable diferencia en las velocidades de integración, con el armazón poroso integrándose rápidamente y vascularizándose durante 1 semana, siendo el flujo sanguíneo detectado el día 3, y una coloración rosa melocotón visible indicativa de "la toma". El resultado de Pluronic F127 se repitió con Pluronic F68, que tiene una propiedad de formación de espuma ligeramente superior a la de F127. Sin embargo, el aumento de la porosidad con estos tensioactivos dio lugar a un grado sorprendente de inflamación que aumentó hasta el día 14, a pesar de los bajos niveles de calcio en la mezcla de formulación. Esto se asoció con placas densas de armazón relativamente grandes (en el intervalo aproximado de 20-100 μm de longitud) dentro de la estructura del armazón, que parecían estar generando una respuesta a un cuerpo extraño.

55 Técnica anterior

La formulación básica para la fabricación de Smart Matrix™ se describe en el documento WO2007/144644-A, 2007.

El documento US 2002/0131933-A describe una membrana de biopolímero y métodos para su preparación. La membrana está destinada a ser secada y comprimida. En su forma seca, tiene un espesor inferior a aproximadamente 75 micrómetros, ya que el contenido de disolvente es inferior al aproximadamente 5 % en peso de la membrana, una densidad superior a aproximadamente 1 g/cm³ y un tamaño de poro máximo de aproximadamente 20 micrómetros.

El documento WO2004/067704-A describe matrices de fibrina liofilizadas ("esponjas") y métodos para su preparación. Se incorporan glicosamino-glicanos y agentes bioactivos a la matriz durante la formación de la esponja.

La patente de EE.UU. 4442655 describe preparados secos que contienen fibrinógeno, y la fabricación y el uso de los mismos. Los productos tienen una estructura de tipo espuma/lana obtenida por liofilización. Los preparados secos se proporcionan para su uso como material sanitario para heridas, como material de relleno para cavidades óseas y/o como material de soporte para otras sustancias activas.

5

La siguiente tabla compara y contrasta las divulgaciones de la técnica anterior:

D1	ECM
<u>Características</u>	
tamaño del poro > 20 um estructura de microescala agregada densa función antiadherente sin interconectividad de poros/conductividad celular sin uso de tensioactivo sin uso de reductores o desintoxicantes sin datos de biocompatibilidad sin datos de vascularización	porosidad < 20 um - hasta 250 um (Fig. 29) microestructura fibrosa interconectada (Fig. 29) densidad aprox. de 10 ug/cm ³ - sin datos función proadherente (Fig. 2-5) conductividad celular (Fig 4, 42) uso de tensioactivo uso de reducción o desintoxicación integración celular <i>in vivo</i> /vascularización (Fig. 42)
<u>Ventajas</u>	
	Funcionalidad de ECM función proadherente formación de espuma de baja densidad coagulación para crear material poroso reticulación para estabilizar la estructura reticulación para mejorar la función adherente biocompatibilidad mejorada con etapa de reducción tensioactivo compatible con la coagulación de fibrinógeno uso de material como una ECM/un almacén integración celular <i>in vivo</i>
D2	ECM
<u>Características</u>	
baja estabilidad en solución proteolítica sin reticulación de fibrina sin etapa de formación de espuma para aumentar la porosidad sin agente tensioactivo o de formación de espuma sin datos de adhesión celular	microestructura fibrosa (Fig. 29) estabilidad a largo plazo en solución proteolítica función proadherente (Fig. conductividad celular (Fig. uso de tensioactivo uso de reducción o desintoxicación
<u>Ventajas</u>	
	Funcionalidad de ECM función proadherente formación de espuma de baja densidad coagulación para crear material poroso reticulación para estabilizar la estructura reticulación para mejorar la función adherente biocompatibilidad mejorada con etapa de reducción tensioactivo compatible con la coagulación del fibrinógeno uso celular de material como ECM/armazón integración celular <i>in vivo</i>

D3	ECM
<u>Características</u>	
producto mixto de fibrinógeno/fibrina material oclusivo debido al fibrinógeno libre sin biocompatibilidad	función proadherente (Fig. 2-5) función conductora celular (Fig 4, 42) uso de tensioactivo
sin adhesión celular sin conductividad celular	uso de reducción o desintoxicación
<u>Ventajas</u>	
material sanitario de heridas apósito anticoagulante/oclusivo material de depósito	Funcionalidad de ECM función proadherente reticulación para mejorar la función adherente biocompatibilidad mejorada con etapa de reducción tensioactivo compatible con la coagulación del fibrinógeno
ninguna evidencia que apoye la funcionalidad del armazón de ECM	uso celular de material como ECM/armazón integración celular <i>in vivo</i>

Breve descripción de la presente invención

- 5 La formulación original proporcionó una ECM, pero persistía el problema de que, en uso, existía una tendencia a que hubiera un grado de inflamación. La inflamación puede estar causada por una serie de factores que constituyen, por separado o en combinación, una "respuesta a un cuerpo extraño".
- 10 En el contexto de las ECM evaluadas, los factores inflamatorios potenciales incluyen alginato de endotoxina; aductos reticulados citotóxicos; partículas fagocíticas (tales como partículas de fosfato de calcio).
- En la búsqueda de proporcionar la presente invención, se usó una formulación en la que se usa un tensioactivo para controlar la porosidad del producto matricial. Sin embargo, un problema importante con este enfoque es la formación de microagregados densos o placas dentro de la estructura del armazón, que parecían generar una respuesta de
- 15 cuerpo extraño.
- Los presentes inventores han investigado el efecto que la alteración de la composición tensioactiva tiene sobre la estructura del armazón Smart Matrix formado. En concreto, los estudios de coagulación, que miden el inicio y la velocidad de coagulación, así como la calidad del gel resultante, definen la compatibilidad bioquímica de la mezcla de tensioactivo. Las pruebas convencionales de estabilidad de la espuma, que miden la duración y la porosidad, establecen un criterio para la eficacia del tensioactivo. Las descripciones visuales del efecto de formación de
- 20 espuma establecerán los grados de estabilidad de la espuma durante y al final del proceso de fabricación, y el análisis histológico se usa para medir la microporosidad, el tamaño de poro y la homogeneidad de los armazones.
- 25 La presente invención proporciona una formulación y el proceso de producción de una ECM de fibrina combinada con un agente formador de volumen coligativo tal como alginato de esta formulación, que evitará la formación de agregados densos y proporcionará una estructura porosa homogénea que dará lugar a un armazón proangiogénico que se integra sin inflamación excesiva.
- 30 Se especulaba que se pueden producir agregados de la precipitación de proteínas, distinta de la coagulación, formada durante la etapa de fabricación como consecuencia de la adición de tensioactivo. Los presentes inventores identificaron pruebas de la precipitación de proteínas en la mezcla de reacción no asociada con actividad enzimática, pero debido a la combinación de otros reactivos.
- 35 La invención ahora proporciona una formulación, y su uso, para reducir al mínimo la precipitación y aumentar al máximo la coagulación.
- En un primer aspecto, la invención proporciona la Formulación Optimizada Smart Matrix™ n.º 1 o SMOF n.º 1 a la que se hace referencia en el presente documento, y sus variantes, y su uso para producir una ECM. Esto incluye la
- 40 introducción del componente "tensioactivo de azúcar" octil-β-D-glucopiranosido (OGP) con un tensioactivo Pluronic de tipo de formación de espuma tal como el "poloxámero" F68, para formar y estabilizar una estructura de espuma con el fin de determinar la estructura final del armazón de fibrina coagulada.
- La presente invención también incluye un agente estabilizante proteico, tal como trehalosa (D-trehalosa).
- 45 Los armazones de SMOF n.º 1 demostraron una porosidad y una estructura de poro cercanas a la ideal según lo

evaluado mediante la celularización de prototipos injertados en heridas de espesor total. Se ha demostrado que esta fórmula es eficaz en modelos *in vitro* e *in vivo* (curación de heridas porcinas de espesor total). Hubo una notable reducción en la aparición de placas densas en el armazón en comparación con los armazones en los que la porosidad se controló mediante la simple adición de un tensioactivo (tal como un Pluronic, Triton X100 o Tween 20 formador de espuma). En comparación con los armazones Pluronic, la reducción de la respuesta inflamatoria se observó *in vivo* el día 14.

A pesar de una mejora en la reducción de la respuesta inflamatoria, el resultado fue superior al ideal. El análisis de microscopía óptica de las estructuras muestra una microestructura no homogénea con microagregados densos y tamaño de poro en profundidad del armazón. Además, la estructura de poros resultante del armazón está en el lado mayor del intervalo que se ha observado que da lugar a un crecimiento tisular organizado. Los factores extraños parecían dar lugar a la formación de agregados densos de material de armazón *in vivo*, aunque antes de la aplicación era evidente una estructura de poros abierta. Parece razonable concluir que siempre que si hay presente material de armazón denso agregado *in vivo*, se generará una respuesta inflamatoria, que no es deseada, concomitante con una nueva increscencia tisular.

Los resultados iniciales de acuerdo con el primer aspecto de la invención todavía no parecían ser óptimos.

En un segundo aspecto, la invención proporciona formulaciones mejoradas adicionales, y su uso para producir ECM. Este aspecto optimiza aún más la estructura de poros y la homogeneidad de la Formulación Optimizada Smart Matrix™ n.º 1 (SMOF-1). Para lograr esto, la invención proporciona el uso de al menos dos tensioactivos de azúcar diferentes en la formulación.

Estas formulaciones también incluyen un agente estabilizante proteico tal como trehalosa. También se han investigado agentes estabilizantes proteicos, que pueden estabilizar el fibrinógeno antes de la coagulación. Se han ensayado hidratos de carbono pequeños, polioles tales como glicerol, sorbitol, glucosa y sacarosa trehalosa y rafinosa. A partir de este trabajo, el estabilizante de azúcar preferido es la trehalosa.

Trehalosa - intervalo de concentraciones para su uso como agente estabilizante proteico:

Un intervalo de concentraciones útil de trehalosa como agente estabilizante se encuentra ampliamente del 2,5 al 20 %. Más concretamente, el intervalo del 5 al 11 % (antes y después de la adición de alginato y tensioactivo) se ha establecido como eficaz en la fabricación de armazones, como se explica a continuación. Esto se puede lograr usando una solución madre saturada.

La solución madre de trehalosa es una solución saturada al aproximadamente 60-66 % a 30-37 °C. Hay un efecto de la temperatura en la saturación que conduce a diferentes valores a diferentes temperaturas. Hay un fenómeno de sobresaturación que introduce una variación en torno a la que se satura a aproximadamente 37 °C. El intervalo entre el 60 y 66 % en masa:volumen cubre esto. Se puede alcanzar el 66 % por sobresaturación a temperatura elevada (por ejemplo, usando un microondas para calentar la solución durante la preparación), pero se produce una cristalización lenta al enfriarse. El uso de una disolución más lenta a 37 °C conduce a un valor de equilibrio del aproximadamente 61 %.

Las soluciones de fibrinógeno, trehalosa y alginato se calientan preferentemente en un baño de agua a 37 °C, pero la mezcla se realiza en condiciones ambientales (aire a 20 °C), por lo que la temperatura real en el momento de la mezcla es de aproximadamente 25-30 °C.

Tras el moldeo, se dispone la mezcla espumada en una incubadora humidificada a 37 °C, por lo que la temperatura se aproximará a 37 °C después de aproximadamente 10 minutos. El mantenimiento de las soluciones a temperatura ambiente (20 °C) seguirá funcionando, pero con menos espuma, y la coagulación también ocurrirá a temperatura ambiente, pero se prevé un cierto colapso de la espuma durante el mayor tiempo requerido para la coagulación.

La dilución inicial de la trehalosa con el componente de fibrinógeno proporciona una dilución de factor de dilución de aproximadamente 5. Por ejemplo, la concentración inicial de trehalosa de la solución madre es subsecuentemente del aproximadamente 11 % en la solución de fibrinógeno mediante una dilución de factor de dilución de 5 de 0,6 ml de solución madre en 3 ml de Fbg. Luego hay una dilución adicional de factor de dilución 2 usando 3 ml de ácido algínico, dando aproximadamente el 5,5 %.

[Véase la tabla titulada Tabla de concentraciones de los componentes clave de las fórmulas optimizadas Smart Matrix]

Como alternativa, podría añadirse trehalosa a la mezcla disolviéndola en la solución de fibrinógeno preparada, o con el alginato u otro agente formador de volumen. En particular, si se desearan concentraciones superiores de trehalosa, esto también podría lograrse variando las concentraciones de partida de las soluciones de reactivos madre. Por ejemplo, el alginato al 4 % o 5 % alcanzaría un intervalo de volumen útil para añadir un mayor volumen de trehalosa.

La variación de la concentración en la solución madre de trehalosa en el intervalo del 60 al 66 % da lugar a la dilución inicial que da un intervalo del aproximadamente 10-11 % tras la mezcla con fibrinógeno, y una concentración en el intervalo del aproximadamente 5-5,5 % tras la adición de alginato. El intervalo potencial de concentraciones en la mezcla se amplía tras la adición de alginato (por ejemplo, 4,9-6,8 % para 1,5 o 3 ml equivalentes) y tras la adición de tensioactivo (por ejemplo, 4,7-6,3 % por los mismos 1,5 o 3 ml equivalentes).

Por consiguiente, el contenido de trehalosa debe estar en el intervalo del 10-11 % antes de la adición de la trombina; luego, tras la adición de la trombina/alginato/tensioactivo, el contenido de trehalosa debe estar en el intervalo del 4-7,5 %.

Los presentes inventores han demostrado que la adición de trehalosa a un ensayo de coagulación de fibrinógeno convencional provocó un aumento del tiempo de retardo antes del inicio de la coagulación. Sin embargo, en el intervalo de concentraciones de trehalosa del 3-13 % en la mezcla de fabricación, el perfil de coagulación y la velocidad máxima de coagulación se vieron poco afectados.

Lo importante es que, por encima de una concentración de trehalosa del 13 % (es decir, al 19 %), la coagulación se inhibe de manera muy sustancial. Esto demuestra que hay un límite superior de concentración de trehalosa cuando la trehalosa debe usarse como un agente estabilizante proteico.

El fibrinógeno, un tensioactivo, un agente estabilizante y un agente formador de volumen se podrían combinar en forma de polvos secos, polvos, una mezcla preliofilizada o una solución preparada previamente de los mismos en un tampón adecuado tal como MES/NaCl. El alginato podría ser menos adecuado como agente formador de volumen (porque se disuelve bastante lentamente), y podría reemplazarse por una metilcelulosa o un almidón de hidroxietilo. Esto, reconstituido, solo requeriría la adición de trombina para la coagulación.

Una mezcla seca con agente coagulante (trombina) podría reconstituirse en el recipiente en el que se pretendía realizar el moldeo.

Definición de las características de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones y se basa en un tipo de mezcla de fibrinógeno que permite:

1. Estabilización de la solución antes de la coagulación;
2. Tensioactivo/s compatible/s con alta estabilidad de la espuma;
3. Agente/s formador/es de volumen coligativos compatibles;
4. Coagulación enzimática mediante la adición de trombina u otra proteasa selectiva del fibrinógeno.

Los armazones producidos mediante el proceso de la invención, usando las formulaciones de la invención, tienen densidad, porosidad, homogeneidad estructural a microescala bien definidas y son muy hidrófilos. Estas características son todas muy importantes en términos de cómo funciona el producto y cómo logra sus resultados finales. Las características del producto deben ser controlables y reproducibles para que sea útil como producto comercial (por ejemplo, para la cicatrización de heridas).

Las composiciones de matriz extracelular (composiciones de armazón dérmico) de la invención son capaces de soportar la adhesión celular *in vitro* y la neovascularización *in vivo*; son lo suficientemente rígidas para resistir el colapso causado por la increscencia celular y son suficientemente resistentes a la degradación proteolítica como para sobrevivir en un entorno de herida para que ocurra la fibroproliferación. Estas propiedades se pueden lograr mediante el producto del proceso de la presente invención.

El objeto de la invención es proporcionar una composición de matriz extracelular de poros abierta homogénea estable que interactúe activamente con las células, en particular, para potenciar la adhesión de las células endoteliales. En este contexto, se dice que la expresión "matriz extracelular" se refiere a una estructura a la que las células pueden adherirse y multiplicarse sin causar toxicidad ni inhibición de la replicación celular.

En la presente invención, el proceso requiere el uso de un agente coagulante que garantice la formación de un gel estable. También requiere un agente formador de espuma compatible y un agente formador de volumen coligativo que controle la microestructura. Las formulaciones preferidas también contienen un agente estabilizante proteico (más preferentemente, trehalosa).

El fibrinógeno usado en la presente invención puede ser esencialmente puro o puede contener una traza de uno o más de otros componentes. Actualmente, se prefiere que el fibrinógeno no contenga una cantidad significativa de otra/s proteína/s. Por ejemplo, un preparado de fibrinógeno disponible en el mercado (destinado a su uso como una infusión i.v.) contiene aproximadamente el 35 % de albúmina y no se prefiere (aunque la proteína adicional podría eliminarse por diálisis para dejar un producto de fibrinógeno utilizable).

APLICABILIDAD INDUSTRIAL**Reemplazo dérmico sintético de matriz inteligente**

- 5 Una realización del tipo de armazón de la invención es un armazón de reemplazo dérmico. El reemplazo dérmico sintético de matriz inteligente (SDR) es un armazón de reparación tisular destinado al tratamiento de grandes heridas de pérdida de piel, de espesor total, que no pueden cicatrizar por intención primaria. Hay tres categorías genéricas de dichas heridas:
- 10 1. pérdida tisular agudamente traumática, por ejemplo, quemaduras, heridas producidas por explosiones, avulsión.
2. heridas de resección quirúrgica, por ejemplo, carcinoma/melanoma de células escamosas grandes.
3. heridas crónicas, por ejemplo, úlceras venosas de la pierna, úlceras del pie diabético y úlceras por presión.
- 15 Actualmente, hay productos en el mercado que se usan para tratar estas heridas, muchas de las cuales también requieren un tratamiento posterior por injerto de piel de espesor parcial. El SDR es un biomaterial destinado a mejorar el rendimiento de los productos actualmente disponibles. Proporciona las condiciones para que se produzca una vascularización más rápida y una integración celular y, por lo tanto, permite una "toma" del injerto más fiable en estas heridas difíciles, mejorando así la velocidad y la calidad de la curación de heridas. Se puede usar con células de piel desagregadas u otros medios de reconstitución de la epidermis. El SDR también se puede usar para ayudar a la curación de heridas sin la aplicación de un injerto.

También puede ser beneficioso para otros usos, por ejemplo, heridas de espesor parcial y heridas en zona donante, como un armazón de administración celular para la reconstrucción de tejidos, y aplicaciones de ingeniería tisular.

Descripción del producto

En una realización, el SDR es un material blanco, liofilizado, similar a la espuma, de entre 1-5 mm de espesor y disponible en varios tamaños, adecuado para heridas de diferentes zonas. Se puede cortar al tamaño apropiado.

Modo de acción

El SDR es una matriz sintética microporosa. Es un principio bien establecido que la estructura física de matrices sintéticas microporosas proporcione un entorno de apoyo para el crecimiento celular (por ejemplo, Dagalakakis *et al.*, 1980, O'Brian, 2005). El SDR permite la entrada rápida de células que son instrumentales en la regeneración tisular que conduce a una celularización rápida y neovascularización de su estructura. El SDR es reabsorbible (siendo susceptible a la degradación proteolítica enzimática), y cuando se completa la celularización, el SDR se ha degradado sustancialmente.

Características del SDR en uso

- ayuda a la curación de heridas en la pérdida de piel de espesor total;
- funciona como armazón de regeneración;
- apoya la revascularización rápida y el crecimiento celular;
- produce la neodermis estable lista para el injerto de piel de espesor dividido.

Indicaciones

Se usa en la pérdida de piel de espesor total por traumatismo agudo, resección quirúrgica o ulceración crónica.

El producto está destinado a ayudar a la reconstrucción de la piel como un complemento del tratamiento clínico reconocido para heridas de espesor total. Para las úlceras crónicas, la causa subyacente de la ulceración requerirá un tratamiento clínico apropiado.

Instrucciones de uso

Las heridas deben desbridarse quirúrgicamente o limpiarse de otro modo de restos de tejido necrótico e infectado antes del tratamiento con el SDR en condiciones estériles.

El SDR puede hidratarse, por ejemplo, en solución salina estéril antes de la aplicación. El procedimiento consiste en remojar el producto en una bandeja de solución salina durante al menos 5 minutos antes de su uso, verificando que la hidratación se completa por el cambio de aspecto de blanco opaco a blanco translúcido.

El SDR se puede usar en combinación con un material de apósito transparente (por ejemplo, Mepitel o Mepiform) como una bicapa. Esto protege el SDR y permite un período de integración con la herida antes de la aplicación de un injerto de piel como un procedimiento retrasado. Tras la verificación de la toma, como se evidencia por un cambio

en el color del SDR de blanco a rosa, el material puede injertarse con un injerto de piel de espesor parcial.

Como alternativa, el SDR también puede usarse como una reconstrucción de una sola etapa, aplicándola a la herida (sin un material de refuerzo), e inmediatamente colocando encima un injerto de piel de espesor parcial. Entonces, se debe aplicar un apósito convencional (por ejemplo, Mepitel™, Jelonet™) o un apósito absorbente como un apósito de espuma (p. Ej., Mepilex, Mepilex Border o Alevyn). Se puede aplicar una presión continua suave mediante el uso de un apósito de refuerzo.

El producto se puede aplicar a la herida levantándola de la bandeja de solución salina sobre una torunda de gasa estéril para transferirla. Como alternativa, se puede manipular directamente, con la precaución adecuada para evitar rasgar el producto. Puede cortarse en seco o en húmedo (por ejemplo, apoyarse con una gasa para cortarse en una plantilla).

El producto puede fijarse en su sitio mediante suturas o grapas. Esto será más seguro cuando se use una lámina de refuerzo sobre apósitos, apósitos reforzados y férulas, según las necesidades clínicas.

Cómo se presentará el producto al mercado

El SDR se presentará envasado individualmente en condiciones estériles en una bandeja cerrada herméticamente con papel de aluminio dentro de una bolsa desprendible.

Referencias

Dagalakis, N., J. Flink, P. Stasikelis, J. F. Burke y I. V. Yannas (1980). "Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure" *J Biomed Mater Res* 14(4): 511-28. O'Brien, F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas y L. J. Gibson (2005). "The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds" *Biomaterials* 26(4): 433-41.

Tabla de concentraciones de los componentes clave de las fórmulas optimizadas de matriz inteligente.

	fórmula 1 de Pluronic SM		SM-OF1		SM-OF2		SM-OF3 (DMP o alternativas de DSuc)	
	Conc. de reactivo	Conc. de matriz final	Conc. de reactivo	Conc. de matriz final	Conc. de reactivo	Conc. de matriz final	Conc. de reactivo	Conc. de matriz final
Fbg	2 %	0,87 %	2 %	0,8 %	2 %	0,9 %	2 %	0,9 %
CaCl₂	1 M	2 mM	1 M	2 mM	1 M	2 mM	1 M	2 mM
Trehalosa (Tre)	-	-	66 %	[11 % con Fbg]	66 %	[11 % con Fbg]	66 %	[11 % con Fbg]
Trombina (Thm)	10 U/ml	0,0625 - 0,125 UI/mg de Fbg	10 U/ml	0,125 UI/mg de Fbg	10 U/ml	0,125 UI/mg de Fbg	10 U/ml	0,125 UI/mg de Fbg
AA	2 %	0,87 %	2 %	0,8 %	2 %	0,46 %	2 %	0,46 %
Tensioactivo	Pluronic F68 20 %	0,7-1,5 %	OGP 20 % Pluronic F68 20 %	0,93 - 1,86 % 0,24 - 0,475 %	DMP 20 % DdGP 20 % ODM 20 % Pluronic F68 20 %	0,48 % 0,24 % 0,24 % 0,24 %	DMP 20 %	0,53 %
							nDSuc 20 %	0,53 %

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1.

Figura 2. Resultados de coagulación usando tensioactivo OGP/F-68.

Figura 3. Armazones moldeados usando Span.

Figura 4. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + ODM.

Figura 5. Resultados de coagulación usando tensioactivo ODM/F-68.

Figura 6. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + DGP.

Figura 7. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + DGP/OGP.

Figura 8. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + DGP/ODM.

Figura 9. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + TGP.

Figura 10. Resultados de coagulación usando tensioactivo TGP/F-68.

Figura 11. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + HGP.

Figura 12. Resultados de coagulación usando tensioactivo HGP/F-68.

Figura 13. Resultados de la coagulación usando tensioactivo DMP/ODM/F-68.

Figura 14. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 (DMP + DdGP):ODM.

Figura 15. Resultados de la coagulación usando tensioactivo (DMP + DdGP)/ODM.

Figura 16. Resultados de la coagulación usando tensioactivo (DMP + DdGP)/OGP.

Figura 17. Estructura física de armazones de ensayo.

Figuras 18-20. Otros resultados de coagulación.

Figura 21. Resultados de porosidad y tamaño de poro.

Figura 22. Comparación de Smart Matrix con Matriderm.

Figura 23. Curvas de tensión-deformación para Smart Matrix SM-OF2 (4 lotes), Matriderm e Integra.

MÉTODOS

Coagulación

Las mezclas candidatas se prepararon en cubetas ópticas de 1 ml y se controlaron a 425 nm. Las mezclas se prepararon primero sin trombina, y se midieron los datos de absorbancia de referencia frente a un blanco de agua. Luego se añadió trombina, se mezcló la mezcla por inversión (parafilm) y se midió la absorbancia cada minuto hasta que se hubo completado la coagulación. Se derivaron de cada perfil los datos para el tiempo de retardo y la velocidad de coagulación máxima. Al final de la coagulación, los armazones se evaluaron manualmente para determinar la rigidez del gel y se puntuaron subjetivamente en una escala porcentual, comparando el coágulo de fibrina sin tensioactivo como un gel del 100 %

EXPERIMENTOS DE COAGULACIÓN

Método:

Se mezclan los constituyentes de ensayo con fibrinógeno y se mide la densidad óptica (DO) a 425 nm en el tiempo para medir la turbidez de la solución, es decir, lo turbio (se obtendrían resultados similares midiendo a cualquier longitud de onda en un amplio intervalo).

El orden de la mezcla es:

Calcio (CaCl₂ 2 mM a menos que se indique), a partir de una solución madre concentrada (por ejemplo, CaCl₂ 1 M) fibrinógeno (humano o bovino: hFbg/bFbg), (Fybex es hFbg, Bioproducts Laboratories, Dagger Lane, Elstree, Herts, RU).

diluyente (normalmente HEPES/NaCl; HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), estabilizante (preferentemente, trehalosa, añadida a partir de una solución madre saturada), agentes formadores de volumen (normalmente, ácido algínico (AA) disuelto en HEPES/NaCl), tensioactivo;

- 5
- luego se mezcla y se realizan las mediciones previas a la coagulación;
 - luego se añade trombina a la coagulación $t = 0$;
 - se mide la DO cada minuto hasta que se complete la coagulación o la DO esté fuera de escala ($> 2,5$).

Las principales variables estudiadas son:

- 10
- fuerza iónica (NaCl 25-400 mM);
 - efectos aniónicos y catiónicos (sustitución de Na^+ por K^+ /sustitución de Cl^- por SO_4 o HEPES);
 - entorno iónico (efecto de pKa del tampón con MES, HEPES, TRIS);
 - pH (6,7-7,4);
- 15
- efecto del agente formador de volumen, ácido algínico;
 - efecto de los hidratos de carbono pequeños (glicerol, sorbitol, glucosa, sacarosa, trehalosa);
 - efecto de los tensioactivos no iónicos (serie Pluronic F127 y F68) Tween 20, Triton X100 y OGP.

Código	Condiciones experimentales	Sumario de resultados
A	0,25-1,5 U de trombina /hFbg al 1 % (Fybex)/ml (CaCl_2 10 mM)	La trombina aumenta la coagulación.
	Calcio (CaCl_2 2-10 mM) (0,25-1,5 U de trombina/hFbg al 1 % (Fybex)/ml	El calcio aumenta la coagulación.
	Pluronic F68 (3 %) o alto nivel de NaCl (0,45 M)	Pluronic provoca una precipitación de Fbg. El nivel alto de NaCl inhibe la coagulación.
B	alto nivel de NaCl (0,45 M)/ (CaCl_2 2-10 mM) trombina (0,25-0,75 U)	El alto nivel de NaCl inhibe profundamente la coagulación, independientemente del calcio y de la trombina.
C (3 series)	Calcio (CaCl_2 10-50 mM) Trombina (0,25-0,75 U)/hFbg al 1 % (Fybex)/ml	El Ca 25 mM aproximadamente óptimo para la coagulación.
	F68 (0,5-1,5 %) (0,1 U de trombina/ml)	F68 al 0,5 % no causa precipitación de Fbg, pero sí al 1,5 %.. F68 acelera la coagulación, pero disminuye la resistencia del gel. con F68 al 1,5 %, se inhibió la coagulación, aunque coagulación muy rápida.
	F68 (0,5-1,5 %) + AA (0,78 %)	La adición de AA con F68 acelera la coagulación con coagulación parcial.
D (2 series)	HEPES NaCl (80-150 mM) F68 (0,5-1,5 %)	NaCl de fuerza iónica de 80 mM aumenta la velocidad de coagulación. La adición de F68 al 0,5 % en NaCl 80 mM aumenta la precipitación de Fbg y la velocidad de coagulación. La adición de F68 al 1,5 % en NaCl 80 mM aumenta la precipitación de Fbg y la velocidad de coagulación.
(6 series)	HEPES NaCl (50-150 mM) F68 (0,5 %)	La fuerza iónica < 80 mM inhibe la coagulación. La fuerza iónica de aprox. 40 mM produce algo de precipitación del Fbg.
E	HEPES (20-150 mM) (NaCl 25 mM)	HEPES ≥ 60 mM necesario para mantener el Fbg.
2 series		solubilidad
	HEPES/NaCl (150-750 μl) Fbg (0,5 %, NaCl 84 mM) 250 μl	NaCl 100 mM/HEPES 15 mM necesitaba mantener el Fbg en solución. cuando la precipitación del Fbg se formó inicialmente, la solución no se coaguló.

Código	Condiciones experimentales	Sumario de resultados
F	sustitución de HEPES NaCl (150 mM) por HEPES (150 mM)	Escaso efecto en la dinámica de la coagulación. Más HEPES produce una leve precipitación del Fbg.
G	F68 (0,12-0,5 %) HEPES NaCl (75-150 mM) (Fbg al 0,5 %, precalentamiento a 37 °C)	F68 hasta 0,5 % aumenta la velocidad de coagulación. La reducción de la fuerza iónica tiene poco efecto en F68 al 0,5 %, pero produce una ligera precipitación.
H	F68 (0,12-0,5 %) HEPES NaCl (150 mM) (Fbg al 0,5 %, incubación durante 4', 10' 20' a 37 °C)	No se observó precipitación a 37 °C, muy ligera a 20 °C, ligera a 10 °C, muy alta a 4 °C-El F68 amplifica ligeramente estos efectos. El recalentamiento revierte los efectos. Coagulación más rápida con F68.
	Como arriba pero menor fuerza iónica	El F68 al 0,5 % causa precipitación con HEPES NaCl aprox. 100 mM, en comparación con 150 mM
	Como arriba, con Pluronic F68 frente a F127 al 0,5 %	F127 produce menos precipitación que F68 en HEPES NaCl 100 mM
	F127 (0,12-0,5 %), (HEPES NaCl 150 mM, Fbg al 0,5 %)	F127 acelera ligeramente la coagulación sin precipitación inicial.
I	F68 o F127 (0,25-0,5 %), (HEPES/NaCl c. 100 mM, hFbg al 0,5 %)	El calentamiento de la TA a 37 °C despeja la precipitación-coagulación rápida.
	F68 al 0,5 %, AA en NaCl/HEPES 75 mM o AA en NaCl/HEPES 150 mM, hFbg al 0,5 %	El F68 al 0,5 % aumenta la precipitación de Fbg en la mezcla de AA/Fbg, el NaCl elevado contrarresta la precipitación.
J	F68 al 0,5 % y NaCl 75 o 150 mM, hFbg al 0,5 %	F68 al 0,12-0,5 % aumenta progresivamente la precipitación de Fbg, pero el NaCl superior contrarresta esto. La elevación de la temperatura de 20 a 37 °C antes de la adición de F68 previene la precipitación. El enfriamiento a 4 °C aumenta la precipitación, se invierte al volver a calentar. F68 aumenta la velocidad de coagulación, también más rápido en F68 con NaCl 150 mM que con NaCl 75 mM.
K	F68 o F127 en NaCl 75 mM, hFbg al 0,5 %	F68 y F127 tienen efectos muy similares sobre la velocidad de coagulación y efectos similares con la temperatura de la precipitación de hFbg.
	AA al 0,12-0,5 % en NaCl/HEPES 75 mM, hFbg al 0,5 %, 20 °C o 37 °C	AA al 0,25 % es el umbral para causar la precipitación de hFbg, el 0,5 % causa esto, pero el efecto se reduce en un precalentamiento a 37 °C. La adición de AA acelera progresivamente la coagulación.
	AA al 0,5 %, hFbg al 0,5 %, NaCl/HEPES 75 o 150 mM	AA al 0,5 % causa precipitación de hFbg en NaCl 75 mM, pero no 150 mM. La coagulación es acelerada por AA.
L	F68 al 0,5 %, AA al 0,5 %, hFbg al 0,5 %, NaCl/HEPES 75 o 175 (hasta 200) mM	La combinación de F68 y AA causan cierta precipitación hasta NaCl 200 mM incluso tras la incubación a 37 °C. AA acelera la coagulación más que F68, pero F68 da gel más fuerte.
M	NaCl, KCl, HEPES, TRIS, en NaCl/HEPES 25 mM, hFbg al 0,5 %, AA al 0,5 %, F68 al 0,5 %	El KCl causa más precipitación de hFbg que el NaCl, HEPES causa más que TRIS.
N	NaSO ₄ (60-240 mM), hFbg al 0,5 %, AA al 0,5 %, F68 al 0,5 %	NaSO ₄ aumenta la precipitación de Fbg progresivamente por encima de 60-240 mM.

Código	Condiciones experimentales	Sumario de resultados
O	NaCl hasta 300 mM, hFbg al 0,5 %, AA al 0,5 %, F68 al 0,5 %	Alta precipitación de hFbg, pero ligeramente reducida con aumento de NaCl.
P	NaCl 400 mM, hFbg al 0,5-1 %, AA al 0,5 %, F68 al 0,5 o 1,5 %	Alta precipitación de hFbg.
Q	AA al 0,25-1 % en NaCl/HEPES 150 mM, hFbg al 0,5 %, calentamiento hasta 37 °C	AA al 0,7 % es una mezcla umbral para hFbg al 0,5 % antes de la precipitación (en ausencia de F68).
	AA al 0,25-1 % en NaCl/HEPES 150 mM, hFbg al 0,5 % F68 al 0,125-0,25 %, calentamiento hasta 37 °C	Mezcla de AA al 0,5 %/hFbg al 0,5 %, 0.125 es el límite antes de la precipitación.
R	AA al 0,25-1 %, hFbg al 1 % en NaCl/HEPES 150 mM, calentamiento hasta 37 °C	Todas las mezclas estables, el AA acelera progresivamente la coagulación.
	AA al 1-1,25 %, hFbg al 1 %, F68 al 0,125-0,5 % en NaCl/HEPES 150 mM, calentamiento hasta 37 °C	El F68 al 0,125 % es el umbral para la precipitación.
S	AA al 1 %, hFbg al 1 %, F68 al 0,125-2 %, glicerol al 20 %	El glicerol previene la precipitación de la mezcla hasta F68 al 1 % además de AA al 1 %: hFbg al 1 %. Sin embargo, la coagulación es completamente inhibida por el glicerol.
	Tween 20 al 1 % o Tx100 al 1 % o F68 al 0,25 %, con AA al 1 %, hFbg al 1 %, calentamiento hasta 37 °C	Tween20 al 1 % en el umbral de precipitación e inhibe la coagulación. El Triton X100 al 1 % causa cierta precipitación de Fbg, pero acelera ligeramente la coagulación. F68 al 0,25 % causa una precipitación similar pero acelera la coagulación más.
T	AA al 1 %, hFbg al 1 %, glicerol al 2,5-5 %, F68 al 60,5-1 %	El glicerol inhibe progresivamente la coagulación (el 5 % duplica el tiempo de coagulación). El glicerol al 5 % no previene la precipitación con F68 al 0,5 %.
U	hFbg al 1 %, AA al 1 %-2,5 %, glicerol al 5-10 %	El glicerol evita parcialmente, pero no por completo la precipitación en AA al 1,75 % o superior.
V	Sorbitol al 32 % o glicina 50-200 mM, con glicerol al 5 % F68 al 0,5 %, hFbg al 1 %, AA al 0,5-1 %	La adición de sorbitol inhibió la coagulación. La glicina aumentó la precipitación inicial y la coagulación acelerada.
	TRIS NaCl pH 7,4 o MES NaCl pH 6,8 en comparación con HEPES NaCl pH 7,4, glicerol al 5 % F68 al 0,5 %, hFbg al 1 %, AA al 0 o 1 %	MES aumentó la velocidad de coagulación con AA, en comparación con HEPES, TRIS la inhibió. Coagulación inhibida (por glicerol) en ausencia de AA con cualquier tampón.
W	Sacarosa al 10-20 %, hFbg al 1 %, AA al 1 %, HEPES/ NaCl	Precipitación reducida en sacarosa al 10 y 20 %, pero coagulación profundamente inhibida.
		Se formaron geles claros transparentes.
	Sacarosa al 20 %, hFbg al 1 %, AA al 1 %, HEPES/ NaCl, F68 al 0,5-3 %	La adición de hasta el 3 % de F68 a la mezcla no causa precipitación. La coagulación sin formación de gel intacta se produjo con F68 al 3 %.
X	Sacarosa al 10-20 %, hFbg al 1 %, AA al 1 %, HEPES/ NaCl, F68 al 0,5 %	La sacarosa al 10 y 20 % previene la precipitación mediante la adición de F68 a la mezcla de hFbg/AA.

Código	Condiciones experimentales	Sumario de resultados
Y	AA al 1 %-2,5 %, bFbg al 1 %, glicerol al 10 %, bFbg al 1 %	AA al 1 %-2,5 % causó precipitación progresiva. Esto se redujo por la adición de glicerol. La coagulación y la formación de gel ocurrieron con AA al 1,75 % y más. Es decir, AA superó el efecto de inhibición del glicerol.
	AA + glicerol al 10 % (0,5-1 %), bFbg al 1 %, bFbg al 1 %, F68 al 0,5-2 % (glicerol adicional al 5 %)	Coagulación inhibida sin F68 (debido al glicerol). F68 a > 0,5 % causó precipitación progresiva y coagulación acelerada. AA al 1 %/glicerol al 5 % con F68 al 0,5 % se aclaró a 37 °C y se coaguló con normalidad.
	AA al 0,5 %, bFbg al 1 %, glicerol al 5 %, F68 al 0,5-2 %	F68 al 1 % es el umbral para la precipitación, pero da una coagulación normal. F68 al 0,5 % proporciona coagulación inhibida. Es decir, la proporción de glicerol, F68 y AA en conjunto determinan la precipitación.
Z	Sacarosa al 4,7-23,5 %, hFbg al 1 %, AA al 1 %, HEPES/NaCl, ± F68 al 0,5 %	Sin sacarosa, se estabiliza el Fbg en la mezcla por calentamiento a 37 °C, pero se inhibe la coagulación, y se produce una formación final de gel transparente. La adición de F68 sin sacarosa causa precipitación de Fbg (parcialmente invertida al calentar hasta 37 °C, y coagulación muy rápida. La sacarosa más F68 precalentada previene la precipitación de Fbg, y la coagulación continúa con normalidad.
A2	AA (0, 0,5 %, 1 %), F68 (0,5-1 %) bFbg al 1 %, MES pH 7,4,	AA al 0,5 % con Fbg al 1 % y F68 hasta 1 % es el límite para la formación de precipitación tras el calentamiento a 37 °C.
B2	OGP (0,25-2 %), bFbg al 1 % HEPES/NaCl	OGP hasta el 2 % no causa precipitación de bFbg. Sin embargo, inhibe la coagulación, pero da lugar a la formación de gel transparente.
	OGP (0,25-2 %) ± F68 (0,5-1 %), bFbg al 1 % HEPES/NaCl	OGP al 0,5 % + F68 al 0,5 % no causan precipitación, pero al 1 % lo hace la mezcla. La mezcla al 0,5 % acelera la coagulación sobre el control, pero un poco menos que el F68 solo al 0,5 %.
	OGP (0,25-2 %), AA al 1 %, bFbg al 1 % HEPES/NaCl	La adición de OGP redujo la precipitación progresivamente hasta el 1,5 % y se mantuvo estable hasta el 2 %. La coagulación de la mezcla se inhibió al 0,5 % o menos, y aumentó al 1 %, pero menos que el control al 1,5 o 2 %.
	OGP (0,25-2 %) ± F68 (0,5-1 %), AA al 1 %, bFbg al 1 % HEPES/NaCl	Precipitación inicial alta en todas las muestras en esta serie. Sin embargo, OGP al 1 % + F68 al 0,5 % aceleró la coagulación observada.
	OGP (0,1-3,3 %) ± Trehalosa (6 %), AA al 1 %, hFbg al 1 % HEPES/NaCl	precipitado inicial alto en todas las muestras de esta serie, pero el calentamiento de 10 °C, 37 °C redujo la turbidez. Aumentando OGP hasta el 2 % se redujo de 0,426 (sin OGP) a 0,153 (OGP al 3,3 %). OGP al 1,8 % + trehalosa al 6,6 % redujo la DO a 0,099. Efecto en la coagulación: el aumento de OGP inhibió la coagulación (completa con un control de 5 min a 15 min con OGP al 2 % y OGP/Trehalosa durante 16 min.
C2	Trehalosa (3,3-19,8 %), Fbg al 1 %, HEPES/NaCl	Sin precipitación inicial en el intervalo. Inhibición progresiva de la coagulación en el intervalo. La trehalosa al 6,6 % da aproximadamente 0,5 veces de tiempo para la coagulación.
	Trehalosa (3,3-6,6 %), OGP al 1 %, F68 al 0,5 %, Fbg al 1 % AA 1 %	Leve inhibición de la coagulación con la trehalosa al 3 y 6 %. Con trehalosa al 3,3 %, OGP + F68 se inhibe ligeramente, pero con trehalosa al 6,6 %, la coagulación es menos inhibida que sin tensioactivos.
D2	hFbg al 1 %, HEPES pH 7,4, MES 6,7 y 0,05, 7,4 en NaCl	Velocidad de coagulación: MES 6,7 > 7,05 > 7,4 > HEPES 7,4.
	OGP (1-5 %), hFbg al 1 %, HEPES pH 7,4	OGP no produce precipitación de Fbg, inhibe progresivamente la coagulación, pero proporciona geles transparentes.
	OGP (2-4 %), F68 (0,5-1 %) hFbg al 1 %, HEPES pH 7,4	OGP al 3 % + F68 al 1 % da una coagulación más rápida que la del control. La mayor proporción de F68 causa precipitación inicial y acelera aún más la coagulación (parcialmente revertida al calentarse a 37 °C).
	OGP (2 %), F68 (0,5-1 %) AA al 1 %, hFbg al 1 %, HEPES pH7,4	AA aumenta en gran medida la coagulación en comparación con el control anterior. Con un OGP al 2 %, se inhibe ligeramente. Con OGP al 2 % + F68 al 0,5 % es mayor que el control de AA, pero con precipitación

Código	Condiciones experimentales	Sumario de resultados
		inicial al calentar hasta 37 °C.
	OGP (2 %), F68 (0,5-1 %) AA al 1 %, trehalosa al 6,6 %, hFbg al 1 %, HEPES pH 7,4	La trehalosa reduce la precipitación debido a OGP al 2 % + F68 al 0,5 % (más al calentar hasta 37 °C).

Discusión:

Estos estudios evalúan factores (componentes potenciales de la mezcla de fabricación de Smart Matrix) que influyen en la solubilidad y la coagulación enzimática (catalizada por trombina) del fibrinógeno.

El principio de este sistema experimental es medir la precipitación y la coagulación aumentando la turbidez en un volumen de 1 ml en una cubeta. Una advertencia es que la coagulación del fibrinógeno en algunas condiciones se desarrolla con una turbidez reducida, y el aumento de la turbidez no necesariamente indica una gelificación física. Sin embargo, la inspección de las mezclas de reacción puede establecer fácilmente estas excepciones.

La complejidad de la mezcla de fabricación Smart Matrix genera problemas para el proceso de optimización. Una consideración principal es que si bien los factores fisicoquímicos que influyen en la solubilidad de la proteína en una solución acuosa tamponada son relativamente fáciles de entender (por ejemplo, fuerza iónica, pH), la adición de un segundo componente, en este caso, de ácido algínico, introduce posibles interacciones fisicoquímicas competitivas entre las dos especies macromoleculares, y por lo tanto, la complejidad en la predicción del resultado (por ejemplo, precipitación). La secuencia de experimentos presentada en el presente documento se vio influida por una búsqueda conveniente de los efectos significativos entre varias variables potenciales.

SUMARIO Y CONCLUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Efectos sobre la precipitación y la coagulación del fibrinógeno

Fuerza iónica

La fuerza iónica elevada provoca una inhibición proporcional de la velocidad de coagulación, y una baja fuerza iónica provoca la precipitación. El aumento de la fuerza iónica hasta aproximadamente 60 mM tiene un efecto de disolución de proteínas por adición de sal sobre la solubilidad del fibrinógeno.

El NaCl mantiene la solución de Fbg con tensioactivo (por ejemplo, la disminución de 150-100 mM da lugar a la precipitación del Fbg causada por F68 al 1 %).

Entorno de aniones y cationes

La sustitución del sodio por potasio aumenta la precipitación del Fbg.

La sustitución del cloruro por HEPES, TRIS o sulfato aumenta la precipitación del Fbg.

La glicina (hasta 0,2 M) aumentó la precipitación del Fbg y la coagulación acelerada.

pH

La coagulación es más rápida a 6,7 que a 7,4, pero varía con el sistema tampón: MES > HEPES > TRIS (es decir, el tampón con pKa inferior proporciona una coagulación más rápida en la mezcla de Fbg/AA).

Agente formador de volumen

El ácido algínico (AA) provoca la precipitación del Fbg y acelera la coagulación, en torno a equi-masa/volumen como el Fbg (1 %). Efecto reducido al calentar hasta 37 °C.

Pequeños hidratos de carbono y polioles

El glicerol (5-10 %), el sorbitol (22-32 %), la sacarosa (15-50 %), la rafinosa y la trehalosa (10-66 %) reducen la precipitación del Fbg e inhiben la coagulación.

Estos también reducen la precipitación del Fbg con la adición de alginato y/o tensioactivos.

Tensioactivos no iónicos

Pluronic F127 o F68 causan una precipitación del Fbg superior al 0,5 % y aceleran la coagulación.

- 5 • se reducen al aumentar la fuerza iónica, calentando a 37 °C, hidratos de carbono pequeños (glicerol, sorbitol, sacarosa, trehalosa);
- se aumenta por el ácido alginico, enfriando hasta 4 °C.

10 El Tween 20 causa cierta precipitación del Fbg en la mezcla de Fbg/AA, inhibe la coagulación (la adición de una fracción pequeña de F68 aumenta la precipitación del Fbg).

Triton X100 al 1 % provoca la precipitación del Fbg en la mezcla de Fbg/AA, aumenta ligeramente la coagulación (adición de una pequeña fracción de F68 aumenta la precipitación del Fbg).

OGP no provoca la precipitación del Fbg hasta el 2 %, pero inhibe la coagulación de forma progresiva con la concentración.

15 La mezcla de OGP con Pluronic F68 tiene un efecto de equilibrio, lo que da lugar a un equilibrio, en el que se previene la precipitación del Fbg mientras que la velocidad de coagulación se normaliza (en lugar de inhibirse).

20 Los tensioactivos Pluronic son copolímeros de bloques no clásicos. Se desconoce la base de las interacciones de la solución con estas macromoléculas disueltas. Es posible que haya una interacción competitiva rápida entre Pluronic, proteína y alginato. Pluronic puede interactuar con la proteína inicialmente debido a la agregación y precipitación hidrófobas. Esto puede invertirse térmicamente debido al aumento en la entropía de la solución. Además, se ha observado un cambio a largo plazo en la solubilidad de las mezclas complejas, con un precipitado inicial que se vuelve a disolver gradualmente, un proceso que se acelera al calentarse hasta 37 °C.

25 No se conoce si este efecto secundario se debe a cambios químicos, tal vez a la hidrólisis no enzimática de péptidos de fibrinógeno, o se debe al establecimiento de interacciones no covalentes semiestables entre las macromoléculas. Pluronic y otros tensioactivos no precipitan alginato. La combinación de alginato con diferentes tensioactivos proporciona diferencias en la solubilidad del fibrinógeno mezclado. El efecto de los azúcares pequeños es probable que aumente la entropía de la fase acuosa libre al sustituir el agua de hidratación alrededor de las moléculas de proteínas. Estas interacciones son complejas, y predecir los resultados de diversos cambios sobre bases teóricas (por ejemplo, la teoría de Flory-Huggins) basadas en datos termodinámicos específicos (que no se encuentran disponibles) probablemente tendría éxito en ausencia de un modelo computacional completo y exacto del sistema.

Conclusiones generales:

35 Una conclusión general de estos experimentos es que ciertos factores tienen un efecto que tiende a aumentar la estabilidad de la solución de proteína y también a inhibir la coagulación enzimática (por ejemplo, NaCl, glicerol, sacarosa, trehalosa, OGP).

40 Otros ciertos factores tienen un efecto que tiende a aumentar la precipitación del Fbg y también a acelerar la coagulación enzimática (por ejemplo, alginato, Pluronic F68, F127).

45 Este no es un resultado evidente, ya que se puede creer que la solubilidad de la proteína es un requisito previo para la difusión libre de las enzimas y moléculas de sustrato.

Un resultado corolario es que varias combinaciones de agentes tienen intervalos de concentraciones solapantes en los que pueden tener un efecto de (i) estabilización de la solución e inhibición de la coagulación, o (ii) aceleración de la coagulación y generación de la precipitación. Esto limita su utilidad.

50 Otro elemento sorprendente de estos resultados es el hallazgo de que, mientras se aumenta la solubilidad del fibrinógeno, los hidratos de carbono pequeños y los polioles son potentes inhibidores de la coagulación. Aunque se sabe que estabilizan las estructuras de proteínas en la liofilización, sus efectos en la solución sobre la coagulación del fibrinógeno u otros sistemas enzimáticos similares *in vitro* no se han descrito en la literatura.

55 Un elemento sorprendente más específico de los resultados es que el efecto de los tensioactivos no iónicos varía ampliamente entre (i) mantener el fibrinógeno en solución en presencia de alginato (por ejemplo, OGP) e (ii) provocar la precipitación del fibrinógeno (por ejemplo, Pluronic F68, F127, Tween20, Triton X100). Estos no son resultados evidentes, ya que las soluciones de detergentes no iónicos son, en general, conocidas por disolver proteínas.

60 Estos datos solos no bastan para derivar por completo una formulación de fabricación de armazones satisfactoria. Además, se necesitan datos de estabilidad de la espuma, ya que el agente tensioactivo usado en las mezclas debe ser capaz de crear espuma densa y soportarla durante el tiempo suficiente para permitir la coagulación del fibrinógeno. Incluso las mejores formulaciones candidatas del control combinado de la coagulación y la precipitación requerirán el control de la espuma para lograr un armazón con una estructura óptima y una eficacia biológica. El control simultáneo de los tres procesos clave de formación de espuma, coagulación y precipitación no es trivial, y la

forma de lograrlo no es evidente a partir de formulaciones conocidas de armazones y procesos de producción de matrices conocidos.

Experimentos de fabricación de armazones

Los armazones se fabricaron de acuerdo con un procedimiento estandarizado. En resumen, esto implica:

1. La preparación de todos los reactivos.
2. La adición secuencial de los reactivos a una cámara de mezclado (jeringa de extremo abierto invertida).
3. Moldeo e incubación a 37 °C en una incubadora humidificada;
4. Reticulación con glutaraldehído al 0,2 % en MES 0,1 M, pH 7,4, etanol al 80 % (4 h);
5. Reducción con borohidruro de sodio al 0,1 % (ac), 1 hora, mediante 4 lavados de 10 minutos;
6. Lavado con agua, 5 lavados de 10 minutos;
7. Liofilización.

Se pueden combinar cloruro de calcio N.B., fibrinógeno y trehalosa. La adición de trombina inició el proceso de coagulación.

Microscopía y generación de imágenes

Se cortaron muestras de los armazones preparados con un bisturí y se incrustaron con cera para el procesamiento "histológico". Se cortaron secciones (5 µm) y se tiñeron con eosina usando el método histológico convencional, y se montaron en DPX para la microscopía. Se registraron micrografías en serie de secciones a 10 aumentos usando una cámara digital LeicaDC200 y la interfaz de software LC50 Image. Se "cosieron" las imágenes en serie digitalmente entre sí (software ICE) para su evaluación.

Evaluaciones de los armazones

(i) Análisis de imágenes (distribución del tamaño de poro)

Se midieron los tamaños de poro individuales en las secciones de micrografía de los armazones con el software ImageJ.

(ii) Microestructura y homogeneidad

Se evaluaron las imágenes para determinar el tamaño de poro, la densidad de las laminillas y la homogeneidad del tamaño del poro y la distribución superior-inferior.

(iii) SEM

Se evaluaron algunas formulaciones de armazones en esta serie de experimentos:

- (i) *in vitro*, para el ingreso de fibroblastos.
- (ii) *in vivo*, para la integración en un modelo porcino de cicatrización de heridas de espesor total.

Se generaron imágenes de algunos armazones mediante SEM para corroborar el análisis de LM.

Tabla de los tensioactivos de azúcar analizados

DETERGENTE	ABR.	CONC. MICELAR CRÍTICA (CMC) (mM)	BAL HIDRÓFILO-LIPÓFILO (HLB)	PM (g/mol)
Octil-β-D-glucopiranosido	OGP	20-25	11,1	292
Laurato de sorbitano	SPAN-20	2,1-2,4	8,6	346,46
Palmitato de sorbitano	SPAN-40	1,6-1,9	6,7	402,57
Estearato de sorbitano	SPAN-60	1,6-1,9	4,7	430,62
Oleato de sorbitano	SPAN-80	1,6-1,9	4,3	428,61
n-Octil-β-D-maltósido	ODM	19,5	14,3	454,51

DETERGENTE	ABR.	CONC. MICELAR CRÍTICA (CMC) (mM)	BAL HIDRÓFILO-LIPÓFILO (HLB)	PM (g/mol)
Decil-β-D-glucopiranosido	DGP	2,2	10,2	320,42
Octil-β-D-tioglucoipiranosido	TGP	9	10,6	308,44
Hexil-β-D-glucopiranosido	HGP	250	12,3	264,31
n-Dodecil-β-D-glucopiranosido	DdGP	0,19	9,4	348,5
n-Decil-P-D-maltósido	DMP	1,8	13,5	482,6
*HLB = PM (grupo hidrófilo)/PM x 20				

A3-FORMULACIÓN OPTIMIZADA SMART MATRIX™ SMOF n.º 1

- El OGP es un detergente usado para disolver proteínas integrales de membrana, y puede eliminarse fácilmente del extracto de proteína final. El OGP se disuelve en H₂O desionizada a una concentración del 20 % en peso y se usa como tensioactivo en la formulación actual, porque forma una espuma relativamente estable y también tiene una compatibilidad relativamente alta con la solubilidad del fibrinógeno en los estudios de coagulación. El OGP se usa junto con un Pluronic (F-68) en una proporción de 4:1, porque se encontró que esta proporción era más eficaz para estabilizar la espuma. Esta fórmula fue eficaz en la producción de espuma estable considerable según lo confirmado por análisis visual, histológico y de ensayo de coagulación. Se escogió la trehalosa un "poliol" con efectos estabilizantes de la solución pero una inhibición menos potente de la coagulación de la trombina que otros polioles. Esta formulación ha sido denominada "Formulación Optimizada Smart Matrix™ n.º 1". La fórmula específica es: Formulación Optimizada Smart Matrix™ n.º 1 (por orden de adición).
1. Solución madre de CaCl₂ 1 M preparada en H₂O desionizada (16,2 µl - que da lugar a aproximadamente 2 mM en la mezcla);
 2. Proteína de fibrinógeno al 2 % en peso preparada en Mes/NaCl (3 ml);
 3. Solución madre saturada de trehalosa al 66 % preparada en H₂O desionizada (600 µl);
 4. Solución madre de 10 UI/ml de trombina (750 µl);
 5. Ácido algínico al 2 % en peso preparado en Mes/NaCl (1,5-3 ml);
 6. OGP al 20 % en peso preparado en H₂O desionizada y mezclado con F-68 al 20 % en peso en la proporción de 4:1 (750 µl).

- Esta fórmula se usó en los experimentos posteriores para investigar diferentes tensioactivos (p29-41), a excepción de la variación del componente tensioactivo en 6 de las mezclas anteriores.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
OGP al 20 %/F-68 al 20 % (4:1)(750 µl)	Buena formación de espuma (50 ml)	Grandes burbujas en la parte superior del armazón en comparación con la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Persisten pocas burbujas de gran tamaño en el armazón. Persistieron las diferencias de arriba a abajo.

Sumario de resultados

- La producción de un armazón a través de "SMOF n.º 1" presentó una buena formación de espuma, llenando por completo el recipiente de mezcla de 60 ml. Los estudios de coagulación mostraron una ligera inhibición del inicio de la coagulación, pero una buena estabilidad de la solución de proteína, y el gel resultante resultó ser firme y sólido. Tras mezclar, la espuma presentó características de fluido, y fue fácil de golpear hasta un nivel uniforme tras el moldeo. Tras una hora del período de coagulación, había una diferencia notable en el tamaño de la burbuja formada desde la parte superior de la espuma en comparación con la base, observándose burbujas de mayor tamaño en la parte superior del armazón. Esta diferencia se mantuvo mediante la reticulación. El análisis histológico mostró que la laminilla de burbujas presente en la parte superior del armazón era de mayor espesor que las de la parte inferior. Además, hubo una diferencia menor, pero observable, en el tamaño de poro en la parte superior del armazón en

comparación con la base. Esto conduce a una reducción de la homogeneidad del armazón, a pesar de que es mejor que la de los experimentos anteriores.

Figura 1. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1.

Figura 2. Resultados de coagulación usando tensioactivo OGP/F-68.

B3-INVESTIGACIÓN DE ESTERES DE SORBITANO (SPAN)

Los Span también se conocen como ésteres de sorbitano, y son tensioactivos no iónicos lipófilos usados como agentes emulsionantes en la preparación de emulsiones, cremas y pomadas. Se estudió una serie de monoésteres de sorbitano (Span 20, 40, 60 y 80) para observar la formación de poros en Smart Matrix™. Span 20 (S-20) y Span 80 (S-80) estaban disponibles en líquidos viscosos, mientras que Span 40 (S-40) y Span 60 (S-60) estaban disponibles en polvo.

Se realizaron intentos para disolver los Span en H₂O desionizada. Se preparó una solución al 10 % en volumen de S-20 y S-80, que formó una emulsión espesa y cremosa inadecuada para las presentes necesidades. La disolución de los Span en etanol al 100 % dio lugar a una mezcla soluble, pero la mezcla de los Span no produjo espuma en absoluto en el medio alcohólico. También se preparó una mezcla de etanol y H₂O para disolver los Span, pero se observó una separación de fases que no era adecuada para las presentes necesidades. Se disolvieron los Span en una mezcla de OGP (20 % en peso) y F-68 (20 % en peso) a una proporción de 4:1 (mezcla convencional usada en SMOF n.º 1) a una concentración del 1 % p/v. S-20 y S-80 se disolvieron e inicialmente se tuvieron una buena formación de espuma en esta mezcla de detergente. Sin embargo, S-40 y S-60 necesitaron calentarse en un microondas durante 5 segundos y colocarse en un baño de agua a 37 °C durante el experimento para disolverse y formar una solución transparente.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
Span (S20/40/60/80) en OGP al 20 %/F-68 al 20 % (4: 1) (750 µ l)	Buena formación de espuma (50 ml)	Grandes burbujas en la parte superior del armazón en comparación con la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

El armazón se moldeó usando el Span al 1 % p/v en (OGP + F68). Todos los Span tuvieron una buena formación de espuma, pero se deshicieron por completo tras una hora de incubación a 37 °C. La producción de un armazón a través de SMOF n.º 1 + 0,0106 Span (20/40/60/80) presentó una buena formación de espuma, llenando por completo el recipiente de mezcla de 60 ml. Tras mezclar, la espuma presentó características de fluido, y fue fácil de golpear hasta un nivel uniforme tras el moldeo. Los armazones moldeados usando S-80 tuvieron la diferencia menos notable en el tamaño de la burbuja formada desde la parte superior de la espuma hasta la base, en comparación con los armazones moldeados usando los otros Span. Comparándolos visualmente con los armazones moldeados usando Span, el tamaño de la burbuja en la parte superior del armazón fue menor en comparación con los armazones producidos a través de SMOF n.º 1.

Sin embargo, lo importante es que la homogeneidad microestructural no se mejoró frente a SMOF1. En la Fig. 3, los agregados densos son visibles para cada combinación de Span.

[Figura 3. Armazones moldeados usando Span.

C3-INVESTIGACIÓN DE N-OCTIL β-D-MALTÓSIDO (ODM)

El ODM es un detergente no iónico hidrosoluble estrechamente relacionado con el OGP, y también se usa para la solubilización y el aislamiento de proteínas de membrana. El ODM tiene un anillo extra de 6 átomos de carbonos de piranosa debido a lo que tiene un HLB superior al de OGP. Se usó ODM para reemplazar al OGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Los armazones producidos mediante ODM tuvieron una buena formación de espuma según el análisis visual.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
ODM al 20 %/F-68 al 20 % (4:1) (750 µl)	Buena formación de espuma (60 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

- 5 La producción de un armazón a través de "SMOF n.º 1 + ODM" presentó una buena formación de espuma, llenando por completo el recipiente de mezcla de 60 ml. Para observar la capacidad de formación de espuma del ODM, se preparó la mezcla de solución en un recipiente de mezcla de 100 ml y se espumó hasta el 60 % del volumen total. Tras mezclar, la espuma presentaba características de fluido, y fue fácil de golpear hasta un nivel uniforme tras el moldeo. Hubo una reducción considerable en el tamaño de la burbuja en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 4. Tinción con eosina de la sección histológica de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + ODM.

Figura 5. Resultados de coagulación usando tensioactivo ODM/F-68.

15 D3-INVESTIGACIÓN DE DECIL β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (DGP)

El DGP es un detergente de la familia de los glucopiranosidos con mayor lipofilidad que el OGP. No es fácilmente hidrosoluble y, por lo tanto, se calentó durante cinco segundos en un microondas para disolverlo en H₂O desionizada, obteniéndose una solución al 20 % en peso.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DGP al 20 %/ F-68 al 20 % (4:1) (750 µl)	Buena formación de espuma (40 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

- 25 Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 50 % del volumen total del recipiente de mezclado, y la espuma presentó características más sólidas, lo que dificultó la extracción tras el moldeo. Hubo una reducción considerable en el tamaño de la burbuja en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 6. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + DGP.

30 E3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (DGP) + OGP

- 35 Se usó DGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DGP:F-68) y luego se calentó durante 15 segundos en un microondas y se colocó en un baño de agua a 37 °C para formar una solución transparente. El DGP por sí solo no tiene una formación de espuma particularmente buena como ya se estableció en los laboratorios de los presentes inventores, y por lo tanto, se mezcló con OGP en una proporción de 3:1 para aumentar el efecto de formación de espuma.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
(DGP al 20 % + OGP al 20 %)/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (70 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DGP/OGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 80 % del volumen total del recipiente de mezcla. Tras mezclar, la espuma presentó características sólidas y fue difícil bajarla hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 7. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Sm art Matrix™ n° 1 + DGP/OGP.

F3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (DGP) + ODM

Se usó DGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DGP:F-68) y luego se calentó durante 15 segundos en un microondas y se colocó en un baño de agua a 37 °C para formar una solución transparente. Como el DGP por sí mismo no tiene una formación de espuma particularmente buena, se mezcló de nuevo con ODM en una proporción de 3:1 para aumentar el efecto de formación de la espuma.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
(DGP al 20 % + OGP al 20 %)/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (70 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DGP/ODM" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 80 % del volumen total del recipiente de mezcla. Tras mezclar, la espuma presentó características sólidas y fue difícil bajarla hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

G3-INVESTIGACIÓN DE OCTIL-β-D-1-TIOGLUCOPIRANÓSIDO (TGP)

El TGP es un detergente no iónico hidrosoluble estrechamente relacionado con el OGP, y también se usa para la solubilización y el aislamiento de proteínas de membrana. Es estable en solución acuosa y se elimina fácilmente por diálisis. Se usó TGP para reemplazar el OGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada y se calentó durante cinco segundos en un microondas, y se colocó en un baño de agua a 37 °C para formar una solución transparente.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
TGP al 20 %/F-68 al 20 % (375 µl)	Buena formación de espuma (60 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	No se deshizo mucho con la adición del agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

Sumario de resultados

Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + TGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta un 60 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentaba características de fluido, y fue fácil de golpear hasta un nivel uniforme tras el moldeo. Hubo una diferencia notable en el tamaño de la burbuja formada desde la parte superior de la espuma en comparación con la base, como se observó a simple vista, observándose burbujas de mayor tamaño en la parte superior del armazón en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 9. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n° 1 + TGP.

Figura 10. Resultados de coagulación usando tensioactivo TGP/F-68.**H3 - INVESTIGACIÓN DE HEXIL- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (HGP)**

- 5 El HGP es un detergente iónico suave con mayor hidrofiliidad que el OGP. El HGP se usó para reemplazar el OGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada, y se calentó durante cinco segundos en un microondas y se colocó en un baño de agua a 37 °C para formar una solución transparente.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
HGP al 20 %/ F-68 al 20 % (4:1) (375 μ l)	Buena formación de espuma (40 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	No se deshizo mucho con la adición del agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

10 Sumario de resultados

- Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + HGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta un 20 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentó características líquidas y fue fácil de golpear hasta un nivel uniforme tras el moldeo. En el análisis visual, hubo una reducción considerable en el tamaño de la burbuja, y tampoco hubo mucha diferencia notable entre la capa superior e inferior del armazón en comparación con los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1".

Figura 11. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 + HGP.

- 20 **Figura 12.** Resultados de coagulación usando tensioactivo HGP/F-68.

INVESTIGACIÓN DE DODECIL β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (DdGP)

- 25 El DdGP se conoce como un detergente usado para disolver las proteínas integrales de membrana en su estado nativo. El DdGP es similar al OGP, pero con mayor lipofiliidad.

I3 - INVESTIGACIÓN DE DODECIL- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (DdGP) + OGP

- 30 Se usó DdGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DdGP:F-68) y luego se calentó durante 15 segundos en un microondas y se colocó en un baño de agua a 37 °C para formar una solución transparente. Como se encontró que el DdGP por sí mismo no tenía una buena formación de espuma, se mezcló con OGP en una proporción de 3:1 para aumentar la formación de espuma. Para evitar la precipitación de este tensioactivo, se colocó en un baño de agua durante todo el experimento.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DdGP al 20 %/OGP al 20 %/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 μ l)	Buena formación de espuma (70 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas, pero no muy homogéneas.

35 Sumario de resultados

- 40 Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DdGP/OGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 80 % del volumen total del recipiente de mezcla. Tras mezclar, la espuma presentó características sólidas y fue difícil bajarla hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

45 J3 - INVESTIGACIÓN DE DODECIL- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (DdGP) + ODM

- Se usó DdGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada, se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DdGP:F-68) y luego se calentó durante 15 segundos en un microondas y se colocó en un baño

de agua a 37 °C para formar una solución clara. Como se ha explicado anteriormente, el DdGP se mezcló con ODM en una proporción de 3:1 para aumentar la formación de espuma. Se incubó en un baño de agua a 37 °C durante todo el experimento para evitar la precipitación de este tensioactivo.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DdGP al 20 % + ODM al 20 %/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (75 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas con homogeneidad constante

Sumario de resultados

Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DdGP/ODM" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 80 % del volumen total del recipiente de mezcla. Tras mezclar, la espuma presentó características sólidas y fue difícil bajarla hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubación los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (DMP)

El DMP es un detergente iónico con una cadena de 12 átomos de carbono unida a dos anillos de carbono.

K3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (DMP) + OGP

Se usó DMP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DMP:F-68) para formar una solución clara. Se encontró que el DMP por sí mismo no tenía una buena formación de espuma, por lo que se mezcló con el OGP en una proporción de 3:1 para aumentar la formación de espuma.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DMP al 20 % + OGP al 20 %/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (70 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas con homogeneidad constante

Sumario de resultados

Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DMP/OGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 75 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentó las características de un fluido y fue fácil de bajar hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubación los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

L3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (DMP) + ODM

Se usó DMP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DMP:F-68) para formar una solución clara. Como el DMP por sí mismo no forma tanta espuma como el OGP, se mezcló con ODM en una proporción de 3:1 para aumentar el efecto de formación de espuma.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DMP al 20 %/ODM al 20 %/ F-68 al 20 % (3:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (75 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	Se deshizo mucho al añadir el agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas con homogeneidad constante

Sumario de resultados

- 5 Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DMP/ODM" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 75 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentó las características de un fluido, y fue fácil de bajar hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 13. Resultados de la coagulación usando tensioactivo DMP/ODM/F-68.

M3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (DMP) + DdGP + ODM

- 15 Se usaron DMP, DdGP y ODM a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Cada tensioactivo se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DMP:F-68) para formar una solución clara. DMP/F-68 por sí sola no tiene una formación de espuma muy buena, y por lo tanto, se mezcló con DdGP/F-68 en una proporción de 2:1 para aumentar el efecto de formación de espuma. Se mezcló ODM/F-68 en esta solución (DMP/F68 + DdGP/F-68) en una proporción de 1:3.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DMP al 20 %/ DdGP al 20 %/ ODM al 20 %/ F-68 al 20 % (2:2:1:1) (375 µl) DdGP	Buena formación de espuma (90 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	No se deshizo mucho con la adición del agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas con homogeneidad constante

Sumario de resultados

- 25 Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DMP/ODM" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 90 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentó las características de un fluido, y fue fácil de bajar hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón. Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 14. Sección histológica de tinción con eosina de la fórmula optimizada Smart Matrix™ n.º 1 (DMP + DdGP): ODM

- 35 **Figura 15.** Resultados de la coagulación usan tensioactivo (DMP + DdGP)/ODM.

N3 - INVESTIGACIÓN DE DECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (DMP) + DdGP + OGP

- 40 Se usaron DMP, DdGP y OGP a una concentración del 20 % en peso en H₂O desionizada. Cada tensioactivo se disolvió mediante la adición de F-68 en la proporción de 4:1 (DMP:F-68) para formar una solución clara. DMP/F-68 por sí sola no tiene una formación de espuma muy buena, y por lo tanto, se mezcló con DdGP/F-68 en una proporción de 2:1 para aumentar el efecto de formación de espuma. Se mezcló OGP/F-68 en esta solución (DMP/F68 + DdGP/F-68) en una proporción de 1:3.

TENSIOACTIVO	ESPUMA EN EL MOLDEO	ESPUMA TRAS 1 H DE COAGULACIÓN	ARMAZÓN EN LA RETICULACIÓN	ARMAZÓN TRAS LA RETICULACIÓN
DMP al 20 %/DdGP al 20 %/OGP al 20 %/F-68 al 20 % (2:1:1:1) (375 µl)	Buena formación de espuma (90 ml)	Pequeñas burbujas en la parte superior del armazón y hasta la base.	No se deshizo mucho con la adición del agente de reticulación.	Burbujas más pequeñas con homogeneidad constante.

Sumario de resultados

- 5 Los armazones preparados a través de "SMOF n.º 1 + DMP/OGP" se mezclaron en un recipiente de mezcla de 100 ml. La mezcla de solución formó espuma hasta el 90 % del volumen total del recipiente de mezclado. Tras mezclar, la espuma presentó las características de un fluido, y fue fácil de bajar hasta un nivel uniforme. Tras el moldeo, la espuma era homogénea en la profundidad del armazón.
- 10 Además, tras incubar los armazones durante una hora a 37 °C, el tamaño de burbuja y poro era considerablemente menor en comparación con los armazones preparados mediante "SMOF n.º 1".

Figura 16. Resultados de la coagulación usando tensioactivo (DMP + DdGP)/OGP.

- 15 Tabla que resume los intervalos de concentraciones de tensioactivo en la formulación de armazón anterior

Código del exp.	Tensioactivo (abreviaturas como en tabla, p27) [todos los tensioactivos están preparados al 20 % en peso/volumen de H ₂ O, excepto los Span]	Concentración final (% p/v) en la mezcla de formulación [el intervalo de F-68 en todas las mezclas es de 0,19-0,37] [intervalo total de tensioactivos = 0,97-1,84]
A3	OGP [en OGP al 20 %/ F-68 al 20 % (4:1)]	OGP: 0,77-1,48
B3	Span (20, 40, 60, 80) al 0,01-1 % [en OGP al 20 %/ F-68 al 20 % (4:1)]	Span: 0,009-0,09, OGP : 1,48
C3	ODM [en ODM al 20 %/F-68 al 20 % (4:1)]	ODM: 0,77-1,48
D3	DGP [en DGP al 20 %/F-68 al 20 % (4:1)]	DGP: 0,77-1,48
E3	DGP + OGP [en DGP al 20 %/OGP al 20 %/ F-68 al 20 % (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1)]	DGP: 0,32-1,1, OGP: 0,19-0,6
F3	DGP + ODM [en DGP al 20 %/ODM al 20 %/F-68 al 20 % (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1)]	DGP: 0,32-1,1, ODM: 0,19-0,6
G3	TGP [en TGP al 20 %/F-68 al 20 % (4:1)]	TGP: 0,77-1,48
H3	HGP [en HGP al 20 %/F-68 al 20 % (4:1)]	HGP: 0,77-1,48
I3	DdGP + OGP [en DdGP al 20 %/OGP al 20 %/F-68 al 20 % (1:1:1,2:1:1, 3:1:1)]	DdGP: 0,32-1,1, OGP: 0,19-0,6
J3	DdGP + ODM [en DdGP al 20 %/ODM al 20 %/F-68 al 20 % (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1)]	DdGP: 0,32-1,1, ODM: 0,19-0,6
K3	DMP + OGP [en DMP al 20 %/OGP al 20 %/ F- 68 al 20 % (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1)]	DMP: 0,6-1,1, OGP: 0,37-0,6
L3	DMP + ODM [en DMP al 20 %/ODM al 20 %/F-68 al 20 % (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1)]	DGP: 0,32-1,1, ODM: 0,19-0,6
M3	DMP + DdGP + ODM [en DMP al 20 %/ DdGP al 20 %/ODM al 20 %/F-68 al 20 % (2:1:1:1)]	DMP: 0,39-0,74, DdGP: 0,19-0,37, ODM: 0,19-0,37
N3	DMP + DdGPP + OGP [en DMP al 20 %/ DdGP al 20 %/ODM al 20 %/F-68 al 20 % (2:1:1:1)]	DMP: 0,39-0,74, DdGP: 0,19-0,37, OGP: 0,19-0,37

Tabla que muestra los resultados de coagulación de todos los tensioactivos usados durante el experimento

DATOS DE COAGULACIÓN PARA LOS TENSIOSACTIVOS DE AZÚCAR EN LAS MEZCLAS DE FABRICACIÓN ANTERIORES					
n.º	TENSIOSACTIVOS	VELOCIDAD (DO/min)	DESVIACIÓN TÍPICA	INICIO (min)	% DE GEL
1	(DMP+DdGP)ODM	0,7535 ± 0,151122	0,151122	5	100
2	1/2 OGP/F68	0,540666667 ± 0,060857	0,060857	5	90
3	(DMP+DdGP)OGP	0,54 ± 0,038691	0,038691	5	100
4	ODM/F-68	0,604666667 ± 0,062164	0,062164	9	80
5	DMP/F-68	0,628333333 ± 0,153207	0,153207	5	80
6	HGP/F-68	1,098333333 ± 0,353228	0,353228	5	90
7	TGP/F-68	1,215333333 ± 0,250388	0,250388	1	90
8	DMP+ODM	0,742 ± 0,118899	0,118899	6	90

EXPERIMENTOS ADICIONALES DE DESARROLLO DE MATRIZ/ARMAZÓN:

- 5 Las principales variables que se han ensayado están en la lista que se presenta a continuación.

Calcio

2-50 mM en la mezcla (preparado a partir de la solución madre 1 M).

10

Trombina

1,5-12 U/120 mg de Fbg

- 15 [6 ml de Fbg al 2 % = 120 mg]

Fibrinógeno

Solución al 2 %, diluida al aproximadamente 1 % en la mezcla final.

20

Alginato

(Disuelto y neutralizado con NaOH, pH 7,4)

Ácido algínico AA de Sigma,

- 25 alginato de sodio de Sigma,

LKX de ISP,

DMB de ISP,

LB de ISP (Manucol LB),

KC de ISP (alginato de propilglicol Kellcolloid), (K3B426),

- 30 AA de ISP (ácido algínico H/LDB)

NovaMatrix High M - NM MVLMW (UP VLVM), NovaMatrix High G-NM GVLMW (UP VLVG).

Preparado al 2 %, usado en proporciones con fibrinógeno de aprox. 0,125:1 a 2:1 (0,1-1,5 %).

35

Estabilizantes

Glicerol al 5 % Trehalosa al 10-11 % en la mezcla antes de la adición de trombina, y al 4-7,5 % tras la adición de trombina/alginato/tensioactivo. (Preparados a partir de una solución madre saturada al aproximadamente 60-66 % en peso).

40

Tensioactivos

Pluronic L101, L85, F68, F127

- 45 OGP (Octil-β-D-glucopiranosido),

OTP (octil-tioglucoipiranosido),

DGP (decil-β-D-glucopiranosido),

DdGP (dodecil-β-D-glucopiranosido),

ODM (Octil-β-D-maltósido),

- 50 DMP (decil-β-D-maltopiranosido).

Principalmente en una concentración de mezcla final del 0,1-1 %, con F68 y F127 ensayados al 0,1-5 %.

Metodología

- 5 Fabricación de armazones
Análisis

(I) Estructura

- 10 a) mediante LM: incrustación de cera, sección histológica y tinción con eosina.
b) SEM: rehidratación de la muestra en H₂O desionizada (retirada del sorbitol), liofilización, recubrimiento de chisporroteo de carbono, examen mediante SEM.

(II) Adhesión celular/biocompatibilidad

- 15 (III) Integración en modelo porcino de herida de espesor total.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE MATRICES:

- 20 Se evaluó la estructura física de los armazones de ensayo usando 3 características evaluadas a simple vista:

1. La homogeneidad a escala macrométrica.
2. La estructura de los poros.
3. La estructura fina, en especial, alrededor de las laminillas de los poros.

- 25 La Figura 17A muestra una estructura de doble capa a escala macroscópica no homogénea típica en una sección vertical a través de un armazón prototipo. La parte inferior se describe como estructura de "malla densa"; la superior como "estructura de poros abiertos". La estructura de malla densa se forma debido al colapso parcial del coágulo de espuma tras el moldeo. Otra estructura formada por el colapso de una espuma son las laminillas densas. Un objetivo importante es identificar las condiciones que permiten la producción de una estructura homogénea de poros abiertos sin desperdicio, y sin la formación de una malla densa ni de laminillas.

17B muestra una homogeneidad sustancial de poros abiertos y una estructura intermedia de poros abiertos, debido al aspecto compacto pelicular de esta fase.

- 35 17C muestra una estructura de poro abierto completamente homogénea. Esto muestra laminillas de poro abierto regulares de un armazón óptimo deseado, en comparación con B, pero algunos espacios de burbujas de gran tamaño y también puntos densos con estructura de laminillas.

- 40 17D muestra una estructura de poros abiertos próxima a la óptima, pero con microagregados densos.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % Trombina = 10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
A4	6 ml de hFbg 150 µl de trombina 6 ml de AA de Sigma		
B4 1-9	6 ml de hFbg 150 µl de trombina x1 6 ml de AA de Sigma	AA de Sigma/trombina de ISP, x1/x4 velocidad del mezclador: 2000/6000 rpm ± sorbital Ca 2 mM /5 mM	2000 rpm dio una estructura muy densa6000 rpm dio estructura de poros abiertos.Las capas de malla de poros abiertos y densa dieron lugar a que el uso de sorbitol aumentara la porosidad resultante de la región de estructura densa (evitando el que se deshiciera) Laminillas ligeramente más densas ricas en trombina. Poco efecto del nivel alto de Ca. AA de Sigma e ISP similares.
C4	Fbg Trombina x1 Sorbitol para la liofilización	Pluronic (0-5 %) ± Heparina	La adición de Pluronic 127 aumentó la proporción de estructura de poros abiertos, aunque esta se formó a partir de material añadido densamente en laminillas individuales. La adición de heparina también aumentó la densidad de laminillas.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % Trombina = 10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
D4 1-10	6 ml de Fbg 6 ml de AA de Sigma	trombina x1, x4 o x8 (1,5 -12 U) controles sin Pluronic Pluronic F127 al 1,4 % o 4,65 %	El aumento de la trombina sin tensioactivo aumenta la densidad del material resultante, creando una estructura con pocos poros de escala milimétrica y laminillas muy gruesas, una ECM muy inadecuada.
			La introducción de tensioactivo Pluronic F127 al 1,4 % a 12 U de trombina crea una estructura homogénea de poros abiertos, mucho mejor que la anterior, pero laminillas similarmente densas como se ha visto en el lote anterior. Un aumento adicional de F68 a 4,5 % crea una estructura de espuma pelicular-perlas elípticas de fibrina conectadas finamente a lo largo de laminillas de espuma. Alta porosidad abierta, pero fibrina bastante compacta, inadecuada para ECM.
E4 1-28 1-16 AA de Sigma 17-20 AA de ISP 21-28 KC de ISP	6 ml de Fbg	trombina x1, x4 o x8 (1,5-12 U) Pluronic F127 al 0; 0,1, 0,37, 0,73, 1,4 % AA de Sigma al 0,25-1 % AA de ISP 1 % KC de ISP al 0,25-1 %	Menos del 1,4 % de F127 y menos de 12 U de trombina es insuficiente para formar una estructura porosa aproximadamente homogénea. La reducción de la proporción de alginato del 50 al 12 % aumenta ligeramente la densidad y la estructura de tipo cinta de las laminillas, un efecto que aumenta al aumentar la trombina de 1,5 a 12. Las estructuras de poros abiertos se forman con F127 al 1,4 % de forma similar al alginato al 12 %, 15 % o 50 %. El AA de ISP da lugar a una estructura fina similar a la del AA de Sigma, pero KC de ISP (alginato de propilglicol) da fibrina no fibrilar truncada, aunque ligeramente menos anormal con 12 U de trombina que con 1,5 U de trombina.
F4	6 ml de Fbg Alginato al 1 %	trombina x1/x8 (1,5/12 U) ± Pluronic127 al 0,8 % LBA de ISP LB de ISP LF de ISP KC de ISP	x1 da más heterogeneidad que trombina x8. LBA da una estructura similar a la del AA de Sigma. LF y KC dan fibrina truncada a baja trombina. Sin diferencias estructurales importantes entre los alginatos se, laminillas ligeramente más continuas
			LF y KC > LB > LBA, es decir, LBA parece el más conductor en células. Aumento de las porosidades con 12 U de trombina en comparación con 1,5 U y F127 al 0,8 % en comparación con ninguna. Sin embargo, ninguna fórmula dio estructuras de poros abiertos completamente homogéneas.
G4 1-18	6 ml de hFbg trombina x8 (12 U) Alginato al 1 % (6ml)	AA de Sigma KC de ISP LB de ISP LF de ISP LBA de ISP	Estudio porcino Varios alginatos dieron respuestas inflamatorias, en especial, KC
H4 1-15		Tiempos de mezclado: premezcla de 30-150 s trombina AA de sigma o LBA de ISP	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % Trombina = 10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
I4 1-13	6 ml de bFbg	trombina x1-x8 (1,5-12 U) AA de Sigma al 1 % o 0,6 % "Controles sin heparina" Heparina al 0,07-0,8 %	Correlación definida entre 1,5 U de trombina y baja porosidad frente a 12 U de trombina y alta porosidad. 1,5 U de trombina da estructura de malla densa, 4 U da malla densa más voluminosa, 12 U da poro abierto estratificado principalmente "espumoso". Correlación definida entre la cantidad de heparina añadida y el peso resultante del producto con baja trombina, pero contrarrestada con trombina alta de modo que el rendimiento en masa es mayor con más heparina. La adición de heparina aumenta ligeramente la formación de poro abierto, pero el tipo laminar es similar a la ausencia de adición.
J4 1-10	6 ml de bFbg trombina x8 (12 U) 6 ml de AA de Sigma	± Heparina (100 µl 10 %)	Rendimiento en masa marginalmente inferior, pero porosidad más alta con heparina.
K4 1-16	6 ml de bFbg trombina 10X (12 U) diluyente de HEPES/NaCl	Control sin AA AA de Sigma al 0,15-1 % (1-6 ml)	
L4 1-6	6 ml de bFbg trombina x1 (150 µl)	AA de ISP al 0,5-1 % (3-6 ml) CaCl ₂ , 2;12,5; 25 mM (Ca alto seguido de citrato tras baño de reticulación)	Para evaluar el AA de ISP en la estructura. También para evaluar el calcio alto más lavado con tampón de quelato tras la reticulación. El lavado tras la reticulación con citrato no causó un efecto importante en la estructura del armazón, por lo que podría ser una etapa de procesamiento alternativa.
M4	6 ml de Fbg trombina x1 (150 µl) Sigma 6 ml	Pluronic L101, F77 (0,16-1,5 %)	L101 tiene un potente efecto contra la formación de espuma.
N4	6 ml de bFbg trombina x1 (150 µl) 6 ml de AA de ISP	Control Pluronic F68, P85, L121 (0,16 o 1,5 %)	L121 tiene un potente efecto contra la formación de espuma.
O4 1-17	6 ml de hFbg trombina x1 (150 µl) 6 ml de Sigma	AA de Sigma AA de ISP LBA de ISP Pluronic L101 Pluronic F127	L101 tiene un potente efecto contra la formación de espuma que crea una SM de malla densa. F127 tiene un efecto de formación de espuma, crea un armazón poroso, pero esta formulación tiene una estructura bifásica. Cada alginato forma un armazón macroscópicamente aceptable, pero el LKB provoca más inflamación <i>in vivo</i> que el AA de Sigma o el AA de ISP (experimentos porcinos 9 y 10)
P4 1-18	6 ml de Fbg trombina x1 (150 µl) 6 ml de alginato	Pluronic L101 (contra la formación de espuma) al 0,016 % Pluronic F127 (de formación de espuma) al 1,5 %	L101 reduce notablemente la formación de espuma de F127. La estructura resultante con solo L101 es malla densa homogénea, con combinación con 127, malla densa con

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % Trombina = 10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
		Por separado o juntos ISPAA (± extracción de carbón vegetal), LBA o AA de Sigma	algunos poros de mayor tamaño.
Q4 1-10	6 ml de Fbg trombina x1 (150 µl) 6 ml de AA de Sigma Pluronic F127 1.5 %	Efecto de L101 previamente mezclado con AA al 0,015 %:2 %	Efecto contra la formación de espuma transferido a la mezcla.
R4 1-8	6 ml de Fbg 6 ml de alginato trombina x1 (150 µl) Pluronic al 1,5 %	AA de Sigma, AA de ISP o AA de ISP en autoclave Pluronic F127 o F68	Estructura SM similar con cada alginato.
S4 1-18	Fbg 3 ml Ca ²⁺ 1 mM trombina x1	AA de ISP al 12,5-50 % Pluronic F68 al 0,8-4 %	Los armazones no se coagularon: 1 mM demasiado bajo.
T4 U4 1-19	3 ml de Fbg trombina x1 x3 x4 (1.5, 3, 4.5 U)	Pluronic F68 al 0,4-2,7 % AA de ISP- o AA de ISP en autoclave al 20 % Viastarch en lugar de alginato	F68 al 1,5 % proporciona una porosidad homogénea, pero menos proporciona malla densa y zonas de malla abierta, pero presenta microagregados. La disminución del alginato y el aumento de F68 no previenen los microagregados. Sin embargo, con > 1,5 % de F68, la disminución del alginato del 1 al 0,3 % disminuye la densidad de los microagregados. La sustitución del alginato por Viastarch dio lugar a la formación de grandes agregados granulares micrométricos. El uso de Viastarch como alternativa al AA bien como mezcla 50:50 con, o sustitución del 100 % del alginato.
V4 1-13	3 ml de hFbg 3 ml de AA de ISP	Pluronic F68 al 0,4-3,9 %	El aumento de Pluronic aumenta la profundidad de la capa de poros abiertos, hasta ser casi homogénea a 5, pero aumenta la formación de microagregados.
	trombina 3 U/3 ml de Fbg	AA de ISP al 0, 12,5, 25, 50 %	La trombina controla el grado en que se forma una capa de malla densa, aunque esto no es del todo constante. Esto señala la importancia principal del tensioactivo para determinar la estructura de los poros.
W4 1-15	6 ml de hFbg trombina x5 (7.5 U)	6 ml o 1,5 ml de AA de ISP Pluronic F68 al 1,4 o 2,7 % Trombina x3	
X4 1-6	6 ml de bFbg 6 ml de AA de ISP trombina x4 Pluronic F68 al 1,47 %	sin variables	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % Trombina = 10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
Y4 1-15	3 ml de Fbg 3 ml de AA de ISP	Trombina x5 o x10 NaCl 150 o 400 mM Ca ²⁺ 2 o 5 mM Pluronic F68 al 1,45 o 2,7 %	Experimento de combinación NaCl elevado para aumentar la solubilidad de la proteína.
Z4 1-20	6 ml de hFbg 6 ml de AA de ISP trombina x10 Pluronic F68 al 0,7 %	Ca ²⁺ 2-12,5 mM Láminas de 5 x 5 o 10 x 10	Armazones de ensayo porcinas La inflamación aumentó con Ca ²⁺ > 2 mM
AA4 1-8	3 ml de Fbg 3 ml de ISPAA Pluronic F68 al 0,77 %	NaCl 75 o 150 mM trombina x1-x5	Efecto de NaCl reducido (posible aumento en la velocidad de coagulación).
AB4 1-10	3 ml de Fbg 3 ml de AA de ISP (4,5 ml para n.º 10)	trombina x1-x5 Pluronic F68 al 0,12 o 0,24 %	Pluronic reducido hasta el umbral para la solubilidad de la proteína.
AC4 1-10	3 ml de Fbg Premezcla de AA/glicerol fbg:AA aprox 50:50 glicerol final aprox al 5 %	trombina x1-x5	
AD4 1-4	3 ml de Fbg Premezcla de AA/glicerol fbg:AA aprox 50:50 glicerol final aprox al 10 %	trombina x5 n.º1 o x10 n.º2-4	Agregados vistos en el armazón.

Discusión

Este trabajo estableció que, sin embargo, se podía producir un poro abierto mediante el uso de un tensioactivo plurónico de formación de espuma (F127 o F68) añadido a una mezcla de coagulación de alginato de fibrinógeno que contiene calcio (bajo, de hasta) 2 mM. Sin embargo, no se identificó ninguna estrategia para producir una estructura homogénea de poro abierto con una microestructura fibrosa laminar abierta sin microagregados.

Calcio

Varios experimentos *in vivo* han demostrado una correlación entre la concentración de Ca²⁺ en la mezcla de fabricación de SM y la respuesta inflamatoria resultante (normalmente, alcanzando un máximo alrededor de dos semanas después del injerto). No se ha demostrado definitivamente que los iones de Ca²⁺ sean directamente responsables de la respuesta inflamatoria, aunque se encontraron pruebas previamente que sugieren con fuerza que esto podría ocurrir a través de la formación de precipitado de fosfato de calcio. Otra posibilidad concebible es que los iones de calcio dieran lugar a la incorporación de otro factor tal como alginato en el armazón resultante, lo que causara la inflamación. Sin embargo, la exposición directa de neutrófilos al alginato *in vitro* no condujo a la activación, mientras que en el mismo ensayo, el fosfato de calcio causó una profunda activación citolítica de los neutrófilos.

Un resultado importante de estos armazones fue que incluso pequeños aumentos en la concentración de Ca²⁺ durante la fabricación dieron como resultado una mayor inflamación que a 2 mM, aunque la reducción de calcio a 1 mM dio lugar a una coagulación inadecuada de la mezcla de armazón. Por consiguiente, la concentración de calcio preferida es de aproximadamente 2 mM.

Alginato

El alginato como agente formador de volumen y coligativo tiene varias propiedades potencialmente adecuadas (i)

como con los polisacáridos, en general, forma complejos moleculares altamente hidratados en soluciones acuosas; (ii) la densidad de grupos hidroxilo que confiere alta polaridad tiene potencial para la interacción con proteínas, (iii) los restos ácidos, disponibles para interacciones relativamente fuertes (iónicas) con residuos de proteína de superficie. Es importante destacar que se encontró experimentalmente que la incorporación del alginato crea una malla o retícula de fibra voluminosa.

Inicialmente, se encontró que la mezcla con la misma proporción en masa de proteína de fibrinógeno y alginato formaba un material potencialmente estable tras la coagulación catalizada por la trombina.

Sin embargo, es posible que, dependiendo de otras variables de fabricación, la proporción de alginato pueda superar la capacidad de unión potencial a la proteína de fibrina. Los experimentos que variaron la cantidad de alginato mostraron una variación correspondiente en el rendimiento en masa del producto. Sin embargo, la microestructura del producto es similar cuando se añade alginato en el intervalo del 12 al 100 % de la masa de proteína.

La cuestión de la cantidad de alginato es difícil de resolver. Si bien la microestructura parece no variar mucho en el intervalo, basándose en el rendimiento en masa bruta del producto, la cantidad total de alginato parece depender principalmente de la cantidad en la mezcla de partida. Con respecto a la posibilidad de que el alginato pueda participar en la formación de microagregados y la quelación de calcio, además de su útil función formadora de volumen, puede ser prudente el uso de menos de una mezcla de igual cantidad de masa. Por el contrario, si se puede confirmar que la cantidad de alginato (dentro de los límites estructuralmente aceptables) es independiente del grado de respuesta inflamatoria, existe un caso opuesto para aumentar al máximo su incorporación a fin de aumentar el volumen del producto, lo que puede mejorar la hidratación de la herida y el drenaje y la protección física de las estructuras celulares nacientes durante la fase inicial de penetración del tejido.

Tipos/calidades del alginato.

El alginato varía de acuerdo con la proporción de restos de ácido galacturónico y de ácido manurónico, que corresponden a altos grados de G o M. El peso molecular del polímero también varía, con la variación correspondiente en la viscosidad convencional. Los tipos ricos en G tienen propiedades adecuadas para la extrusión de la fibra y la formación de gel firme, mientras que los tipos ricos en M son adecuados para la formación de hidrogel blando y aplicaciones de absorción acuosa o dispersión del producto. No estaba claro desde el principio qué tipo se podía esperar que funcionara mejor en una Smart Matrix, ya que, a priori, había argumentos razonables para diversas calidades: el potencial de formación de fibra de las formas ricas en G puede dar lugar a una malla entrelazada de fibras de alginato y fibrina en el producto de armazón, y contribuyen al soporte mecánico de la fibrina; la propiedad de hidrogel abierto rico en M puede conferir dilatación y absorción del fluido de la herida y mejorar el medio fisiológico para la curación de la herida. Las formas de alto peso molecular pueden durar más tiempo y conferir el beneficio correspondiente durante más tiempo; las formas de bajo peso molecular pueden eliminarse más rápidamente y permitir la curación de heridas sin impedimentos. El alginato derivado de propilglicol podría aumentar la interacción con la proteína y/o el tensioactivo, debido a la introducción de grupos no polares.

La experiencia adquirida en estos experimentos, en general, ha demostrado que, en su mayoría, existe un pequeño efecto microestructural de las diferentes calidades/tipos del alginato a la estructura de fibra de los armazones Smart Matrix, a excepción del alginato de propilglicol Kellcoid. Este material dio lugar a varillas de fibrina truncadas.

Los ensayos de ingreso celular también indican que todos los grados analizados dan lugar a estructuras de citoadhesivos biocompatibles para fibroblastos *in vitro*.

Sin embargo, la evaluación *in vivo* diferencia las calidades del alginato basándose en la respuesta inflamatoria. La histología de las biopsias tras injertos mostró que las respuestas inflamatorias en algunos casos se produjeron en zonas, mientras que en otros se produjeron en focos centrados en el material de armazón añadido que aparecen como grumos densos y no porosos.

La esterilización en autoclave y/o la extracción de carbón vegetal (para reducir la endotoxina) no eliminó la respuesta inflamatoria, aunque hubo una reducción cualitativa en la aparición de grumos densos con material de bajo peso molecular.

Tensioactivos

Los tensioactivos Pluronic se identificaron inicialmente como sustancias biocompatibles no inflamatorias no detergentes potencialmente adecuadas, con poca probabilidad de causar la desnaturalización de proteínas. Los experimentos iniciales establecieron que la coagulación podría proceder en hasta soluciones de tampón que contenían Pluronic hasta 1-2 %. Un Pluronic F127 usado inicialmente fue similar, pero ligeramente menos espumoso que F68. Otros dos, P77 y P85, fueron menos espumosos. L101 y L121 tuvieron un potente efecto contra la formación de espuma.

Se exploró el posible uso de estos agentes contra la formación de espuma, L1D1 y L121, incluso a bajas

concentraciones (del aproximadamente 0,01 %) para aumentar la homogeneidad de las mezclas de espuma, pero los efectos contra la formación de espuma fueron sumamente potentes, incluso en presencia un exceso de 100 veces de una espuma Pluronic, y no produjo armazones de poro abierto.

- 5 Se usó Pluronic F68 con preferencia a F127 en experimentos posteriores, porque parecía tener un efecto de formación de espuma de espuma ligeramente mayor, lo que podría aumentar la estructura de poro abierto del producto SM.

Trombina

- 10 La proporción original de trombina con respecto al alginato se seleccionó basándose en la actividad necesaria para coagular completamente el fibrinógeno durante 60 minutos, como se usó por primera vez en el laboratorio de los presentes inventores para preparar productos de degradación de fibrina mediante digestión con plasmina (Walker y Nesheim, 1999, *J Biol Chem* 274 pág. 5201-12). Este nivel de trombina se encontró eficaz para crear una estructura
- 15 de armazón, y se ha definido para la fabricación de SM como x1 ($x_1 = 0,0125$ UI/mg de fibrinógeno). La realización de que el colapso parcial de la estructura de la espuma durante la etapa de incubación de la coagulación de fibrinógeno creó una estructura de dos capas (densa y porosa) potenció la investigación del aumento de la concentración de trombina para evitar este colapso. Se realizaron experimentos para aumentar la cantidad usada varias veces, extendiéndose en un experimento a 15 veces, aunque comparando más comúnmente x1, x4 y x8. La
- 20 cantidad requerida para una microestructura de malla abierta óptima parece depender de la presencia y de la concentración de tensioactivos. En formulaciones posteriores, la concentración x10 se ha usado para obtener macroestructuras homogéneas usando una mezcla de tensioactivo óptima (tal como SMOF1).

El problema de fabricación

- 25 El problema inicial abordado en esta fase del trabajo fue identificar una estructura de armazón física óptima y desarrollar una forma fiable de fabricación para lograrla. Se reconoció que la falta de homogeneidad del producto era un problema para la respuesta del huésped. La estructura de malla densa se celulariza progresivamente y funciona bien como un armazón tisular. Sin embargo, era evidente que una estructura de poros abiertos podría dar lugar a
- 30 una mayor velocidad de ingreso celular, y seguir manteniendo la funcionalidad del armazón (organización de las células, vascularización, control de la inflamación).

- 35 El problema persistente de este trabajo fue que los intentos de introducir una porosidad abierta en una malla de fibra de fibrina dieron lugar a la formación de microagregados densos que parecían actuar como focos para la respuesta inflamatoria aguda.

- 40 Se exploraron diversas estrategias para resolver esto. Se encontró que las combinaciones de trombina, alginato y tensioactivo podían lograr estructuras útiles de armazones, aunque se hicieron muchos intentos antes de identificarse las fórmulas que producían las estructuras adecuadas próximas a la ideal.

Lote	Formulación a menos que se establezca: $Ca^{2+} = 2$ mM Fbg y Alginato = 2 % AA de ISP Trombina = 10 U/ml $X_1 = 0,0125$ U/mg de Fbg Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
A5	6 ml de bFbg	OGP al 0,9 o 1,7 %	OGP da buena espuma, pero
1-10	Trombina x5 (7,5 U) AA de ISP al 1 % (6 ml)	$\pm$ Pluronic F68 al 0,43 %	se deshace para formar burbujas de gran tamaño (aproximadamente 1-5 mm de diámetro) rápidamente durante la coagulación. La combinación mixta de OGP/Pluronic da una estructura de burbujas más estable con menos colapso: aproximadamente las burbujas tienen un diámetro <1 mm.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % AA de ISP Trombina = 10 U/ml X1 = 0,0125 U/mg de Fbg Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
B5 1-12	3 ml de hFbg trombina x5 (3,75 U) Alginato al 1 % (3 ml)	± Trehalosa (11 % en Fbg- 0,6 en 3 ml de Fbg) AA de ISP o NM GVLMW OGP al 0,9-2,18 % ± Pluronic F68 al 0,43 %	La adición de OGP al 0,9 % es insuficiente para formar una estructura de poros abiertos, al 1,5 %, se forma una malla densa y un poro abierto, al 2,18 %, se forma una estructura de poro totalmente abierta. La combinación de F68 al 0,4 % y OGP al 0,8 % tiene estructura de poro más abierto que OGP al 1,5 % solo, pero algo de malla densa. La adición de trehalosa aumenta la formación de poro abierto y malla de fibra. Aumentando la trombina de x5 a x10 con OGP al 2,18 % se aumenta la porosidad abierta.
C5 1-6	3 ml de hFbg -en MES NaCl pH7,4 trombina x5 (3,75 U) AA de ISP al 1 % (3 ml)	± Trehalosa (11 % en Fbg - 0,6 en 3 ml de Fbg) OGP al 0,9 o 1,7 % ± Pluronic F68 al 0,43 % Algunos en bandeja de 10 x 10 cm	MES introducido como sustituto de HEPES Los armazones funcionaron de manera eficaz, pero aún no son completamente homogéneos en la parte superior. Se intentó OGP: F68 al 0,9:0,4 % (2:1) y 1,7:0,4 % (4:1) - este último parecía estructurado de manera más homogénea.
D5 1-18	3 ml de hFbg -en MES NaCl pH7,4 trombina x10 (7,5 U)	± Trehalosa (11 % en Fbg - 0,6 en 3 ml de Fbg) AA de ISP o NM GVLMW	
	AA de ISP al 1 % (3 ml)	OGP+ Pluronic F68 (4:1) a baja (0,25 %:1 %) Media (1,5 % 0,4 %) y alta (0,5 %:2 %)	
E5 1-10	3 ml de hFbg 3 ml de AA NM GVLMW Trombina x10 Trehalosa (11 % en Fbg- 0,6 en 3 ml de Fbg)	OGP+ Pluronic F68 (4:1) a baja (0,25 %:1 %) 15 ml a 0,4 % frente a 30 ml a 0,2 % Tampón de reticulación de GTA	
F5 1-22	3 ml de hFbg 3 ml de AA NM GVLMW Trombina x10 Trehalosa (11 % en Fbg- 0,6 en 3 ml de Fbg)	0,5; 0,75; 1 ml de mezcla de OGP+ Pluronic F68 (4:1)	
G51-22 1-11	3 ml de hFbg 3 ml de AA NM GVLMW trombina x10 Trehalosa (11 % en Fbg- 0,6 en 3 ml de Fbg)	OGP+ Pluronic F68 (4:1) 3; 2,5; 2; 1,5 ml de mezcla de Fbg a 0, 0,062-1,06 en 3 ml de AA para reducir la proporción de Fbg:AA	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ = 2 mM Fbg y Alginato = 2 % AA de ISP Trombina = 10 U/ml X1 = 0,0125 U/mg de Fbg Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
H5 1-15 hFbg 1-6 bFbg (AS)	1 ml de bFbg Trehalosa (11 % en Fbg - 0,2 en 1 ml de Fbg) 1 ml de AA de ISP NM GVLmw	Trombina x10, x12, x15 Pluronic L101 (1 02 2,5 µl añadidos a AA, o premezcla de Fbg = 0,007 o 0,017 %)	Se intentó L101 para un posible efecto sobre el aumento de la microhomogeneidad: actúa con un potente efecto contra la formación de espuma para la formulación.
I5	SMOF1 Mezcla de OGP+ Pluronic F68 (4:1) al 0,75 a 3 ml de Fbg+3 ml de AA	Láminas de silicona Derivado del ácido acrílico Alilamina Con textura o liso	
J5 1-14	hFbg SMOF1 OGP+ Pluronic F68 (4:1) Trombina x10	Bandeja de 10 x 10 cm Bandeja de 5 x 5 cm	Lote "convencional"
K51-25	3 ml de hFbg SMOF1 OGP+ Pluronic F68 (4:1) Trombina x10	0,75-3 ml de AA de ISP	

ARMAZÓN DE MATRIZ INTELIGENTE-DESARROLLO ADICIONAL

Discusión

- 5 Se investigaron dos modificaciones principales en experimentos de desarrollo adicionales. La primera fue el uso del tensioactivo de azúcar OGP; la segundo, la trehalosa como un agente estabilizante proteico.

Estabilizantes

- 10 Tras la evaluación con glicerol, los experimentos de coagulación mostraron que los azúcares ensayados (glucosa, sorbitol, sacarosa y trehalosa) disminuyeron la precipitación del fibrinógeno en presencia de alginato y tensioactivo plurónico, pero también inhibieron notablemente la coagulación. Sin embargo, se descubrió que la trehalosa tenía un intervalo de concentraciones en el que podía estabilizar el fibrinógeno de la precipitación sin inhibir la coagulación en 15 un grado prohibitivo. En presencia de alginato y tensioactivo, se obtuvo un perfil de coagulación similar al de una solución de fibrinógeno simple. Se encontró que la evaluación de la trehalosa como estabilizante en la formulación del armazón proporciona un efecto beneficioso sobre la porosidad del producto y mejora la microestructura. Sin embargo, la trehalosa no evitó por completo la formación de microagregados dentro de la estructura del armazón cuando se usó tensioactivo plurónico.

Tensioactivo

- 25 También se examinó el efecto de un tipo diferente de tensioactivo. Los tensioactivos plurónicos (poloxámeros) son bien conocidos y se ha establecido que son útiles en sistemas biológicos, debido a los efectos "leves" (no desnaturizantes, baja citotoxicidad, bajo potencial inflamatorio), y estos efectos pueden estar relacionados con el mecanismo tensioactivo. Se cree que las moléculas forman balsas que modifican la energía superficial, a diferencia de la estructura de detergente simple (cadena de acilo y grupo de cabeza hidrófilo). Sin embargo, el uso de un nivel relativamente alto de tensioactivo plurónico (> aproximadamente 0,9 %) se asoció claramente con la formación de microagregados densos.

- 30 El siguiente tensioactivo seleccionado fue octil-β-D-glucopiranosido, que resultó dar una mejor estabilidad a la proteína en el ensayo de coagulación. Se descubrió que esto producía una microestructura mejorada, aunque daba una espuma inestable, generando burbujas muy grandes y una estructura heterogénea. Si se usó OGP sin Pluronic,

se requirió más del 2 % de OGP para obtener una estructura de poros abiertos, y también se observó la formación de microagregados densos asociados. La combinación de Pluronic F68 (o F127) con OGP mejoró notablemente la estabilidad de la espuma. En concreto, una combinación de Pluronic más OGP podría reducir el nivel total de tensioactivo hasta aproximadamente el 0,25 % de Pluronic y 1 % de OGP. El principal beneficio de esto fue la mejora en la estabilidad de la espuma, la estructura de los poros y la homogeneidad, y una aparente reducción en la formación del microagregado denso.

Esto condujo a la formulación de SM-OF1. A pesar de la estructura notablemente mejorada obtenida, todavía había algo de formación de microagregados dentro del producto de armazón.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
A6 1-6	3 ml de hFbg SMOF1 OGP+ Pluronic F68 (4:1) thr, x10	0,75-3 ml de alginato	
B6 1-6	3 ml de bFbg al 2 % 3 ml de AA de ISP al 2 % thr, 10 U/ml x10	1. SM-OF1 (OGP/F68 4:1) 2. Span-20 al 0,01 %, conc. final del 0,001 % 3. Span-80 al 1 %, conc. final del 0,1 % 4. Span20 al 0,05 % + Span- 80 al 0,5 % 5. Span20 al 0,05 % + Span- 80 al 0,05 % 6. Span-20 al 0,01 %	Los tensioactivos de la serie Span proporcionan una mejor homogeneidad y mejor microestructura frente a OGP/F68 solos. Sin embargo, la baja solubilidad acuosa de los Span es un factor limitante en las formulaciones de espuma.
C6		F68/OGP (4:1) Span 20, Span40, Span60, Span80 (0,01 %) ± tras la incubación en NaCl (mezcla de armazón desbordada)	El moldeo de espuma, en general, y en especial con OGP, muestran un colapso de pequeñas burbujas en burbujas mucho mayores durante un período corto de incubación (normalmente 10-15'). El desbordamiento con tampón tras el moldeo no resultó eficaz para prevenir esto, causando la interrupción de la espuma estructura.
D6 1-8		1-2. CONTROL (OGP+F68) en tubos de vidrio SM-OF1 (OGP+F68) en Tubos de poliestireno 5-6. S-80 al 0,01 % en tubos de vidrio 7-8. S-80 al 0,01 % en tubos de poliestireno	
E6	Evaluación de 100 ml de jeringa de mezcla	SM-OF1 (OGP+F68) o mezcla de OGP/F68 + ODM/F68 1:1 o SM-OF1 sin trehalosa	La sustitución de la jeringa mezcladora de 60 ml por una de 100 ml permite una mayor formación de espuma en los 30 segundos de la mezcla.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
F6 1-15		1. CONTROL (OGP+F68) 2-4. ½ TRE + ½ AA + ½ (OGP+F68) 5. ½ Fbg + ½ CaCl2 + ½ THR + ¼ TRE + ¼ AA + ½ (OGP+F68) 6-8. ½ TRE + ½ AA + ½ (TGP+F68) 9-11. ½ TRE + ½ AA + ½ (DGP+F68) 12-14. ½ TRE + ½ AA + ½ (mezcla de OGP/F68 + DGP/F68) en la proporción 1:1 15. ½ TRE + ½ AA + ½ (DGP/F68 + TGP/F68 + ODM/F68 + OGP/F68)	
G6	CONTROL (½ AA + ½ {DGP/F68 + OGP/F68}) en la proporción 3:1	Con tapa presionada sobre la espuma tras el moldeo.	
H6	CONTROL (½ AA + ½ {DGP/F68 + OGP/F68}) (3:1)	con tapa vacía encima con H ₂ O a 37 °C (20 ml) con tapa encima con H ₂ O a 60°C (20 ml) con tapa encima	
16	con H ₂ O a 60°C (20 ml) con tapa encima.	(½ AA + ½{DGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) (½ AA + ½ {DGP/F68 + HGP/F68}) (3:1) (½ AA + ½{DGP/F68 + ODM/F68}) (3:1), Duplicando hasta DGP + ODM en bandeja más grande con H ₂ O a 60°C (40 ml) con tapa encima.	
J6 1-12		1-3. CONTROL (½ AA + ½ {DGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) DGP 7-9, (½ AA + ½{dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) dGP 10-12 (½ AA + ½{Dgp/F68 + ODM/F68}) (3:1) dGP	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
K6 1-15		1-3. CONTROL ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + ODM/F68}) (3:1) dGP 4-6. ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {DMP/F68 + OGP/F68}) (3:1) 7-9. ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {DMP/F68 + ODM/F68}) (3:1) 10-12. ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {DdGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) 13-15. ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {DdGP/F68 + ODM/F68}) (3:1)	
L6	Mezcla de tensioactivos: DGP + OGP + F68	Goma de xantano (0,5 %) Metilcelulosa (0,5, 0,25 %) Agarosa (0,25-0,5 %)	Se obtuvieron estructuras porosas razonables con metilcelulosa (mejor al 0,25 > 0,5 %) y agarosa (buena al 0,25 %), mientras que la goma de xantano (3 ml) produjo una estructura con una organización de fibrina notablemente más densa que la observada con alginato.
M6 1-15	secador de pelo	1-3. CONTROL ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) dGP 4-6. (6 ml de XG + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) 7-9. (3 ml de XG + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) 10-12. (1,5 ml de XG + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1) 13-15. (750 ul de XG + $\frac{1}{2}$ {dGP/F68 + OGP/F68}) (3:1)	
N6 1-6	secador de pelo	1-2 CONTROL ($\frac{1}{2}$ AA + $\frac{1}{2}$ (dGP/F68) (100 ml) 4. CONTROL preparado en tubo de 60 ml y presionado en tubo universal y pipeta introducidos y colocados en baño de agua a 37 °C. 5a-5b. CONTROL preparado en tubo de 60 ml y presionado en dos tubos universales y pipeta introducidos y colocados en baño de agua a 37 °C 6a-6b. CONTROL elaborado en tubo de 60 ml e introducido en dos tubos universales y pipeta insertados y colocados en baño de agua a 37 °C	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
O6 1-16	secador de pelo	1-3 Fórmulas optimizadas Smart Matrix 1 4-6. (DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : OGP/F68 (3:1) 7-9. (DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1): ODM/F68 (3:1) 10-11. Fbg al 6 % (1 ml) + Alg al 6 % (0,5 ml) + tensioactivo anterior (usado en 7-9) 12-13. Fbg al 6 % (1ml + 0,5 ml de MES/NaCl) + Alg al 6 % (0,5 ml+ 250 ul de MES/NaCl) + tensioactivo anterior (4 %) 14-16. Fbg al 6 % (1 ml + 2 ml de MES/NaCl) + Alg al 2 % (1,5 ml) + Alg (usado en 7-9) (2 %)	
P6 1-15	secador de pelo	1-3. hFbg + ½ Alg (UPVLVM) +½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) 4-5. hFbg + ½ Alg (UPVLVG) +½ (DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) 6-15. bFbg + ½ Alg +½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1)	Todos los armazones aplastados debido a un secado por congelación inadecuado.
Q6 1-15	hFbg bFbg secador de pelo	1-3. hFbg + AA (UPVLVG) 0,5 % +½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1):ODM/F68 (3:1)(55 ml de nivel de espuma) 4-5. hFbg + ½ Alg (UPVLVM) +½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) (40 ml de nivel de espuma) 6-15. bFbg + ½ Alg +½ (DMP/F68 + DdGP/F68)	La liofilización sin sorbitol en el liofilizador piloto (temperatura establecida del estante a -40 °C) dio lugar a un producto flexible blando con cierta tenacidad.
		(2:1) : ODM/F68 (3:1) (60 ml de nivel de espuma) Liofilización con H ₂ O o sorbitol comparado con excipiente	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
R6 1-17	en presencia de secador de pelo SMOF 2	Mezcla de DMP/DdGP/ODM F68 150-750 ul, 375 y 750 ul en 10 x 10	375 ul de SM-OF2 a 3 ml de Fbg y 1,5 ml de AA da un buen equilibrio entre la porosidad abierta y la estructura fina de malla abierta. Algunos agregados densos, pero mejores frente a SM-OF1Sin tensioactivo-10 ml 150 ul - (mezcla de DMP DdGP ODM F68)-30 ml 250 ul - 55 ml de mezcla 375 ul - 55 ml de mezcla 750 ul - 75 ml de mezcla
S6 1-13	 secador de pelo	1-2. SMOF 2 + ½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) (250 ul) (10 x 10) 3-4. SMOF 2 + ½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) (275 ul) (10 x 10) 5-6. SMOF 2 + ½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1): ODM/F68 (3:1) (300 ul) (10X10) 7-8. SMOF 2 + ½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) (325 ul) (10 x 10) 9-10. SMOF 2 + ½ (DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1) : ODM/F68 (3:1) (350 ul) (10X10) 11. SMOF 2 + ½(DMP/F68 + DdGP/F68) (2:1): ODM/F68 (3:1) (375 ul) (10X10) 12-13. SMOF 2 + alginato de serie M + tensioactivo (375 ul) (10x10)	El AA de tipo M dio estructura con más microagregados que el tipo G.
T6 1-14	secador de pelo	1-2. SMOF 2 + 6 ml de AA 3-4. SMOF 2 + 3 ml de AA 5-6. SMOF 2 + 1,5 ml de AA 7-8. SMOF 2 + 1 ml de AA 9-10. SMOF 2 + 0,5 ml de AA 11-12. SMOF 2 + 1,5 ml de AA (calidad farma serie M) 13-14. SMOF 2 + 1,5 ml de AA (calidad farma serie G)	La proporción de alginato en un intervalo de aproximadamente 0,2-1,1 % no tiene un efecto importante en la estructura resultante. Sin embargo, aquí esto se repitió usando material de calidad farmacéutica de bajo peso molecular, y evaluando una formulación rica en M y rica en G. Aunque hay poco efecto de la concentración sobre la porosidad en este intervalo, hubo una disminución en la formación microagregados en el extremo inferior del intervalo, y menos con la calidad G que M.

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
U6 1-11	SMOF 2 secador de pelo	Técnicas de difusión de la espuma 1-2. (10 x 10) caída alta 3-4. SMOF 2 (10 x 10) aplastamiento 5. SMOF 2 (10 x 10) caída alta/aplastamiento 6. SMOF 2 (10 x 10) 3 toques/aplastamiento 7-9. SMOF 2 (10 x 10) 3 toques y aplastamiento suave 10. SMOF 2 (10 x 10) 3 toques fuertes y aplastamiento con 1,2 ml de L101 (5 %) 11. SMOF 2 (10 x 10) 3 toques fuertes y aplastamiento en caja	
V6 1-7	secador de pelo	1. SMOF 2 2. ½(DMP/F127 + DdGP/F127) (2:1) : OGP/F127 (3:1) 3B. ½(DMP/F127 + DdGP/F127) (2:1) : OGP/F127 (3:1) (10 x 10) 4. SMOF 2 (2 impulsores de abajo) 5. SMOF 2 (1 impulsor de arriba y 1 impulsor de abajo) 6B. SMOF 2 (1 impulsor de arriba y 1 impulsor de abajo) (10 x 10)	
		7B. SMOF 2 (2 impulsores de abajo) (10 x 10)	
W6 1-10	SMOF 2 secador de pelo	Calidad farma de serie G Alginato 3-4. SMOF 2 con 1 ml de Alginato de serie G 5-7. SMOF 2 con F127, alginato de serie G 8-10. SMOF 2 con F127 y 1 ml de alginato de serie G	

Lote	Formulación a menos que se establezca: Ca ²⁺ =2 mM Fibrinógeno (Fbg) y Alginato =2 % trombina (thr) =10 U/ml Tensioactivo = 20 %	Variable	Resultado
X6 1-15	SM-OF2 a excepción de agente formador de volumen variable	1. XG al 1 % (intervalo de 0,5 -12 ml) (30 ml de espuma) 2. XG al 1 % (6 ml)(32 ml de espuma) 3. XG al 1 % (3 ml)(34 ml de espuma) 4-5. SMOF 2 con XG al 1 % (2 ml) (35 ml de espuma) 6-7. SMOF 2 con XG al 1 % (1 ml) (30 ml de espuma) 8. (ml) (30 ml de espuma) 9. SMOF 2 sin agente formador de volumen (60 ml de espuma) 10-11. SMOF 2 con MC al 2 % (3 ml) (30 ml de espuma) 12-13. SMOF 2 con MC al 2 % (2 ml) (30 ml de espuma) 14-15. SMOF 2 con MC al 2 % (1 ml) (30 ml de espuma)	
Y6 1-11	SM-OF2 secador de pelo	1-3. SMOF 2 (10 x 10) 3 toques y aplastamiento 4-6. SMOF 2 + 50 % de todo (10 x 10) 3 toques y aplastamiento 7-11. 2 tubos de SMOF con Fbg al 6 % y alginato al 6 %	
Z6	SMOF 2 secador de pelo	Fibra de fibrina (material individual o material tejido)	Pruebas de contacto íntimo formado entre fibras de fibrina (aproximadamente 10-20 µm de diámetro) y filamentos de Smart Matrix (aproximadamente 100 nm de diámetro).

Metodología – Notas:

A. "secador de pelo"

5

El soplo de aire caliente sobre la mezcla de coagulación se usa para tratar de reducir al mínimo la reducción de la temperatura de los reactivos a 37 °C sobre la aeración con aire a temperatura ambiente.

B. "Técnicas de difusión de la espuma" – caída alta/aplastamiento/toque/toque fuerte

10

El método básico de dispersión de la espuma consiste en varios toques bruscos de la bandeja sobre la superficie de trabajo. Sin embargo, para extender la espuma uniformemente sobre una bandeja de 10 x 10 cm, se evaluaron las siguientes alternativas:

15

- Caída alta = vaciando la espuma en la bandeja desde una altura de aproximadamente 50 cm.

- Aplastamiento = extendiendo la espuma con una lámina de plástico (ya sea otra bandeja o tapa de placa de Petri). En este caso, el aplastamiento se debe realizar uniforme y suavemente desde el contacto inicial de la tapa a 30-45 ° en un lado y descendiendo lentamente para lograr un contacto completo y uniforme sin el atrapamiento en burbujas de aire de toda la espuma, extendiéndola por toda la bandeja.

20

- Toque = toque brusco, levantando y golpeando la bandeja sobre la superficie de trabajo.
- Toque fuerte = sosteniendo la bandeja por dos esquinas con ambas manos, levantándola a aproximadamente 45 ° inclinando las muñecas, y luego sacudiendo/golpeando bruscamente sobre la superficie de trabajo.

C. "Impulsor ascendente/descendente"

La mezcla del impulsor consiste en dos impulsores (diseño de hélice de triple pala) en un eje. Los presentes inventores describieron que si ambos se montan en el eje para empujar hacia abajo, el líquido recircula en la cámara de mezclado de manera muy eficaz. Se descubrió que esto aumentaba la formación de espuma en comparación con la batidora de cocina usado previamente.

D. "tapa presionada abajo/tapa encima (vacía)/tapa con agua"

Se pensó en (i) acelerar la transferencia de calor a la espuma en comparación con la transferencia convencional a la incubadora humidificada a 37 °C; y (ii) crear una superficie de espuma superior lisa y nivelada.

Estos experimentos no demostraron un gran beneficio. Un problema importante fue la dificultad para mantener las tapas niveladas, en especial, cuando estaban llenas de agua (una ligera inclinación se aumentaría por el peso adicional del agua) y reducir al mínimo el exudado de la espuma en torno a los lados de la bandeja.

Esto condujo a usar el secador de pelo como un medio alternativo de transferencia de calor.

Discusión:

En esta serie, se desarrolló una formulación denominada SM-OF2 (fórmula optimizada Smart Matrix 2) a partir de SM-OF1. Los armazones con esta formulación mostraron un buen equilibrio entre la estructura de poros abiertos y la microestructura fibrosa. El objetivo de este trabajo era mejorar la homogeneidad de la estructura de poros e investigar posibles etapas de optimización y parámetros de fabricación.

Tensioactivos

El OGP parece tener una inestabilidad intrínseca de la espuma que podría limitar su utilidad. Se investigaron varios tensioactivos de azúcar similares. Se encontró que la serie Span era de uso limitado debido a la baja solubilidad acuosa (el estado preferido era la emulsión micelar).

Se evaluaron acil-glucósidos (tales como HGP, OGP, DGP y DDGP, octil-tio-glucopiranosido) y los maltósidos (tales como ODM, DM y DDM). Se descubrió que los beneficios debidos a C10 y C12 frente a C6 o C8 eran útiles para disminuir el tamaño de la burbuja y aumentar la estabilidad. La mezcla SM-OF2 produjo armazones consistentes con porosidad abierta y microestructura homogénea casi ideales.

Agentes formadores de volumen

Los armazones se prepararon usando agentes formadores de volumen, metilcelulosa, goma de xantano y agarosa como alternativas al alginato.

Cabe señalar que la agarosa y la metilcelulosa produjeron estructuras similares al alginato, aunque las estructuras de la goma de xantano parecían ser más densas, y es poco probable que funcionen eficazmente *in vivo*. La metilcelulosa dio una estructura con poros abiertos de mayor tamaño que la estructura regular de alginato, aunque podría ser útil a concentraciones inferiores al 0,25-0,5 %.

La agarosa dio buenas microestructuras, aunque se formaron microagregados densos.

Tensioactivos

Basándose en los ensayos de estabilidad de la espuma y en los ensayos de coagulación, los tipos de tensioactivos de azúcar emergen como posibles candidatos más adecuados. A pesar de estos datos, no es completamente posible predecir el resultado de una estructura de armazón resultante. Por lo tanto, el ciclohexil-etil-β-D-maltósido (CHM) pareció producir una buena estabilidad de la espuma, y aunque su perfil de ensayo de coagulación fue bajo, produjo la estructura de gel transparente. Al moldear un armazón usando CHM, la espuma resultante colapsó rápidamente dando una estructura de armazón gelatinoso transparente. Este es robusto, pero al liofilizar formó una malla muy abierta con una porosidad de escala milimétrica. Sin embargo, otros tensioactivos que dan espumas estables y coagulación de soporte, tales como decilmaltopiranosido y n-dodecil-sacarosa dieron excelentes armazones.

ENSAYOS DE ESTABILIDAD DE LA ESPUMA:**Método**

- 5 Se diluyeron agentes acuosos al 20 % en (1) H₂O desionizada, (2) alginato al 1 %/Mes/NaCl pH 7,4, (3) bFbg al 1 %/Mes/NaCl pH 7,4, dando 1 % (50 µl más diluyente de 950 µl). Se batieron las soluciones hasta alcanzarse una espuma de equilibrio en un tubo universal con fondo cónico de 30 ml. Se midió la altura de la espuma y se midió el tiempo para que se formaran 100 µl de líquido en la base del cono del tubo. Los resultados se clasifican de menor a mayor estabilidad de la espuma.

10

Tabla de agentes tensioactivos usados en los ensayos de estabilidad de la espuma

Abreviatura	Tipo	Nombre
PPS	SB	sulfonato de 3-(1-pirolidino)-1-propano
TritonX45	N	4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol
DdGP	N	dodecil-glucopiranosido
SucO	N	mono/di-oleato de sacarosa
CHAPS	A	hidrato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
HGP	N	hexil-glucopiranosido
DMAB	B	bromuro de decil-trimetilamonio
CHM	N	ciclo-hexiletil-β-D-maltósido
Genapol	N	lauriléter de polietilenglicol
Tween20	N	monolaurato de polietilenglicol(20)-sorbitano
THESIT	N	dodeciléter de polietilenglicol
TritonX100	N	4-(1,1,3,3-eetrametilbutil)fenil-polietilenglicol
NP40	N	(Octilfenoxi)polietoxietanol
IGEPAL CA630	N	Octilfenoxi-polietoxietanol
Brij-35	N	lauriléter de polioxietileno (23)r
Empigen	Z	<i>N,N</i> -Dimetil- <i>N</i> -dodecil-glicina-betaína
Pluronic F127	N	copolímero de polietoxi-polipropiloxi
Sarkosyl	B	<i>N</i> -lauril-sarcosina
DOC	A	desoxicolato
DMG	N	decanoil- <i>N</i> -metilglucamida
Pluronic F68	N	copolímero de polietoxi-polipropiloxi
DGP	N	decil-β-D-glucopiranosido
SDS	A	dodecilsulfato de sodio
SucL	N	mono/di-laurato de sacarosa
OGP	N	octil-β-D-glucopiranosido
dDMP	N	dodecil-β-D-maltopiranosido
ODM/F68	N	octil-β-D-maltósido/F68
DdSuc	N	<i>n</i> -dodecilsacarosa
ODM	N	octil-β-D-maltopiranosido
nDSuc	N	<i>n</i> -decilsacarosa
DMP	N	decil-β-D-maltopiranosido

Resultados del ensayo de estabilidad de la espuma

15

	1 %	Acuosa			AA/MesNaCl pH 7,4			Fbg al 1 %/ MesNaCl pH 7,4			Fbg al 1 %/AA/ MesNaCl pH 7,4		
Abreviatura	Tipo	Altura/mm	%	Estabilidad	Altura/mm	%	Estabilidad	Altura/mm	%	Estabilidad	Altura/mm	%	Estabilidad
PPS	SB	11	0	ninguna	11	0	ninguna	21	91	2'			
TritonX45	N	11	0	ninguna	11	0	ninguna	11		ninguna			
DdGP	N	12	9	ninguna	24	118	29"	14	33	ninguna	11	0	2"
SucO	N	13	18	ninguna	15	36	2"	14	33	3"	11	0	ninguna
CHAPS	A	25	127	5"	36	227	1'49"	33	242	2'32"			
HGP	N	11	0	5"	25	154	5"	30	209	4'10"	27	176	2"
DMAB	B	11	0	5"	20	82	3"	30	209	9'35"	29	198	18"
CHM	N	23	109	10"	28	155	8"	33	200	14'10"	27	176	2'19"
Genapol	N	28	155	33"	13	18	18"	29	164	1'20"			
Tween20	N	26	136	1'5"	28	155	1'09"						
THESIT	N	29	164	1'6"	23	109	1'10"	28	155	1'10"			
TritonX100	N	29	164	1'07"	27	145	1'10"	26	136	1'24"			
NP40	N	29	164	1'10"	34	209	1'15"						
IGEPAL CA630	N	36	227	1'10"	27	145	1'38"	27	145	1'21			
Brij-35	N	26	136	1'26"	21	91	57"						
Empigen	Z	38	245	1'30"	35	218	1'58"	32	191	1'28"			
Pluronic F127	N	27	145	1'42"	24	118	2'05"	28	187	2'02"			
Sarkosyl	B	33	200	2'07"	37	236	2'35"	33	200	2'17"			
DOC	A	44	300	2'20"	37	236	1'48"	38	245	2'40"			
DMG	N	33	200	2'50"	29	164	5'	40	236	3'25			
Pluronic F68	N	29	164	2'47"	36	227	2'37"	29	198	2'35"			
DGP	N	34	209	3'2"	31	182	2'32"	34	209	4'22"	29	198	2'54"
SDS	A	40	264	3'30"	36	227	2'02"						

SucL	N	24	118	3'34"	16	45	6"	28		2'45"	22	100	1'52"
OGP	N	43	291	4'27"	40	264	3'22"	33	200	5'23"	46	385	4'48"
dDMP	N	27	176	6'37"	30	209	5'17"	29	198	7'55"	29	198	5'
ODM/F68	N	44	300	6'50'	35	218	3'24"						
DdSuc	N	34	209	11'04"	26	136	5'	28	187	5'29"	30	209	5'54"
ODM	N	45	309	11'25"	39	255	5'30"	33	200	10'01"	42	341	9'35"
nDSuc	N	31	182	11'36	28	155	5'	30	209	6'09"	25	154	4'30"
DMP	N	45	309	17'40"	29	164	12'35"	37	236	11'07"	34	253	8'44"
SMOF-2 DdGP/DMP /ODM/F68	N	35	218	5'45"	35	218	4'55"	38	297	6'45"	29	198	4'39"
OGP+F68 0,5 % cada uno	N				30	209	2'08"						
DMP+F68 0,5 % cada uno	N				29	198	4'25"						
OGP+F127 0,5 % cada uno	N				26	136	2'44"						
DMP+F127 0,5 % cada uno	N				26	136	4'27"						
DMP/F127 (4:1)	N	33	200	9'20"				36	227	8'14"			
DMP/F68 (4:1)	N	29	163	5'30				29	136	4'50"			

EFFECTO DE LOS TENSIOACTIVOS ALTERNATIVOS EN LA SOLUBILIDAD Y COAGULACIÓN DEL FIBRINÓGENO:

5

Objetivo

Para evaluar el efecto de diferentes tensioactivos sobre la solubilidad y la coagulación enzimática de una solución de fibrinógeno, se llevó a cabo un ensayo de coagulación, en el que se controló la turbidez de la solución a 425 nm durante 20 min, para cada tensioactivo.

10

Método

Se preparó una nueva solución de CaCl_2 1 M y se filtró en condiciones estériles antes de su uso. Se usó el tampón de MES/NaCl esterilizado en autoclave, con MES 25 mM y NaCl 150 mM, como diluyente para llevar a cabo los ensayos de coagulación. La solución de fibrinógeno bovino (BFbg) se completó hasta el 2 % en el tampón de MES/NaCl. La solución de trombina fue de 10 U/ml. Finalmente, se preparó solución de tensioactivo al 20 % en H_2O desionizada.

15

20

Se mezclaron todos los reactivos excepto la trombina en una cubeta de plástico desechable y se registró el valor de DO inicial a 425 nm. Luego se añadió trombina a la mezcla y se midió la DO a 425 nm cada minuto hasta que se completó la coagulación, mostrando la DO fuera de escala ($> 2,5$), o más de 20 min si no se produjo la coagulación.

Para cada agente tensioactivo, se ensayaron concentraciones crecientes, llevándose a cabo 6 ensayos por agente tensioactivo. La muestra de control no contenía tensioactivo.

5 La secuencia de mezcla fue: CaCl_2 , BFbg, MES/NaCl, tensioactivo y, tras registrar el valor de DO inicial, trombina. El volumen total en la cubeta fue siempre de 1 ml.

Al final del ensayo, se verificó la calidad del gel comparando cada ensayo con el control. Se calcularon la velocidad máxima y el tiempo de retardo para cada ensayo.

10 La siguiente tabla resume los reactivos usados en este estudio, su concentración y los volúmenes añadidos por ensayo:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)					
		CONTROL	A	B	C	D	E
CaCl₂	1 M	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
BFbg	2 %	500	500	500	500	500	500
Tensioactivo	20 %	0	6,25	12,5	25	50	100
MES/NaCl	25/150 mM	448	442	438	423	398	348
Trombina	10 U/ml	50	50	50	50	50	50

Sumario de reactivos, concentraciones y volúmenes incluidos en los ensayos de coagulación.

15 **Resultados**

VALORES INICIALES, CALIDAD DEL GEL, VELOCIDAD MÁXIMA Y TIEMPO DE RETARDO

20 La siguiente tabla resume los resultados para todos los tensioactivos (media de tres series):

Abreviatura	Tipo	Nombre	CONC (%)	BASE INICIAL	VELOCIDAD MÁXIMA (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL	Notas
SDS	A	Dodecilsulfato de sodio	0	0,122	1,273	3	100	inhibición completa
			0,125	0,181	n.d.	n.d.	0	
			0,25	0,143	n.d.	n.d.	0	
			0,5	0,115	n.d.	n.d.	0	
			1	0,09	n.d.	n.d.	0	
			2	0,074	n.d.	n.d.	0	
nLS	A	<i>n</i> -Lauril-sarcosina	0	0,06	1,43	3	100	inhibición completa
			0,125	0,055	1,018	5	20	
			0,25	0,052	n.d.	n.d.	0	
			0,5	0,038	n.d.	n.d.	0	
			1	0,036	n.d.	n.d.	0	
			2	0,036	n.d.	n.d.	0	
DOCA	A	Ácido desoxicólico	0	0,084	1,168	2	100	inhibición completa
			0,125	0,118	1,306	4	60	
			0,25	0,121	0,0928	15	20	
			0,5	0,073	n.d.	n.d.	0	

			1	0,052	n.d.		n.d.	0	
			2	0,058	n.d.		n.d.	0	
			0	0,098	0,726		3	100	inhibición
			0,125	0,095	n.d.		n.d.	90	
			0,25	0,106	n.d.		n.d.	80	
			0,5	0,094	n.d.		n.d.	80	
			1	0,099	n.d.		n.d.	70	
			2	0,098	n.d.		n.d.	50	
			0	0,092	0,644		3	100	inhibición
			0,125	0,094	0,8495		2	110	
			0,25	0,136	1,242		2	80	
			0,5	0,143	1,556		1	90	
			1	0,276	0,109		0	80	
			2	0,146	0,217		3	10	
			0	0,066	1,108		3	100	inhibición
			0,125	0,066	0,083		3	110	
			0,25	0,077	0,7805		3	90	
			0,5	0,095	0,801		2	40	
			1	0,107	0,814		2	40	
			2	0,111	0,199		3	40	
			0	0,111	0,597		5	100	
			0,125	0,133	n.d.		n.d.	90	
			0,25	0,122	0,2745		6	100	
CHAPS	A	Hidrato de 3-[[3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato							
DMAB	B	Bromuro de decil-trimetilamonio							
EMPIGEN	Z	<i>N,N</i> -Dimetil- <i>N</i> -dodecilglicina-betaína							
GENAPOL	N	Lauriléter de polietilenglicol							

			0,5	0,13	0,9505	4	110	
			1	0,142	1,77	3	130	
			2	0,14	1,688	0	130	
			0	0,147	0,927	4	100	
			0,125	0,132	1,198	4	90	
			0,25	0,144	1,23	4	100	
			0,5	0,154	1,45	4	80	
			1	0,154	0,874	0	80	
			2	0,161	1,282	3	60	
			0	0,09	0,72	4	100	
			0,125	0,077	0,447	4	110	
			0,25	0,072	0,776	4	130	
			0,5	0,068	0,756	1	140	
			1	0,085	0,99	3	120	
			2	0,107	0,9695	2	120	
			0	0,115	0,651	3	100	
			0,125	0,132	0,635	4	90	
			0,25	0,138	0,433	4	90	
			0,5	0,131	n.d.	n.d.	80	
			1	0,146	n.d.	n.d.	60	
			2	0,152	n.d.	n.d.	60	
			0	0,05	1,831	3	100	
			0,125	0,058	1,25	4	100	

			0,25	0,064	1,36	4	100	
			0,5	0,055	1,573	3	95	
			1	0,061	2,096	1	90	
			2	0,115	1,811	0	80	
			0	0,158	0,772	5	100	inhibición ligera
			0,125	0,146	0,706	4	90	
			0,25	0,141	0,7915	4	100	
			0,5	0,138	1,142	3	80	
			1	0,133	1,377	3	80	
			2	0,135	2,024	1	60	
			0	0,153	0,686	4	100	inhibición ligera
			0,125	0,155	0,924	4	90	
			0,25	0,164	1,732	4	100	
			0,5	0,183	1,813	2	90	
			1	0,285	1,685	1	70	
			2	0,149	0,7025	4	80	
			0	0,138	1,014	4	100	
			0,125	0,13	1,59	5	120	
			0,25	0,126	1,991	3	110	
			0,5	0,13	1,831	3	120	
			1	0,131	1,215	1	120	
			2	0,139	1,659	1	120	
			0	0,12	0,824	3	100	Precip.
Triton X-100	N	4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol						
TWEEN-20	N	Monolaurato de polietilenglicol (20)-sorbitano						
THESIT	N	Dodeciléter de polietilenglicol						
F-127	N	Polietoxi-polipropiloxi						

		copolímero	0,125	0,117	1,492	2	100	de Fbg a ≥ 1 %
			0,25	0,119	2,018	1	100	
			0,5	0,122	2,053	0	100	
			1	0,148	1,691	0	100	
			2	0,743	0,192	0	100	
			0	0,113	0,728	3	100	
			0,125	0,115	1,449	1	100	Precip. de Fbg a ≥ 1 %
			0,25	0,115	1,124	0	100	
			0,5	0,122	2,039	0	90	
			1	0,172	1,099	0	90	
			2	1,62	0,189	0	90	
			0	0,114	0,398	5	100	Gel transpa- rente
			0,125	0,107	0,277	5	150	
			0,25	0,11	n.d.	n.d.	120	
			0,5	0,108	n.d.	n.d.	110	
			1	0,104	n.d.	n.d.	100	
			2	0,114	n.d.	n.d.	70	
			0	0,049	1,312	3	100	Gel trans- parente a ≥ 1 %
			0,125	0,052	2,063	4	100	
			0,25	0,053	2,081	4	110	
			0,5	0,055	1,187	5	120	
			1	0,068	0,37	6	100	
			2	0,087	0,62	6	100	
F-68	N	copolímero de polietoxi- polipropiloxi						
CHM	N	ciclo-hexiletil- β -D-maltósido						
DdMP	N	Dodecil-maltopiranosido						

nDS	N	<i>n</i> -Decil-sacarosa	0	0,051	2,055	4	100	Inhibición ligera, gel claro a $\geq 1\%$
			0,125	0,051	1,588	4	100	
			0,25	0,049	2,086	4	100	
			0,5	0,054	1,325	4	90	
			1	0,048	0,263	3	80	
			2	0,048	0,281	2	80	
DdS	N	<i>n</i> -Dodecil-sacarosa	0	0,051	2,003	4	100	
			0,125	0,057	1,857	4	100	
			0,25	0,052	1,264	4	120	
			0,5	0,05	0,669	5	110	
			1	0,056	0,183	2	130	
			2	0,052	1,638	3	130	
SUC-L	N	Mono/di-laurato de sacarosa	0	0,054	1,202	4	100	inhibición ligera
			0,125	0,114	1,335	4	90	
			0,25	0,089	1,358	4	90	
			0,5	0,069	1,894	3	90	
			1	0,078	1,849	4	80	
			2	0,082	2	3	70	
SUC-0	N	Mono/di-oleato de sacarosa	0	0,059	1,666	4	100	Turbidez
			0,125	0,225	1,67	4	100	
			0,25	1,282	0,816	4	100	
			0,5	1,485	1,027	4	80	
			1	1,534	0,808	3	90	

			2	1,38	0,941	3	90	
SMOF-2	N	DMP al 8 % DDGP al 4 % ODM al 4 % Pluronic F68 al 4 % (Masa total de tensioactivos del 20 %)	0	0,121	0,796	4	100	
			0,125	0,121	0,786	4	110	
			0,25	0,121	0,738	4	110	
			0,5	0,123	0,73	4	120	
			1	0,124	0,832	4	120	
			2	0,128	0,978	4	110	
PPS	SB	Sulfonato de 3-(1-pirolidino)-1-propano	0	0,1	0,365	5	100	Gel transparente
			0,125	0,102	0,118	6	110	
			0,25	0,101	0,065	6	110	
			0,5	0,101	0,402	6	110	
			1	0,12	n.d.	n.d.	100	
			2	0,13	n.d.	n.d.	90	

Sumario de valores iniciales, calidad del gel, velocidad máxima y tiempo de retardo para todos los tensioactivos ensayados.

Discusión

Este estudio tenía como objetivo evaluar el efecto de diferentes clases de tensioactivos sobre la solubilidad y la coagulación enzimática del fibrinógeno bovino. Los ensayos de coagulación se llevaron a cabo para cada tensioactivo en el intervalo del 0,125 al 2 % p/v. Una limitación importante de este método turbidimétrico para medir la coagulación es que algunos tensioactivos pueden dar lugar a una coagulación de tipo gel transparente. Por lo tanto, para identificar la coagulación inhibida a partir de la formación de gel transparente, se realizó una evaluación subjetiva de la resistencia del gel en relación con el control.

Tensioactivos aniónicos

Todos los tensioactivos aniónicos estudiados en el presente documento causaron una potente inhibición de la coagulación del fibrinógeno en el intervalo de concentraciones ensayado, teniendo CHAPS el efecto menos potente. SDS es un tensioactivo aniónico clásico usado como agente desnaturizante para proteínas en técnicas bioquímicas tales como electroforesis SDS-PAGE, donde las proteínas se desnaturalizan y se separan de acuerdo con su tamaño. No sorprende el hecho de que la coagulación se haya inhibido. Los efectos similares de *n*-lauril-sarcosina, desoxicolato y CHAPS indican que este tipo de tensioactivo no es compatible con la fabricación de Smart Matrix.

Tensioactivos básicos y zwitteriónicos

El intervalo de tensioactivos básicos es menor que el de otros tipos. Sin embargo, una estructura relativamente simple, BMAB, fue inhibidora a concentraciones relevantes para la formación de espuma. De forma similar, los tensioactivos zwitteriónicos son menos numerosos que otros tipos, y el estudiado en el presente documento, EMPIGEN, también inhibió la coagulación a concentraciones de formación de espuma.

Tensioactivos no iónicos

Hay un gran número de tensioactivos no iónicos de uso común, y de los representativos ensayados, se encontró que la mayoría soporta la coagulación del fbg catalizada por trombina. Algunos tipos bien conocidos, como los tipos de polioxitileno (GENAPOL, THESIT, IGEPAL, BRIJ-35) soportaron la coagulación en todo el intervalo de ensayo. Sin embargo, otros tensioactivos similares no lo hicieron (Triton X100, Tween 20). MEGA-10 también demostró ser inhibidor, al 1 % o más. Los tipos de copolímeros de polietoxilo/polipropiloxi (Pluronic F127, Pluronic F68) soportaron la coagulación, aunque aumentaron la precipitación de proteínas al 1 % o más, que fue más notable que con GENAPOL o IGEPAL. Esto podría explicar la aparición de microagregados dentro de los armazones formados con tensioactivo Pluronic.

En esta serie, se ensayaron varios tensioactivos a base de azúcar para extender el trabajo previo a otros compuestos similares. Un resultado interesante e inicial fue el ciclo-hexil-propil-maltósido. Esto provocó la formación de un gel transparente y, por lo tanto, mostró un perfil cinético óptico muy bajo, aunque puede ser un tensioactivo adecuado para la fabricación de SM.

Se demostró un efecto similar mediante dodecil-maltósido y *n*-decil-sacarosa. En contraste con el dodecil-maltósido con geles fuertes, la decil-sacarosa dio geles más débiles. Se encontró una diferencia en la formación de gel entre la *n*-decil-sacarosa, que redujo ligeramente la resistencia del gel, y la *n*-dodecil-sacarosa, lo que proporcionó una buena resistencia al gel. Los resultados para SUC-L y SUCO también fueron notables, pero reflejan la presencia de sacarosa di-acilada y mono-acilada en estos preparados. SUC-L dio un gel notablemente más débil que *n*-dodecilsacarosa. SUC-O causó turbidez inicial, que podría deberse a la formación de una fase de gotita de tensioactivo separada de la cadena de oleato (18 átomos de carbono), o un precipitado de proteína.

Sulfobetanos

Los sulfobetanos son moléculas candidatas de interés potencial para regular la coagulación. Las sulfobetainas simples estudiadas en el presente documento mostraron una modulación de la coagulación con la formación de un gel transparente (no turbio). El valor para la fabricación es limitado debido a la falta de carácter de formación de espuma tensioactivo.

Implicaciones para la fabricación de armazones

El presente trabajo identifica un criterio básico para la idoneidad potencial de los tensioactivos para su uso como agentes de fabricación de un armazón a base de fibrina usando un método de ensayo sencillo. Los tensioactivos aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos inhiben la coagulación enzimática del fibrinógeno y, por lo tanto, son inadecuados para su posterior consideración. Varios tensioactivos no iónicos también son inadecuados en este

caso, porque causan un grado de inhibición del proceso de coagulación (NP40, MEGA-10, TritonX100, Tween20, *n*-decil-sacarosa, mono/di-laurato de sacarosa o mono/di-oleato de sacarosa). Otros tensioactivos no iónicos no inhiben la coagulación, hasta el 2 % p/v ensayado en el presente documento (Genapol, IGEPAL, THESIT, Pluronic F68, F127, BRIJ-35, ciclohexil-etil- β -D-maltósido, dodecil- β D-maltósido, *n*-dodecil-sacarosa), y por lo tanto, muestran potencial para el uso en un proceso de fabricación de armazón de fibrina.

RESULTADOS DETALLADOS DEL ENSAYO DE COAGULACIÓN

Los resultados de la coagulación para cada agente tensioactivo son las medias de tres series, para cada concentración de agente tensioactivo (masa/volumen), A = 0,125 %, B = 0,5 %, C = 0,5 %, D = 1 %, E = 2 %.

2-Ciclohexiletil- β -D-maltósido (CHM)

Se observó coagulación en el ensayo A.

3-(1-PIRIDINIO)-1-PROPANOSULFONATO (PPS)

Se observó coagulación en el ensayo C.

Lauriléter de polietilenglicol (GENAPOL C-100)

La velocidad de coagulación aumentó al aumentar la concentración de tensioactivo. Los ensayos C, D y E mostraron mayores velocidades de coagulación que el control. El ensayo A no mostró coagulación.

Octilfenoxi-polietoxietanol (IGEPAL CA 630)

Se observó coagulación en todas las concentraciones de tensioactivo.

***N,N*-Dimetil-*N*-dodecil-glicina-betaína (EMPIGEN)**

La coagulación completa solo se observó para el ensayo B, con una velocidad muy similar a la de la muestra de control.

ÁCIDO DESOXICÓLICO (DOCA)

Solo se observó coagulación a la concentración más baja de tensioactivo.

Hidrato de 3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonatp (CHAPS)

No se observó coagulación a la concentración máxima de tensioactivo.

BROMURO DE DECILTRIMETILAMONIO (DMAB)

Se observó coagulación a todas las concentraciones de DMAB excepto a las más altas (ensayo E). Para el ensayo D, se observó una precipitación inicial de BFbg.

DECANOIL-N-METILGLUCAMIDA (DMG)

Se observó coagulación a las concentraciones más bajas de DMG (ensayos A y B).

(Octilfenoxi)polietoxietanol, NONIDET P-40 (NP40)

Se midió la coagulación completa a todas las concentraciones de tensioactivo, con una velocidad más alta que la del control.

4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (TRITON X-100)

Se midió la coagulación completa a todas las concentraciones, aumentando la velocidad de coagulación con la concentración de tensioactivo.

Monolaurato de polietilenglicol (20)-sorbitano (TWEEN 20)

Al igual que con Triton X-100, se midió la coagulación completa a todas las concentraciones, aumentando la velocidad de coagulación con la concentración de tensioactivo. Sin embargo, la velocidad de coagulación más baja se observó a la concentración más alta de Tween 20.

PLURONIC F-68

Se observó precipitación inicial de BFbg con este tensioactivo, en especial, a las concentraciones más altas (ensayos D y E).

PLURONIC F-127

Mismas observaciones que con PLURONIC F-68.

Dodecilsulfato de sodio (SDS)

El SDS no permitió la coagulación a ninguna concentración.

Fórmula optimizada Smart Matrix 2 (SMOF-2)

Se observó coagulación a todas las concentraciones de tensioactivo, con una velocidad muy similar a la de la muestra de control.

Dodeciléter de polietilenglicol (THESIT)

Se observó coagulación a todas las concentraciones de THESIT. La velocidad de coagulación aumentó con la concentración de tensioactivo.

N-DECANOIL-SACAROSA (nDS)

Se observó coagulación a las concentraciones más bajas de nDS (ensayos A y B). La velocidad de coagulación disminuyó con una mayor concentración de nDS.

N-DODECANOIL-SACAROSA (ndDS)

Para este tensioactivo, se observó coagulación a las concentraciones más altas (ensayo E) y más bajas (ensayo A). También se observó coagulación en el ensayo B, aunque fue más lenta que el control, el ensayo A y el ensayo E.

DODECIL-β-D-MALTOPIRANÓSIDO (dDMP)

Se observó coagulación a las concentraciones más bajas de dDMP (ensayos A y B).

Lauriléter de polioxietileno (23) (BRIJ-35)

Se observó coagulación a todas las concentraciones. La velocidad de coagulación aumentó con la concentración de tensioactivo.

N-LAURIL-SARCOSINA (nLS)

Se observó coagulación para el ensayo A, la concentración más baja, pero no fue completa.

MONO/DI-LAURATO DE SACAROSA (SUC-L)

Se produjo coagulación a todas las concentraciones de tensioactivo. La velocidad de coagulación para los ensayos A a E fue más rápida que la del control.

MONO/DI-OLEATO DE SACAROSA (SUC-O)

Como con SUC-L, se produjo coagulación a todas las concentraciones de tensioactivo, y la velocidad de coagulación para los ensayos A a E fue más rápida que la del control. La precipitación inicial de BFbg se observó en los ensayos B a E.

RESULTADOS DE LA COAGULACIÓN

Efecto de las moléculas de polihidroxilo como agentes estabilizantes en la coagulación (I): fibrinógeno.

Objetivo

Para aprovechar la coagulación del fibrinógeno para la fabricación de armazones porosos con fines biológicos y terapéuticos, es deseable controlar la organización tridimensional de la fibrina coagulada. Para lograr esto, se ha encontrado que es útil combinar los agentes formadores de volumen y los tensioactivos con fibrinógeno. Sin

embargo, se ha descubierto que se produce fácilmente cierta precipitación del fibrinógeno a partir de dichas soluciones mixtas, lo que no es deseable. El objetivo de la presente serie de experimentos es el de evaluar el efecto de los polioles (en especial, azúcares y alcoholes de azúcar) como posibles agentes estabilizantes, sobre la solubilidad y la coagulación enzimática de soluciones de fibrinógeno usadas para la fabricación de armazones. En este primer conjunto, se evalúan los efectos sobre una mezcla de coagulación de fibrinógeno/trombina simple tamponada. En estudios posteriores, esto se extiende a mezclas que incluyen alginato y alginato más tensioactivo. La estabilidad de la solución basal y la coagulación se mide a través de la turbidez a 425 nm, controlada durante 20 minutos. Los polioles ensayados fueron glicerol, sorbitol, glucosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

10 Método

Se preparó una nueva solución de CaCl_2 1 M y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm antes de su uso. Se usó tampón de MES/NaCl en autoclave (MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para disolver el fibrinógeno y como diluyente. Se preparó solución de fibrinógeno bovino (bFbg) al 2 % en tampón de MES/NaCl. La solución de trombina fue de 10 U/ml en HEPES 25 mM, 150 NaCl mM, pH 7,4, alicuotado y almacenado a -80 °C. El glicerol se usó directamente. Los azúcares de ensayo se disolvieron en H_2O desionizada a aproximadamente la saturación a 37 °C (% p/vol de cada uno fue registrado) y se ensayaron en un intervalo de dilución de factor de dilución 6, al % p/vol final en el ensayo dado en los resultados.

Se añadieron por orden CaCl_2 , bFbg, MES/NaCl y azúcar de ensayo en una semi-microcubeta de plástico desechable y se mezclaron bien. Se registró la DO inicial a 425 nm. Luego, se añadió trombina, y se mezcló inmediatamente para iniciar la coagulación, y se registró la DO cada minuto durante 20 minutos o hasta que se hubo completado la coagulación. El volumen total del ensayo fue de 1 ml.

Al final del ensayo, se evaluó la calidad del gel manualmente comparando cada ensayo con el control.

Se calcularon la velocidad máxima y el tiempo de retardo para cada ensayo.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)					
		CONTROL	A	B	C	D	E
CaCl_2	1 M	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
BFbg	2 %	500	500	500	500	500	500
Azúcar	20 %	0	6,25	12,5	25	100	200
MES/NaCl	25/150 mM	448	442	438	423	398	348
Trombina	10 U/ml	50	50	50	50	50	50

Sumario de reactivos, concentraciones y volúmenes incluidos en los ensayos de coagulación.

Resultados

SUMARIO DE LOS DATOS DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD Y COAGULACIÓN.

AZÚCARES	% p/vol	Vol solución madre (μl)	BASE INICIAL	VELOCIDAD MÁX (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL
GLICEROL	0	0	0,044	1,238	3	100
	1,25	12,5	0,042	0,026	6	100
	2,50	25	0,043	0,108	7	100
	5	50	0,061	0,034	6	100
	10	100	0,047	0,032	n/a	90
	20	200	0,045	0,010	n/a	90
SORBITOL	0	0	0,055	1,432	3	100
	1,10	12,5	0,056	0,188	1	100
	2,20	25	0,059	0,151	1	100
	4,30	50	0,051	0,109	1	90
	8,70	100	0,047	0,077	1	90
	17,40	200	0,042	0,054	1	90
GLUCOSA	0	0	0,054	1,555	4	100

AZÚCARES	% p/vol	Vol solución madre (µl)	BASE INICIAL	VELOCIDAD MÁX (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL
	1,10	12,5	0,051	0,187	4	90
	2,30	25	0,051	0,156	3	90
	4,50	50	0,048	0,129	1	80
	9,10	100	0,046	0,081	1	80
	18,20	200	0,041	0,051	1	80
SACAROSA	0	0	0,055	1,432	3	100
	1,20	12,5	0,056	0,099	3	90
	2,40	25	0,059	0,142	1	90
	4,70	50	0,051	0,105	1	80
	9,50	100	0,047	0,058	1	80
	18,90	200	0,042	0,039	1	85
TREHALOSA	0	0	0,061	1,294	3	100
	0,60	12,5	0,057	0,827	3	100
	1,30	25	0,054	0,414	4	100
	2,60	50	0,055	0,097	2	100
	5,10	100	0,049	0,164	1	100
	10,20	200	0,048	0,113	1	100
RAFINOSA	0	0	0,056	1,432	3	100
	0,40	12,5	0,060	0,192	3	100
	0,70	25	0,058	0,138	4	100
	1,40	50	0,062	0,085	6	90
	2,90	100	0,063	0,201	1	90
	5,90	200	0,070	0,154	1	90

Sumario de valores iniciales, calidad del gel, velocidad máxima y tiempo de retardo para los polioles ensayados.

Discusión

Estos resultados se muestran en la Figura 18, y demuestran un efecto marcado y potente de los polioles (alcoholes de azúcar) sobre el perfil de coagulación del fibrinógeno. En general, se observa que la absorbancia de la estructura del gel es reducida a menos de 0,5 UA por 1 % p/vol de poliol, aunque el perfil cinético de la coagulación estimado por t_{50} (tiempo hasta alcanzar el 50 % de la DO final) se efectúa muy poco. El glicerol fue ligeramente excepcional al dar un poco de retardo en t_{50} . En particular, la menor turbidez de los geles resultantes con polioles implica una distribución más fina y difusa de las fibras de fibrina. Es importante destacar que la evaluación cualitativa de la resistencia e integridad del gel al final del período de coagulación muestra una tendencia general hacia un gel más débil con una concentración creciente de poliol, en particular al 5 % o superior. La única excepción fue la trehalosa, que no redujo la integridad del gel resultante en todo el intervalo de concentraciones ensayado, hasta el 10 %.

Aunque esta diferencia en este ensayo no es elevada, sí demuestra una posible ventaja de la trehalosa frente al resto de polioles. Una advertencia de este ensayo es la evaluación cualitativa de la resistencia e integridad del gel, que se basó en la evaluación de la resistencia del gel a la ruptura manual con una sonda roma. Esta determinación fue claramente importante, ya que sin evaluar esto en absoluto, podría llegarse a la conclusión falsa de que los perfiles de absorción más bajos con polioles son indicativos de la inhibición de la coagulación. Esto también genera una segunda advertencia sobre el método de ensayo turbidimétrico. Este método es ampliamente usado y constituye la base de muchos coagulómetros comerciales, pero es un ensayo indirecto de la coagulación enzimática del fibrinógeno, ya que mide la dispersión de la luz del producto insoluble de esa reacción. Como es evidente, cualquier diferencia en la organización a microescala del producto de fibrina influirá profundamente en el perfil de turbidez. Por lo tanto, debe investigarse la naturaleza exacta de la diferencia entre la estructura de los geles de control, que son turbios, y los geles más transparentes formados en presencia de polioles. Se ha determinado el mecanismo molecular del efecto de los polioles, pero existe la hipótesis de que las interacciones intermoleculares de los enlaces de hidrógeno o fuertes dipolos entre estos pequeños polioles y la superficie influyen en la organización de orden superior de protofibrillas de fibrina y la formación de fibrillas. Esto sería similar al efecto estabilizante de los polioles para las proteínas en solución.

A pesar de esto, los datos proporcionan una referencia útil para los efectos de estas moléculas de poliol en el sistema de coagulación de fibrinógeno de la trombina relativamente simple, en ausencia de un agente formador de volumen de molécula grande tal como el alginato.

RESULTADOS DE LA COAGULACIÓN

Efecto de las moléculas de polihidroxiolo como agentes estabilizantes en la coagulación (II): Mezcla de fibrinógeno/alginate

Objetivo

En este segundo conjunto, se evalúa el efecto de los polioles como posibles agentes estabilizantes sobre la solubilidad y la coagulación enzimática de las soluciones mixtas de fibrinógeno y alginato, a la concentración usada en la fabricación de armazones. Como antes, se midieron la estabilidad y la coagulación por turbidez a 425 nm. Los polioles ensayados fueron glicerol, sorbitol, glucosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

Método

Se preparó una nueva solución de CaCl_2 1 M y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm antes de su uso. Se usó tampón de MES/NaCl en autoclave (MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para disolver el fibrinógeno, y alginato como diluyente. Se prepararon solución de fibrinógeno bovino (bFbg) (2 %) y la solución de alginato (4 %) en tampón MES/NaCl y el pH se ajustó a 7,4. La solución de trombina fue de 10 U/ml en HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, alícuotada y almacenada a -80 °C. El glicerol se usó directamente. Se disolvieron los azúcares de ensayo en H_2O desionizada a aproximadamente la saturación a 37 °C (se registró el % p/vol de cada uno) y se ensayó a concentraciones finales del 2,5; 5 y 10 % p/v en el ensayo.

Se añadieron por orden CaCl_2 , bFbg, MES/NaCl y azúcar de ensayo en una semi-microcubeta de plástico desechable y se mezclaron bien. Se registró la DO inicial a 425 nm. Luego, se añadió trombina, y se mezcló inmediatamente para iniciar la coagulación, y se registró la DO cada minuto durante 20 minutos o hasta que se hubo completado la coagulación. El volumen total del ensayo fue de 1 ml.

Al final del ensayo, se evaluó la calidad del gel manualmente comparando cada ensayo con el control.

Se calcularon la velocidad máxima y el tiempo de retardo para cada ensayo.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN EN SOLUCIÓN MADRE	VOLUMEN (μl)			
		CONTROL	2,5 %	5 %	10 %
CaCl_2	1 M	2,7	2,7	2,7	2,7
BFbg	2 %	500	500	500	500
Azúcares	diversos	0	$X_{2,5}$	X_5	X_{10}
Alginato	4 %	250	250	250	250
MES/NaCl	25/150 mM	197,3	$197,3-X_{2,5}$	$197,3-X_5$	$197,3-X_{10}$
Trombina	10 U/ml	50	50	50	50

Sumario de reactivos, concentraciones y volúmenes añadidos en los ensayos de coagulación.

Resultados**SUMARIO DE LOS DATOS DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD Y COAGULACIÓN**

La siguiente tabla resume los resultados para todos los azúcares en presencia de fibrinógeno y alginato:

AZÚCARES	%	vol sol. madre x (μl)	DO INICIAL (A_{425})	VELOCIDAD MÁX (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL
GLICEROL	0	0	0,149	2,018	1	100
	2,50	25	0,280	0,871	3	90
	5	50	0,283	1,509	3	80
	10	100	0,167	0,067	0	80
SORBITOL	0	0	0,145	1,627	1	100
	2,50	28,75	0,450	1,175	1	90
	5	57,5	0,381	1,664	2	90

AZÚCARES	%	vol sol. madre x (µl)	DO INICIAL (A ₄₂₅)	VELOCIDAD MÁX (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL
	10	115	0,373	1,597	2	80
GLUCOSA	0	0	0,139	1,948	1	100
	2,50	27,7	0,254	2,053	3	90
	5	55,55	0,254	2,422	4	90
	10	111,11	0,229	1,762	5	90
SACAROSA	0	0	0,145	1,692	1	100
	2,50	26,50	0,448	1,343	1	100
	5	53	0,577	1,488	2	90
	10	106	0,376	1,477	3	100
TREHALOSA	0	0	0,145	1,875	1	100
	2,50	48,75	0,150	1,473	1	100
	5	97,5	0,210	1,500	2	100
	10	195	0,195	1,450	3	120
RAFINOSA	0	0	0,145	1,754	1	100
	2,50	85	0,189	1,511	1	80
	5	170	0,170	1,806	2	80

Discusión

- Estos resultados se refieren a conjuntos de datos complementarios similares derivados de una mezcla de ensayo más sencilla, en la que no se incluyó alginato. Los presentes resultados se muestran en la Figura 19, y demuestran que la introducción de alginato en la mezcla de ensayo cambia la naturaleza del efecto de los polioles. El principal interés en el efecto de estos polioles es como posibles agentes estabilizantes del fibrinógeno soluble, antes de la coagulación. En estos experimentos, se puede observar que los valores de DO de la pretrombina son de 0,1-0,2, mientras que sin alginato, normalmente son de 0,05-0,1. Sin alginato, los polioles ensayados tuvieron poco efecto sobre la turbidez previa a la coagulación, que es un índice de agregación y precipitación de proteínas. Sin embargo, en presencia de alginato, la mayoría de los polioles ensayados, en realidad, aumentaron la turbidez basal, y por lo tanto, no demuestran el efecto de estabilización deseado. Sin embargo, la trehalosa y la rafinosa causaron poco o ningún aumento en la turbidez basal.
- Mientras que sin alginato, la adición de polioles da lugar a la formación de un gel transparente, en presencia de alginato, su efecto es diferente. En cambio, retrasan la aparición de la coagulación sin un efecto marcado en la turbidez final del producto. La potencia de estos efectos es más variada con alginato que sin él (el glicerol y la glucosa muestran una notable inhibición de la coagulación al 5 % p/vol, mientras que el sorbitol, la sacarosa y la trehalosa tienen un retardo notable solo al 10 %).
- Es importante señalar que, como ocurre en ausencia de alginato, la evaluación cualitativa de la resistencia e integridad del gel al final del período de coagulación muestra una tendencia general hacia un gel más débil con una concentración creciente de poliol, incluso tan poco como el 2,5 % p/vol. La trehalosa y la sacarosa fueron distintas excepciones, que no redujeron la integridad del gel resultante en todo el intervalo de concentraciones ensayado, y la trehalosa incluso mejoró la resistencia al 10 % p/vol.
- (La turbidez basal es sensible a la temperatura, siendo mayor hacia 0 °C y reducida por calentamiento hasta 37 °C. Esto también se cumple para el efecto de polioles en las mezclas).
- Los resultados de este conjunto de datos muestran que los polioles y el alginato tienen un efecto de interacción sobre la coagulación del fibrinógeno. La mayoría de los polioles ensayados aumentaron la turbidez previa a la coagulación de la solución de alginato de fibrinógeno, lo que no es deseable. De los evaluados, solo la trehalosa y la rafinosa son posiblemente aceptables por este parámetro. También, en general, los polioles en presencia de alginato retrasan el inicio de la coagulación. Este efecto fue más variable, pero sugiere que el glicerol y la glucosa son menos útiles en este criterio. La resistencia del gel resultante es otro parámetro importante. Curiosamente, la sacarosa tuvo poco efecto sobre esto, lo que sugiere una posible idoneidad, pero la trehalosa no tiene un efecto negativo detectable e incluso aumenta ligeramente la resistencia del gel al 10 %. Curiosamente, la rafinosa debilita el gel, por lo que es menos adecuada en este criterio. Como se observa que la sacarosa tiene un efecto menos deseable sobre la solubilidad del fibrinógeno, la trehalosa emerge como una interesante molécula candidata.
- Estos datos son importantes para apreciar el efecto de la adición de polioles a una mezcla aún más compleja, cuando se añade un tensioactivo. La mezcla de fibrinógeno y alginato es relativamente estable, como se demuestra

en este conjunto de datos por una absorbancia de aproximadamente 0,15 UA frente al agua. El fibrinógeno al 2 % en solución salina tamponada a pH 7,4 (por ejemplo, HEPES/NaCl o MES/NaCl) suele ser ligeramente turbio, pero habitualmente inferior a 0,1 UA. Sin embargo, la adición de tensioactivo junto con alginato normalmente aumenta la turbidez, indicativo de precipitación del fibrinógeno. Además, se encuentra que la turbidez de las soluciones de fibrinógeno varía, y puede existir una relación entre la turbidez de la solución de partida y la extensión del aumento al mezclarse con el alginato. Experimentos anteriores en la presencia combinada de alginato y tensioactivo identificaron un beneficio de los polioles, en especial, de la trehalosa, en estabilizar o aumentar ligeramente la solubilidad del fibrinógeno basal (es decir, mantener o reducir la turbidez de dichas mezclas).

Como en el sistema de ensayo más sencillo de solo la interacción de fibrinógeno y poliol, este conjunto de datos demuestra una ventaja de la trehalosa frente a otros polioles. No se conoce el motivo del diferente efecto sobre la formación del gel de los polioles en presencia de alginato, pero existe la hipótesis de que una interacción entre las fibras de fibrina y el alginato, reflejo del efecto formador de volumen del alginato, domina sobre el efecto la dispersión de los polioles de fibras de fibrina. Estos resultados en conjunto permiten concluir que es posible usar un efecto estabilizante selectivo de pequeñas moléculas de poliol en la mezcla macromolecular compleja de proteína de fibrinógeno, un polisacárido tal como alginato y un tensioactivo. La trehalosa surge como una molécula con una combinación particularmente útil de efectos en dicha mezcla.

RESULTADOS DE LA COAGULACIÓN

Efecto de las moléculas de polihidroxilo como agentes estabilizantes en la coagulación (III): Mezcla de fibrinógeno/alginato/SMOF2

Objetivo

Los dos estudios complementarios previos caracterizaron los efectos de los polioles sobre la coagulación de soluciones de fibrinógeno y fibrinógeno más alginato, en condiciones similares a las usadas para la fabricación de armazones de fibrina porosa. Sin embargo, la mezcla real de fabricación de armazones incluye un tensioactivo, además de fibrinógeno y alginato. Se ha encontrado previamente que una mezcla de tensioactivos particular usada en SMOF2 es particularmente eficaz para producir una estructura de armazón de fibrina porosa. En este tercer conjunto, se evalúa el efecto de los polioles más útiles de estos resultados previos como posibles agentes estabilizantes en esta mezcla de coagulación más compleja. Al igual que en los ensayos previos, los efectos sobre la solubilidad previa a la coagulación, la cinética de la coagulación enzimática y el producto de gel final son necesarios para realizar una evaluación completa. Los polioles seleccionados fueron los azúcares, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

Método

Se preparó una nueva solución de CaCl_2 1 M y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm antes de su uso. Se usó tampón de MES/NaCl en autoclave (MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para disolver el fibrinógeno, y alginato como diluyente. Se prepararon solución de fibrinógeno bovino (bFbg) (2 %) y la solución de alginato (4 %) en tampón MES/NaCl y el pH se ajustó a 7,4. La solución de trombina fue de 10 U/ml en HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, alícuotada y almacenada a -80 °C. SMOF-2 era una mezcla de varios tensioactivos: DMP al 8 %, ODM al 4 %, DdGP al 4 %, Pluronic F68 al 4 % (concentración total de tensioactivo del 20 %). Se disolvieron los azúcares de ensayo en H_2O desionizada a aproximadamente la saturación a 37 °C (se registró el % p/vol de cada uno) y se ensayó a concentraciones finales del 2,5; 5 y 10 % p/v en el ensayo.

Se añadieron por orden CaCl_2 , bFbg, MES/NaCl y azúcar de ensayo en una semi-microcubeta de plástico desechable y se mezclaron bien. Se registró la DO inicial a 425 nm. Luego, se añadió trombina, y se mezcló inmediatamente para iniciar la coagulación, y se registró la DO cada minuto durante 20 minutos o hasta que se hubo completado la coagulación. El volumen total del ensayo fue de 1 ml.

Al final del ensayo, se evaluó la calidad del gel manualmente comparando cada ensayo con el control.

Se calcularon la velocidad máxima y el tiempo de retardo para cada ensayo.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN EN SOLUCIÓN MADRE	VOLUMEN (μl)					
		CONT	SMOF2	Azúcar	2,5 %	5 %	10 %
CaCl_2	1 M	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
BFBg	2 %	500	500	500	500	500	500
Azúcares	Diversas	0	0	X ₁₀	X _{2,5}	X ₅	X ₁₀

REACTIVO	CONCENTRACIÓN EN SOLUCIÓN MADRE	VOLUMEN (μl)					
		CONT	SMOF2	Azúcar	2,5 %	5 %	10 %
Alginato	4 %	250	250	250	250	250	250
Mezcla de SMOF2	20 %	0	50	0	50	50	50
MES/NaCl	25/150 mM	197,3	147,3	197,3- X ₁₀	147,3-X _{2,5}	147,3-X ₅	147,3-X ₁₀
Trombina	10 U/ml	50	50	50	50	50	50

Sumario de reactivos, concentraciones y volúmenes añadidos en los ensayos de coagulación.

Resultados

5

SUMARIO DE LOS DATOS DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD Y COAGULACIÓN

AZÚCARES	%	vol sol madre x (μl)	DO INICIAL (A ₄₂₅)	VELOCIDAD MÁX (DO/min)	TIEMPO DE RETARDO (min)	% DE GEL
SACAROSA	CONT	0	0,281	1,64	1	100
	SMOF2	0	0,285	1,42	1	100
	10 %	106	0,263	1,82	4	90
	SMOF2+2,5 %	26,5	0,264	1,71	2	90
	SMOF2+5 %	53	0,258	1,31	3	80
	SMOF2+10 %	106	0,255	1,90	4	70
TREHALOSA	0	0	0,287	1,70	1	100
	SMOF2	0	0,303	1,52	1	100
	10 %	195	0,22	1,95	4	100
	SMOF2+2,5 %	48,8	0,27	1,61	2	100
	SMOF2+5 %	97,5	0,246	1,69	2	90
	SMOF2+10 %	195	0,217	1,47	4	110
	0	0	0,206	1,538	1	100
	SMOF2	0	0,222	1,175		100
	5 %	170	0,234	0,157	4	40
	SMOF2+2,5 %	85	0,267	1,487	2	60
	SMOF2 + 5 %	170	0,266	1,595	2	50

Sumario de los valores iniciales, la calidad del gel, la velocidad máxima y el tiempo de retardo para los azúcares ensayados en presencia de fibrinógeno, alginato y la mezcla de tensioactivos SMOF2.

10

Discusión

Estos resultados se refieren a los conjuntos de datos complementarios anteriores derivados de mezclas de ensayo más sencillas, en los que se estudió el efecto de los polioles sobre el fibrinógeno o el fibrinógeno más alginato. Estos resultados se muestran en la Figura 20, e indican que los polioles más útiles para el presente estudio son la sacarosa, trehalosa y rafinosa. Los presentes resultados demuestran que la mezcla de tensioactivos de adición SMOF2 aumenta la precipitación inicial de la solución de alginato y fibrinógeno, pero tiene poco efecto sobre la cinética de la coagulación. El efecto de los azúcares candidatos es influir en la estabilidad de la solución, retrasar el inicio de la coagulación e influir en la resistencia y la integridad del gel resultante.

15

20

De los polioles candidatos, se seleccionó el azúcar sacarosa, basándose en que tiene poco impacto sobre la resistencia del gel resultante del alginato y fibrinógeno. Sin embargo, con la inclusión de tensioactivo en la mezcla de coagulación, la sacarosa no confería ningún beneficio. Tuvo muy poco efecto sobre la turbidez previa a la coagulación de la solución, inhibió el inicio de la coagulación y redujo la resistencia e integridad del gel. La rafinosa dio un resultado bastante similar. Aunque mostró cierta estabilización inicial de la mezcla de solución, este efecto diferencial no se mantuvo durante la incubación previa a la coagulación. También mostró una inhibición típica del inicio de la coagulación. Sin embargo, causó un debilitamiento sustancial del gel resultante, lo que, claramente, es

25

algo no deseable.

Como en los sistemas de ensayo más sencillos, este conjunto de datos demuestra una ventaja de la trehalosa en esta mezcla de coagulación. Tiene un notable efecto de disminución de la turbidez previa a la coagulación en mezclas complejas, junto con la formación de un gel con al menos la resistencia e integridad de los controles. Es importante la advertencia previamente identificada de la naturaleza cualitativa de la evaluación de la resistencia e integridad del gel de este ensayo. Sin embargo, esta evidencia limitada indica que diferentes azúcares influyen en la resistencia del gel, y que la trehalosa no es perjudicial para la gelificación, y puede mejorarla.

Estos resultados demuestran en conjunto la posibilidad de obtener un efecto estabilizante selectivo de determinados azúcares y otras moléculas de poliol pequeñas en la mezcla macromolecular compleja de proteína de fibrinógeno, un polisacárido tal como alginato y un tensioactivo. La trehalosa surge como una molécula con una combinación particularmente útil de efectos en dicha mezcla.

MEDICIONES DE LA POROSIDAD Y DEL TAMAÑO DE PORO

Objetivo

Es importante poder medir los parámetros que se refieren a las características estructurales principales de los armazones de fibrina reticulados. Las características de porosidad de los armazones a base de fibrina son importantes para definir un material manufacturado, así como también para determinar la función biológica.

La porosidad (volumen por unidad de masa de la proteína de armazón) proporciona un parámetro útil que se determina fácilmente. El diámetro de poro microscópico se obtiene al medir el diámetro más ancho en un espacio hueco interno. Aunque estos parámetros no miden la microestructura, son descriptores válidos que pueden contribuir a definir la característica del material.

Métodos

Los armazones en este estudio de caracterización se prepararon usando la fórmula y el método casi óptimos determinados basándose en las características físicas y los resultados de la evaluación de las interacciones biológicas *in vitro* e *in vivo*. En particular, los armazones tienen una estructura casi homogénea a través de la profundidad del material, según lo determinado por la inspección microscópica de las secciones del micrótopo. Estos armazones se fabricaron usando la formulación denominada SMOF1, SM-OF2 y DdSuc (en la que se usa un solo tensioactivo, *n*-dodecilsacarosa, en lugar de una mezcla). Los armazones en la última etapa del proceso de fabricación se lavaron 5 veces en agua desionizada, luego se prepararon para la liofilización para producir un producto seco, mediante uno de los siguientes métodos.

(i) Se remojaron los armazones (SM-OF1) durante 30 minutos en sorbitol 1 M, como un excipiente de liofilización, se drenaron y se congelaron a -80 °C durante al menos 2 horas, luego se liofilizaron en un criodesecador de mesa durante 16-24 h.

(ii) Los armazones se drenaron tras el último lavado en agua desionizada (H₂O desionizada) y se transfirieron a un liofilizador de escala piloto controlable. Se usó una secuencia de liofilización programada en la que las muestras se congelaron a -40 °C y se mantuvieron a esta temperatura durante el período de secado (36 h) a 100 mTor.

Rendimiento

Se calcula un parámetro de rendimiento por la proporción de la masa de fibrinógeno más alginato usada con respecto a la masa del producto.

Porosidad

Se midió la porosidad macroscópicamente registrando el peso y la dimensión lineal del producto, para obtener porosidad = volumen/masa.

Tamaño de poro

Se cortaron muestras de armazón del producto usando un bisturí, y se procesaron en un procesador histológico de tejidos Miles Scientific Tissue-Tek mediante la fijación en formaldehído al 10 %, y se incrustaron en cera de parafina. Las secciones se cortaron usando un microtopo ajustado a 4 µm. Las secciones se adhirieron sobre un portaobjetos, se depilaron y se tiñeron con una solución acuosa de eosina Y al 0,5 % p/v, seguido de deshidratación y montaje en DPX.

Las secciones se fotografiaron a 10 aumentos (microscopio Axioskop con lente achroplan x10/0,25, Zeiss, Watford

RU) y cámara digital DC200 con software IM50 Image Manager (Leica, Milton Keynes, RU). Se cosieron las imágenes electrónicamente usando el software Microsoft ICE. Las mediciones del diámetro de poro de estos montajes se midieron usando la imagen J (versión 1.43u/Wayne Rasband, Instituto Nacional de Salud, EE. UU.) calibrada usando una cuadrícula de fase.

5

Figura 21 - Resultados de porosidad y tamaño de poro.

Resultados

Formulación de armazón	ID del lote	Vol de Fbg al 2 % (ml)	Vol de AA al 2 % (ml)	Masa de reactivos (mg)	Masa de muestra (mg)	Rend. %	L (cm)	W (cm)	H (cm)	Vol (ml)	Porosidad vol/masa
SMOF-2	8FEB12_20	3	1,5	90	56,5	62,8	5	5,1	0,7	17,85	0,316
	21SEP11_10	3	1,5	90	54,6	60,67	4,9	4,9	0,6	14,406	0,264
	21SEP11_11	3	1,5	90	56,6	62,89	5	5	0,6	15	0,265
	21SEP11_12	3	1,5	90	50,7	56,33	5	5	0,7	17,5	0,345
	2MAR12_1	6	3	180	117,5	65,28	9	9	0,5	40,5	0,345
MEDIA						61,6					0,307
DT						3,36					0,0406
% DT						5,46 %					13,2 %
DdSuc	8FEB12_13	3	1,5	90	52,1	57,89	5	5	0,4	10	0,192
	8FEB12_14	3	1,5	90	55,1	61,22	4,8	4,9	0,4	9,408	0,171
	2MAR12_8	6	3	180	102,8	57,11	9,3	9,3	0,4	34,596	0,337
MEDIA						58,7					0,233
DT						2,18					0,0902
% DT						3,72 %					38,7 %

Dimensiones del rendimiento en masa del producto y porosidad para los armazones liofilizados sin excipientes de liofilización.

Formulación de armazón	ID del lote	Mediana del diámetro de poro (μm)	Intervalo intercuartílico (μm)
SM-OF1	2JUN11_3	53,1	32,3-93,0
	20JUN11_1	123,2	72,1-197,2
	21JUN11_1	33,8	22,3-84,4
	Media	70	42,2-124,9
SM-OF2	21SEP11_10	116,3	72,8-203,5
	21SEP11_11	75,0	30,1-127,2
	21SEP11_12	47,8	29,1-87,9
	2MAR12_1	154,7	77,7-208,9
	FEB2013	65,9	36,9-125,9
	Media	75,2	41,3-134,8
DdSuc	8FEB12_13	144,8	94,2-214,8
	15FEB12_7	69,3	41,6-125,5
	2MAR12_8	58,2	34,6-117,9
	Media	90,8	56,8-152,7

5 Datos del tamaño de poro del producto para armazones.

Discusión

10 En las muestras incluidas en el presente estudio, el rendimiento fue relativamente constante y los valores de porosidad variaron con SD al 13 % para el conjunto de SMOF2 y al 39 % para el conjunto de DdSuc. El parámetro de medición menos exacto para derivar la porosidad es la altura de la muestra, y esta variación se refleja en la variación del tamaño de poro.

15 Muchos de los estudios de investigación realizados en armazones durante el desarrollo de las formulaciones de armazón usaron sorbitol como excipiente liofilizado, para evitar la contracción y el agrietamiento de los armazones en las condiciones de secado obtenidas con un liofilizador de mesa. Este procedimiento significaba que los datos de rendimiento del proceso y de porosidad no se podían obtener directamente. Sin embargo, el uso de un liofilizador a escala piloto controlable permitió la producción del producto en condiciones que evitaban la contracción y el agrietamiento del producto sin el uso de un excipiente como el sorbitol.

20 Una característica interesante de los datos de tamaño de poro cuantitativos es que la variación se produce en el intervalo y la distribución de los tamaños de poro, así como en los valores medios y de la mediana. La variación entre las muestras individuales es mayor que las diferencias entre las formulaciones (SMOF1, SMOF2 o Ddsuc). La fuente de la variación dentro y entre los lotes de fabricación no ha sido determinada. Una explicación es que el intervalo de tamaños de poro surge de dos procesos con efectos opuestos: (1) La energía de mezcla genera huecos o burbujas, rompiendo grandes huecos en huecos más pequeños. (2) La coalescencia de pequeños huecos o burbujas en el coágulo inicial, en huecos más grandes con mayor estabilidad. Esto podría ser por difusión, gravedad, velocidad de coagulación y el efecto deshidratante del reactivo de reticulación. Podrían intervenir factores adicionales, variaciones en la mezcla, y en particular, efectos de borde.

30 También existe un reto teórico en la medición de una estructura intrínsecamente desordenada. Aunque el diámetro de poro microscópico es quizás un atractivo parámetro teórico, debe obtenerse midiendo el diámetro más ancho a través de un espacio hueco interno. Sin embargo, la definición de poro se vuelve complicada si el hueco en un material es desordenado o complejo y tortuoso, como en estos armazones basados en fibrina. La interconectividad de los poros incluso en una estructura porosa teórica geoméricamente regular se vuelve difícil de medir.

También se reconoce que la estructura fina del armazón a base de fibrina es un determinante biológico importante, equivalente al nivel de micro/nanoescala de la porosidad del material.

40 Por lo tanto, la invención proporciona una composición de matriz extracelular en la que el fibrinógeno reticulado está esencialmente libre de microagregados densos, o placas, de proteína precipitada.

La invención también proporciona una composición de matriz extracelular en la que la distribución de tamaños de poro en el agente de fibrina reticulada está en el siguiente intervalo:

- (i) intervalo de cuartil inferior = de 20 a 75 micrómetros;
- (ii) intervalo mediano = de 30 a 125 micrómetros;
- (iii) intervalo de cuartil superior = de 50 a 200 micrómetros.

La invención también proporciona una composición de matriz extracelular en la que la porosidad global del fibrinógeno reticulado está en el intervalo de 0,08 a 0,4 ml/mg de producto liofilizado.

La invención también proporciona una composición de matriz extracelular en la que tanto la distribución de tamaños de poro en el fibrinógeno reticulado como la porosidad global son como se han indicado anteriormente.

COMPARACIÓN DE SMART MATRIX CON MATRIDERM

Sumario

Los amazones celulares pueden desempeñar un papel significativo en la reconstrucción dérmica para mejorar la reconstrucción de la piel, reducir la velocidad de complicaciones, acelerar la recuperación y prevenir la hipertrofia de la cicatriz.

Un problema principal de los amazones de biomateriales comerciales actuales para la reconstrucción dérmica es que su velocidad de integración y vascularización es relativamente lenta.

Smart Matrix tiene como objetivo aumentar el crecimiento de los capilares sanguíneos en el armazón, acelerar la velocidad de integración y potenciar una respuesta de curación regenerativa. Los beneficios generales serán reducir las complicaciones y el tiempo de curación de la herida.

Matriderm es un biomaterial a base de colágeno, e incorpora elastina, que no está estabilizada por enlaces cruzados (a diferencia de Integra). Los presentes inventores han encontrado que Matriderm se reabsorbe en gran medida durante la primera semana de aplicación a una herida. Se reabsorbe rápidamente (aunque, en algunas heridas experimentales, los presentes inventores han observado que se pueden retener las fibras de colágeno más gruesas). Esto parece correlacionarse con la integración satisfactoria de injertos en una sola etapa de injerto de piel de espesor parcial. Como tal, su función parece describirse mejor como un apósito biológico para heridas más que como un armazón tisular.

Los métodos experimentales actualmente disponibles para evaluar los materiales para la cicatrización tienen limitaciones importantes. La cicatrización es una respuesta a largo plazo, que es una respuesta particular de curación en los seres humanos, distinta de casi todas las especies animales. En la actualidad, no hay modelos experimentales fácilmente disponibles que pronostiquen si un biomaterial causará cicatrización en sujetos humanos.

Los presentes inventores han encontrado que las respuestas de integración a materiales comerciales actuales en un modelo de herida porcina son similares a las encontradas clínicamente en sujetos humanos, y por lo tanto, son ampliamente predicativas de las primeras fases. Esto ha permitido una comparación y diferenciación firme entre Smart Matrix e Integra. Los presentes inventores tienen pruebas importantes de que Smart Matrix no causa una respuesta de curación a largo plazo de tipo cicatricial, en comparaciones paralelas directas con estos materiales comerciales actuales.

La función de Smart Matrix es distinta tanto de la de Integra como de la de Matriderm. Sin embargo, en el caso de Matriderm, que se reabsorbe rápidamente, no ha sido posible distinguir las diferencias en el éxito de una reconstrucción cutánea de una sola etapa usando superposición de injertos cutáneos de espesor parcial en Matriderm o Smart Matrix, en un modelo de herida porcina sana. Las diferencias en el proceso histológico de la reorganización del tejido son evidentes en una comparación directa de los dos materiales.

La Fig. 22A muestra el resultado de un injerto de piel de espesor parcial superpuesto sobre Matriderm o Smart Matrix, tras tres semanas. Las diferencias visuales en la densidad de las células (fibroblastos) y los capilares sanguíneos son evidentes. La figura muestra el resultado histológico de reconstrucciones en una sola etapa con Smart Matrix y Matriderm y superposición STSG en el día 21 (dos heridas paralelas en el mismo animal). Los paneles superiores muestran la superficie de contacto de STSG con la nueva dermis (las líneas discontinuas muestran la base aproximada del STSG). Los paneles inferiores muestran el tejido dérmico a mayor aumento (las flechas muestran los capilares sanguíneos formados en la nueva dermis).

La Fig. 22B muestra que la función del armazón de Smart Matrix todavía está presente en la semana 3, aunque gran parte de la estructura se ha reabsorbido, el armazón permanece disperso como un marco residual dentro del nuevo tejido dérmico que ha crecido a través de él. El armazón Smart Matrix está completamente infiltrado con fibroblastos y capilares sanguíneos. La histología muestra la reabsorción de la matriz en el día 21. Las flechas pequeñas

(negras) muestran ejemplos de zonas del armazón; las flechas grandes (rojas) muestran la formación de capilares sanguíneos.

La Fig. 22C muestra diferencias en el patrón de deposición del colágeno, con una mayor densidad de colágeno en las heridas de Smart Matrix que en las heridas de Matriderm. El significado funcional de esto no ha sido determinado aún. Muestra el resultado histológico de las reconstrucciones en una sola etapa con Smart Matrix y Matriderm y superposición de STSG, en los días 14 y 21 (dos heridas paralelas en el mismo animal). La tinción (roja) marca el colágeno fibrilar, ambos preexistentes dentro del injerto de piel y recién depositados dentro de la dermis en regeneración. Las líneas discontinuas muestran la base aproximada del STSG.

PROPIEDADES MECÁNICAS DE SMART MATRIX:

Uno de los desafíos actuales en la fabricación de armazones a base de fibrina es la fabricación de arquitecturas homogéneas. Aunque es mecánicamente débil y estructuralmente complejo, la caracterización de sus propiedades mecánicas puede facilitar su fabricación y comprensión de sus efectos sobre el comportamiento celular. Los presentes inventores han evaluado las propiedades mecánicas de los armazones a base de fibrina/alginato (Smart Matrix™) mediante la incorporación de cantidades variables de un tensioactivo en los armazones.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se fabricaron armazones Smart Matrix usando variaciones de las proporciones de los componentes que incluyen la mezcla de tensioactivos con el fin de crear una serie de 10 armazones, con variación de la porosidad.

El material de colágeno/elastina Matriderm se usó como material de referencia.

SEM: Se lavaron las muestras (0,5 x 1 cm), se liofilizaron y se recubrieron con carbono (Belzer) para la caracterización morfológica usando SEM continuo (sistema FEI Inspect-F).

Tensiometría:

a). Se prepararon muestras en forma de mancuerna convencional de 3 x 2 cm de cada muestra. Las muestras se cargaron en la máquina de tracción (INSTROM 5565) probada hasta el fallo a una velocidad de 3 mm/min. Los datos de máximo alargamiento y resistencia máxima a la tracción fueron analizados por ANOVA (software Prism).

b). Se prepararon muestras rectangulares de 3 x 2 cm de cada muestra. Las muestras se cargaron en el analizador de textura TA XTplus (Stable Microsystems, Godalming), con una celda de carga de 5 kg probada hasta el fallo a una velocidad de 1 mm/s. Las muestras se cortaron a un tamaño de 2 x 2,5 cm y el tamaño de ensayo se estableció en 2 x 2 cm. Todas las muestras fueron hidratadas usando agua destilada.

Reología: se midió la viscoelasticidad dinámica de Smart Matrix a la deformación en comparación con el material de referencia usando un programa de rampa de frecuencia de oscilación (reómetro Bohlin CVO).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los armazones en esta serie de mezclas de variación secuencial se vieron principalmente como una estructura de malla de fibra fina. La mayoría de las formulaciones dieron como resultado poros abiertos en la escala de micrómetros (<250). Sin embargo, la relación entre la formulación del armazón y la porosidad resultante no fue simple ni continua. Más bien, se apoyó una estructura porosa en un intervalo de variables de formulación, fuera de las cuales se obtuvo una estructura más densa.

El material Smart Matrix cuando se hidrata es blando, extremadamente flexible y extensible. También se comporta como un material elástico no clásico bajo análisis de tensión/deformación.

Las mediciones de tensiometría usando un INSTROM 5565 se encontraban en el extremo inferior del intervalo de sensibilidad, y los datos obtenidos mostraron niveles de ruido significativos. A una velocidad de 3 mm/min, para muestras convencionales con forma de mancuerna, la resistencia a la tracción final obtenida de la serie de armazones en la serie ($0,041 \pm 0,017$) era similar a Matriderm ($0,048 \pm 0,007$) (MPa, media $\pm$ ETM, $n = 3$). La Fig. 23a muestra el análisis de tres series diferentes de armazones Smart Matrix en comparación con Matriderm. El alargamiento máximo de la estructura óptima para la integración rápida en una herida de espesor completo *in vivo* alcanzó aproximadamente el 100 %, en comparación con aproximadamente el 30 % para Matriderm. La Figura 23a muestra las curvas de tensión-deformación para tres variantes de armazón optimizadas Smart Matrix 1 (SMOF n.º 1) con diferentes porosidades en comparación con Matriderm. El nivel de superficie usado en la formulación fue variado: SM 1-ninguno; SM5-medio; SM10-alto.

Las mediciones tensiométricas adicionales usando un analizador de textura Stable Microsystems tuvieron menos

ruido y cayeron dentro del intervalo de sensibilidad. Para muestras rectangulares a una velocidad de 1 mm/min, el módulo de Young aparente de Smart Matrix (SM-OF2) fue $2,75 \pm 1,01$ MPa (media $\pm$ ETM, $n = 12$). La resistencia a la tracción final de la serie de armazones ($1,61 \pm 0,54$) fue similar a la de Matriderm ($2,16 \pm 0,50$) y menor que Integra ($4,46 \pm 0,76$) (MPa, media $\pm$ ETM, SM $n = 12$, MD $n = 3$, INT $n = 3$). Curiosamente, las formas de alta porosidad de Smart Matrix mostraron mayores valores de alargamiento final. La Figura 23b muestra curvas de tensión-deformación para 4 lotes de armazones Smart Matrix (SM-OF n.º 2) con muestras por triplicado de cada armazón en comparación con Matriderm e Integra.

La caracterización inicial de las propiedades viscoelásticas de los armazones Smart Matrix y Matriderm corrobora la tensiometría, y muestra que el módulo elástico es el determinante dominante. Los valores del módulo complejo (Pa, media $\pm$ ETM, $n = 3$), a la frecuencia de 1 Hz fueron: $3004 \text{ Pa} \pm 327$, Smart Matrix (SM-OF n.º 1) (con porosidad óptima) y $5766 \text{ Pa} \pm 334$, Matriderm.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo establece importantes propiedades mecánicas de los armazones de tipo Smart Matrix, demostrando que es más suave que Matriderm. Esto puede contribuir al resultado beneficioso de curación de heridas establecido para Smart Matrix.

MEZCLA DE REACTIVOS - RESULTADOS DE ESTABILIDAD

Solubilidad del fibrinógeno

- NaCl > 20 mM para disolución de proteínas por adición de sal;
- NaCl > 133 mM con Pluronic (RT) al 0,5 %;
- NaCl > 150 mM con alginato 1:1;
- NaCl > 200 mM con Pluronic al 0,5 % + alginato 1:1;
- Temperatura > 20 °C;
- Sustitución de Na^+ con K^+ - formación de precipitado;
- Sustitución de Cl^- con SO_4^{2-} - formación de precipitado;
- Sustitución de Cl^- con Tris a pH 7,4 - formación de precipitado;
- Sustitución de HEPES (pKa 7,55) con Tris (pKa 8,06) - sin precipitado;
- alginato + glicerol 1:1, 20 % - $<$ Pluronic al 2 %; al 5 % - $<$ Pluronic al 1 %;
- alginato + sacarosa 1:1, 30 % - $<$ Pluronic al 2 %; al 15 % - $<$ Pluronic al 1 %;

RESULTADOS DE LA COAGULACIÓN

1. Fibrinógeno

- acelerado por: Ca^{2+} (máximo a 20 mM); Trombina (demasiado rápido $> \times 10$); Pluronic ($< 0,5$ %); Alginato (1:1).
- Inhibido por NaCl (NaCl óptimo aproximadamente 20-50 mM).
 - NaCl de 150 a 75 mM disminuye el tiempo de coagulación de 10 a 3 minutos;
 - La sustitución parcial de Cl^- por HEPES a 150 mM acelera la velocidad;
- - Si el precipitado está presente antes de la coagulación ($A_{425} > 0,1$), el gel resultante es subóptimo.

2. Coagulación de la mezcla de reactivos:

- Fibrinógeno + alginato 1:1 + Pluronic al 0,5 % da una velocidad satisfactoria (< 5 min) a NaCl 200 mM.

3. Sustituciones de iones/tampón: se sustituye HEPES con Tris-sin coagulación.

4. El glicerol y la sacarosa protegen contra el precipitado inducido por tensioactivo, pero inhiben la velocidad de coagulación. Se acepta glicerol al 5 %, con alginato 1:1 y Pluronic al 1 %. La sacarosa al 15 % puede no ser aceptable.

5. Los tensioactivos no iónicos alternativos a Pluronic (Triton X100 y Tween 20) provocan precipitados a concentraciones similares, sin beneficio evidente.

FORMULACIÓN - ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN

Estabilización del fibrinógeno:

- NaCl > 50 Mm;
- Glicerol > 5 %;

- Sacarosa, glucosa, sorbitol 2-20 %, >10 %;
- Trehalosa: antes de la adición de trombina: 10-11 %; tras la adición de trombina/alginate/tensioactivo: 4-7,5 % (aproximadamente 6,6 %);
- Octil-beta D-glucopiranosido > 0,5 %.

5

Precipitación del fibrinógeno:

- NaCl < 50 mM;
- Alginato > 0,5 %;
- Pluronic F68 > 0,2 %.

10

FORMULACIÓN - COAGULACIÓN

Aceleración de la coagulación

15

- NaCl < 50 mM;
- Alginato > 0,5 %;
- Pluronic F68 > 0,2 %;
- MES > HEPES.

20

Inhibición de la coagulación:

- NaCl > 75 mM;
- Glicerol > 5 %;
- Sacarosa, glucosa, sorbitol > 5 %;
- Trehalosa 4-7,5 %;
- Octil-beta-D-glucopiranosido > 0,5 %;
- Tris > HEPES.

25

FORMULACIÓN - ESTABILIDAD DE LA ESPUMA

Estabilización de la espuma:

- NaCl < 50 mM;
- Glicerol > 5 %;
- Trehalosa 4-7,5 %;
- Octil-beta-D-glucopiranosido.

35

Desestabilización de la espuma:

- NaCl > 50 mM;
- Alginato > 0,5 %;
- Pluronic F68 < 2 %.

40

Combinación de formación de espuma con fibrinógeno:

- Alginato > 0,5 % + tensioactivo > 2 %;
- Pluronic F68 > 0,2 %;
- MES > HEPES.

50

Inhibición de la coagulación

- NaCl > 75 mM;
- Glicerol > 5 %;
- Sacarosa, glucosa, sorbitol;
- Trehalosa 4-7,5 %;
- Octil-beta D-glucopiranosido;
- Tris > HEPES.

55

CONCLUSIONES DE LA ESTABILIDAD/COAGULACIÓN

60

- La estabilidad de la mezcla de reactivos es fundamental.
- Se han identificado algunos parámetros negativos para la estabilidad. El aumento de la viscosidad a través de los

agentes puentes de H (glicerol, sacarosa) aumenta la estabilidad frente al tensioactivo (bueno), pero inhibe la coagulación (malo).

- El control de la estabilidad se puede obtener a través de NaCl, sal tampón, temperatura, tensioactivos (polioles como glicerol, sacarosa, trehalosa) y componentes de alginato.
- Se usa tensioactivo de azúcar, o varios tensioactivos tales como octil-gluco-piranósido. La formulación optimizada usa otros factores tales como el agente estabilizante (trehalosa).

CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

1. Ha sido posible crear una formulación consistente de material de fibrina-alginato usando una estrategia que combina la trehalosa como agente estabilizante, con tensioactivos a base de azúcar añadidos al tensioactivo plurónico.

2. El primer ejemplo de un tensioactivo de azúcar en combinación con un Pluronic (F127 o F68) fue OGP (SMOF-1). Esto produce una estructura del biomaterial con grandes poros abiertos, que es compatible con la potenciación de la curación, pero con algunos problemas histológicos (colapso del material y reacción inflamatoria posterior, avance celular y envolvimento en algunos casos). La interpretación de este comportamiento *in vivo* ha proporcionado criterios contra los que se puede mejorar la estructura del armazón.

3. La variación en la estructura resultante se ve usando diferentes tipos de tensioactivo de acil-azúcar. Esta variación permite la selección de un tensioactivo óptimo. La evaluación de los tensioactivos mostró:

(i) La serie de los SPAN fueron principalmente ineficaces debido a la baja solubilidad acuosa. Solo fue posible obtener soluciones disolviendo los SPAN en la mezcla de Pluronic F68/OGP, con diferentes grados de calor. Las estructuras del armazón obtenidas no mejoraron en SMOF n.º 1, aunque se encontró una mayor formación de espuma. Los resultados también fueron inconsistentes, posiblemente por la dificultad de solubilidad.

(ii) La variación de la longitud de la cadena de la serie de los glucopiranósidos (C6, C8, C10, C12) dio variaciones, lo que permitió cierta selectividad. Los armazones C6 (HGP) tenían baja formación de espuma, con mala estructura histológica. C10, DGP dio una buena espuma y una estructura ligeramente mejor que SMOF n.º 1. La solubilidad de DdGP era limítrofe y requirió calentamiento para mantener la fase de solución. Dio menos espuma, pero una mejor estructura laminar, cuando se incorporó en una mezcla con DMP, ODM y F68.

(iii) El tioglucopiranósido, usado como tensioactivo bioquímico más estable que el OGP, mostró una estructura similar a SMOF n.º 1, pero no parece ser una ventaja.

(iv) La serie de los maltósidos ODM, DMP dieron una estabilidad de espuma mayor que los análogos de glucosilo. El DDMP no parece ser tan eficaz como DMP. Otra observación práctica es la estabilidad de la estructura de espuma en la etapa de adición de agente de reticulación. Se encontró que ODM y DMP reducen el grado de colapso de la espuma en esta etapa. La serie de acil-sacarosa, [nDSuc y DdSuc], fue similarmente útil. DMP y DdSuc como tensioactivos individuales, sustituidos en la formulación de SMOF n.º 2, dieron estructuras resultantes similares.

(v) La combinación de DMP con DdGP y ODM proporciona el mejor volumen de espuma y la estabilidad de la estructura en la reticulación. Esto permitió la formulación de SMOF n.º 2.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de preparación de una composición de matriz extracelular que comprende:

- (a) mezclar una solución acuosa de fibrinógeno con un agente de coagulación y un agente formador de volumen, y un agente formador de espuma;
- (b) hacer que la mezcla forme espuma y se coagule;
- (c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) con un agente de reticulación; y
- (d) lavar la composición reticulada obtenida en la etapa (c) para eliminar el agente de reticulación;

donde el agente formador de espuma consiste en o comprende uno o más agente/s tensioactivo/s de la clase de tensioactivos de azúcar.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde:

- i) el fibrinógeno está presente a un nivel de pureza superior a uno de los valores del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %;
- ii) la solución acuosa de fibrinógeno está esencialmente exenta de otra proteína;
- iii) el fibrinógeno está presente como formas truncadas de fibrinógeno tales como fibrina A, fibrina B, fibrina C, fibrina D, fibrina X y fibrina Y, preferentemente donde la forma truncada del fibrinógeno es fibrina E; o
- iv) el fibrinógeno está presente como una solución acuosa tamponada a un pH de entre 4 y 10, donde preferentemente el tampón es solución salina tamponada con MES/NaCl o HEPES.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la mezcla para la etapa de mezcla (a) comprende además un azúcar como estabilizante proteico, donde el azúcar es un poliol o hidrato de carbono pequeño, tal como glicerol, sorbitol, sacarosa o trehalosa, opcionalmente, donde el azúcar es trehalosa, preferentemente en una cantidad del 10-11 % en peso con respecto al fibrinógeno, y preferentemente en una cantidad del 4-7,5 % en peso en la mezcla de la etapa (b).

4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente coagulante comprende un agente coagulante enzimático o no enzimático, preferentemente donde el agente coagulante es trombina, tal como trombina humana.

5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente formador de espuma consiste en o comprende uno o más agentes tensioactivos de la clase de tensioactivos de acil-azúcar, opcionalmente, donde el agente formador de espuma es de la clase de tensioactivos de acil-azúcar que tienen una longitud de la cadena de acilo de entre C₈ y C₁₂.

6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, donde el agente formador de espuma comprende o consiste en al menos dos, preferentemente tres, tensioactivos de azúcar, opcionalmente, donde los tensioactivos de azúcar son tensioactivos de acil-azúcar.

7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde los tensioactivos de acil-azúcar se seleccionan de la clase de tensioactivos de piranósido (en particular, glucopiranósido), maltósido y acil-sacarosa, opcionalmente, donde los tensioactivos de acil-azúcar se seleccionan del grupo que consiste en OGP, ODM, DGP y DdGP, TGP, HGP, DMP, decil-sacarosa (nDS), dodecil-sacarosa (nDdS), y opcionalmente, donde los tensioactivos de acil-azúcar comprenden o consisten en DMP, DdGP y ODM.

8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la mezcla para la etapa de mezcla (a) comprende además un detergente no iónico, un tensioactivo gelificante termosensible, un poloxámero (tal como Pluronic[®], en particular, F68 o F127) o una poloxamina (tal como Tetronic[®] 1307), un fosfolípido de tipo difosfatidil-glicerol o una mezcla de una fase inmiscible con la fase de solución acuosa de fibrinógeno; y/o donde la mezcla para la etapa de mezcla (a) comprende además un tensioactivo no iónico, tal como un tensioactivo Pluronic, preferentemente seleccionado de Pluronic F68 y F127.

9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1:

- i) donde el agente formador de volumen es un alginato, tal como alginato de sodio o un alginato derivatizado;
- ii) donde el agente formador de volumen se selecciona entre hidroxietilalmidón, etilcelulosa, goma de xantano y agarosa; o
- iii) donde el agente formador de volumen es o incluye un glicosaminoglicano (GAG, tal como condroitín-6-sulfato, condroitín-4-sulfato, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, quitina, quitosano, sulfato de dextrano o hialuronano).

10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1:

- i) donde el agente de reticulación se selecciona de: agentes de acoplamiento de carbodiimida tales como N-(3-

dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC); *N*-hidroxisuccinimida (NHS), agentes de acoplamiento de azida; agentes de reticulación de diisocianato tales como hexametilendiisocianato; agentes de reticulación de epóxido tales como epiclorhidrina, glicidiléteres y glicidilaminas; y agentes de reticulación de aldehído tales como formaldehído, glutaraldehído y glioxal; o

ii) donde el agente de reticulación comprende un agente de reticulación de aldehído tal como formaldehído, glutaraldehído o glioxal, opcionalmente, donde el agente de reticulación de aldehído es glutaraldehído u, opcionalmente, que comprende además la adición de un agente reductor o un agente reductor de la toxicidad, tal como borohidruro de sodio o lisina.

11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa de formación de espuma (b) se consigue mezclando con aireación, por ejemplo, batiendo o combinando.

12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, para preparar una composición de matriz extracelular que tiene una forma predeterminada, donde bien

(i) la mezcla de la etapa (a) se moldea en un molde de una forma predeterminada, se congela y, opcionalmente, se liofiliza antes de la etapa de incubación (c); o

(ii) el producto de la etapa (d) se produce en un molde de una forma predeterminada, y el producto se congela y, opcionalmente, se liofiliza.

13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación que además comprende la adición de un ion metálico divalente o multivalente tal como calcio (por ejemplo, cloruro de calcio), preferentemente para proporcionar una concentración de ion calcio en el intervalo de 1-5 mM, más preferentemente aproximadamente 2 mM.

14. Una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado o un derivado del mismo, que se puede obtener u o se obtiene mediante un proceso de acuerdo con la reivindicación 1.

15. Una composición de matriz extracelular de la reivindicación 14, u obtenida mediante el proceso de la reivindicación 1, para su uso en la curación de heridas o la regeneración de tejidos.

16. Un método de ingeniería de tejidos *in vitro*, que comprende: i) aplicar células endoteliales o fibroblastos, y un medio de cultivo, a la composición de la matriz extracelular de acuerdo con la reivindicación 14, en un recipiente de cultivo; o ii) aplicar células endoteliales o fibroblastos, y un medio de cultivo, a la composición de la matriz extracelular obtenida mediante el proceso de la reivindicación 1, en un recipiente de cultivo.

17. Una formulación para su uso en la fabricación de una composición de matriz extracelular, que comprende:

- fibrinógeno en una cantidad del 0,5 % al 10 % en peso;
- un agente estabilizante;
- un agente coagulante;
- un agente formador de volumen; y
- un agente formador de espuma;

donde el agente formador de espuma comprende o consiste en uno o más agentes tensioactivos de la clase de tensioactivos de azúcar, que comprende, opcionalmente, además un azúcar como estabilizante proteico, y opcionalmente, donde el azúcar es trehalosa, preferentemente, en una cantidad del 10 % u 11 % en peso.

18. Una composición de matriz extracelular de acuerdo con la reivindicación 14, donde el fibrinógeno reticulado está esencialmente exento de microagregados densos, o placas, de proteína precipitada.

19. Una composición de matriz extracelular de acuerdo con la reivindicación 14 o 18, donde la distribución de los tamaños de poro en el fibrinógeno reticulado está en el siguiente intervalo:

- (i) intervalo de cuartil inferior = de 20 a 75 micrómetros;
- (ii) intervalo mediano = de 30 a 125 micrómetros;
- (iii) intervalo de cuartil superior = de 50 a 200 micrómetros; y/u opcionalmente

donde la porosidad global del fibrinógeno reticulado está en el intervalo de 0,08 a 0,4 ml/mg de producto liofilizado.

20. Una composición de matriz extracelular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14, 18 o 19, donde el módulo elástico del fibrinógeno reticulado, cuando está hidratado, tiene un módulo de Young de 1-6 Mpa y una resistencia a la tracción final de 0,4-3 Mpa a una velocidad de tensión de 1 mm/s y un valor de Módulo Complejo de aproximadamente 3.000 Pa a una frecuencia de 1Hz.



Fig. 1

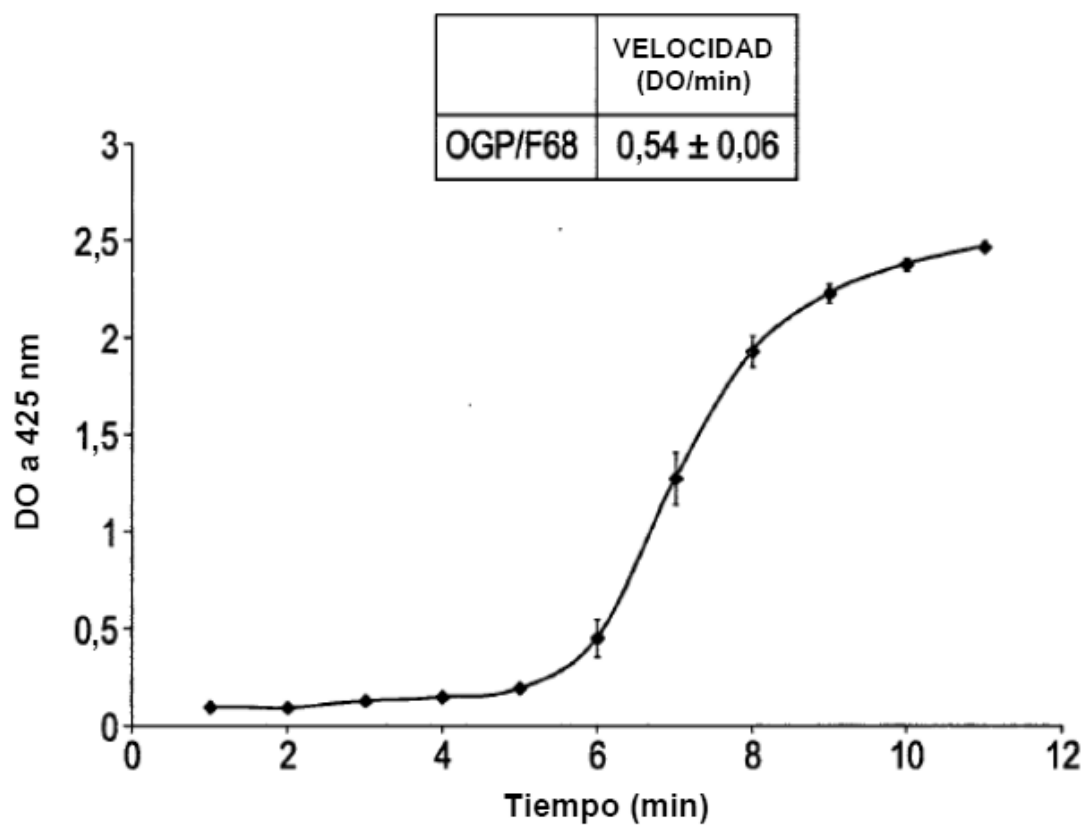


Fig. 2

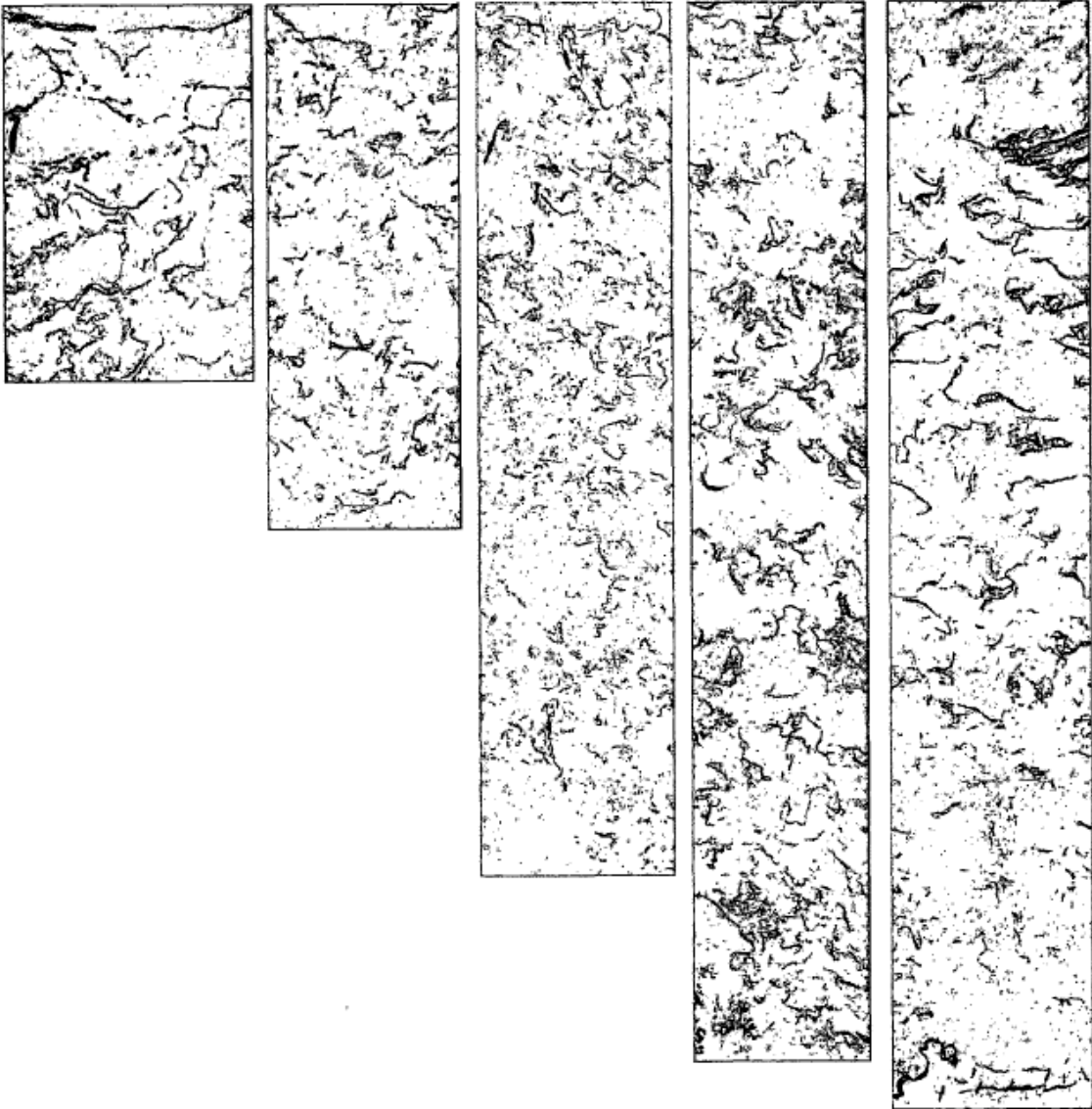


Fig. 3

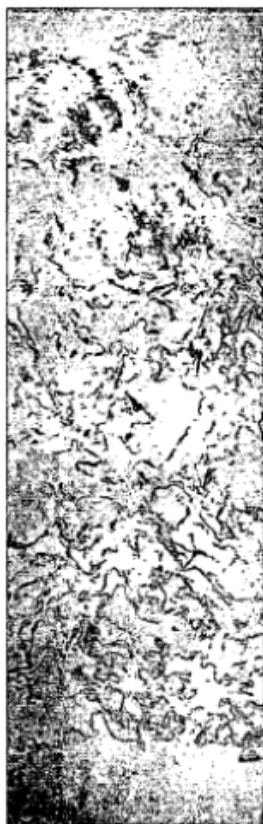


Fig. 4

	VELOCIDAD (DO/min) 10
ODM/F68	$0,60 \pm 0,062$

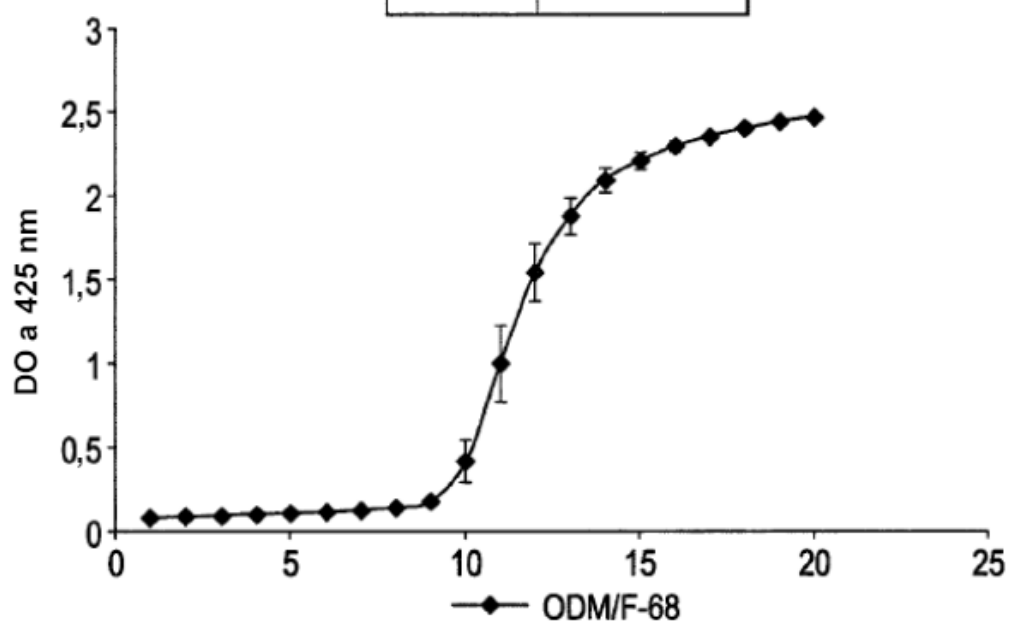


Fig. 5



Fig. 6

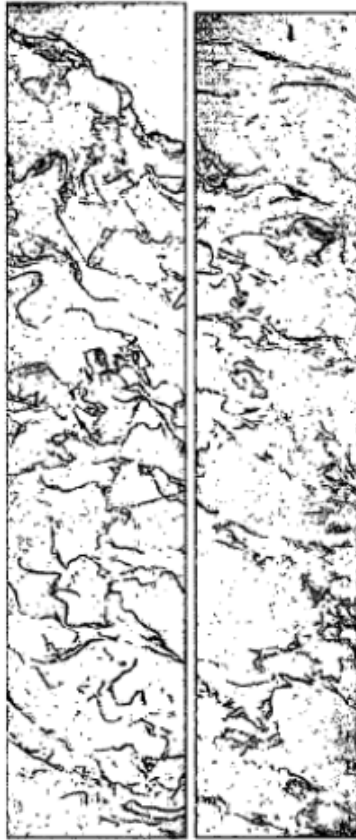


Fig. 7

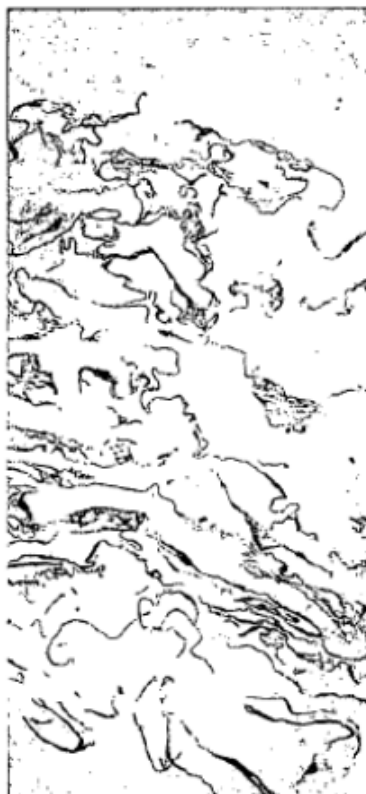


Fig. 8



Fig. 9

	VELOCIDAD (DO/min)
TGP/F68	$1,21 \pm 0,25$

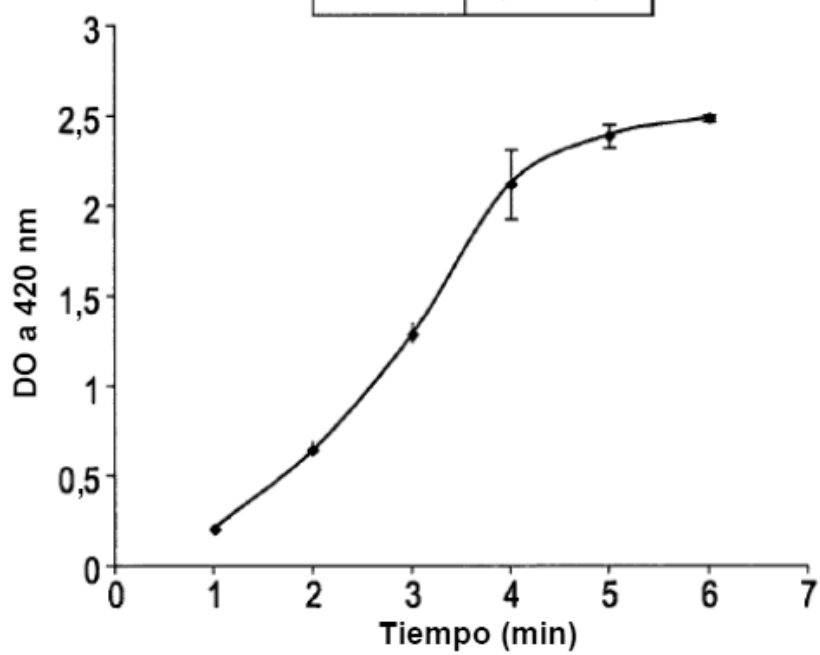


Fig. 10

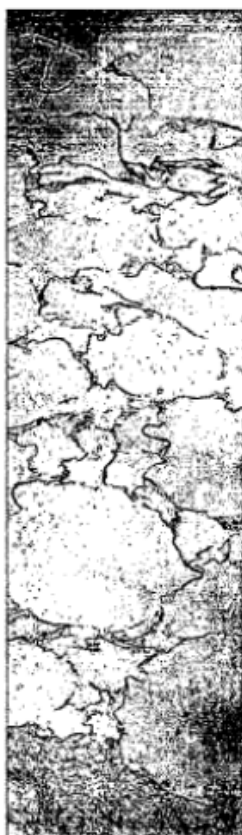


Fig. 11

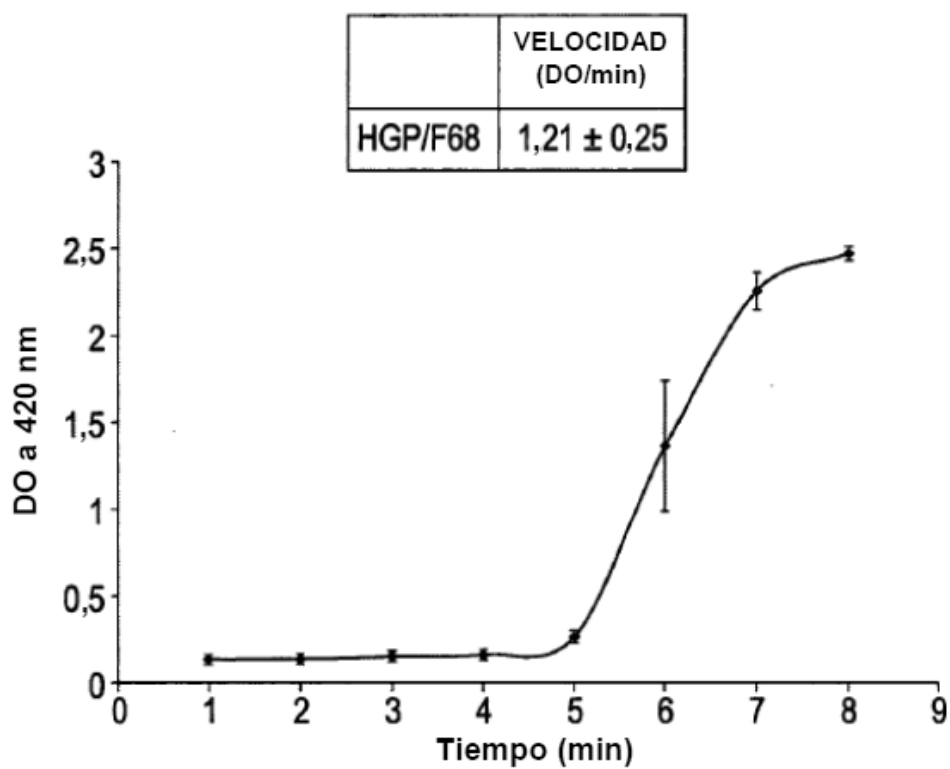


Fig. 12

	VELOCIDAD (DO/min)
DMP/ODM	$0,62 \pm 0,153$

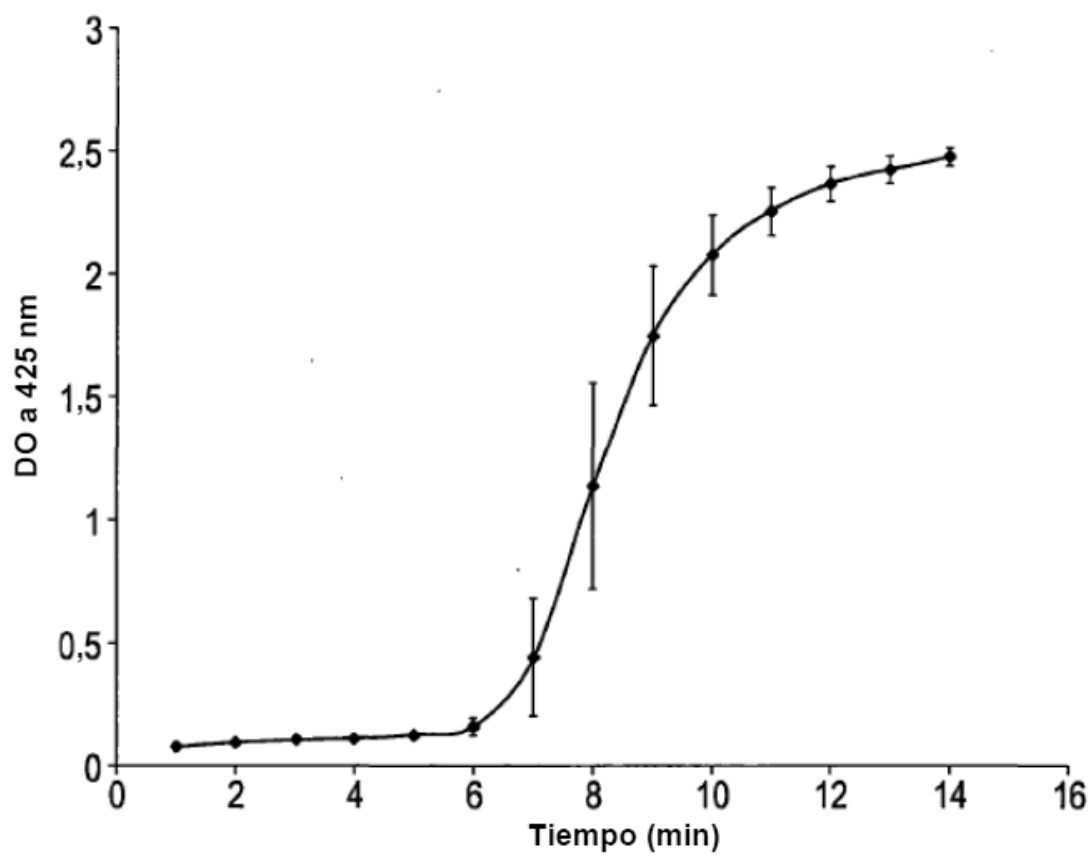


Fig. 13



Fig. 14

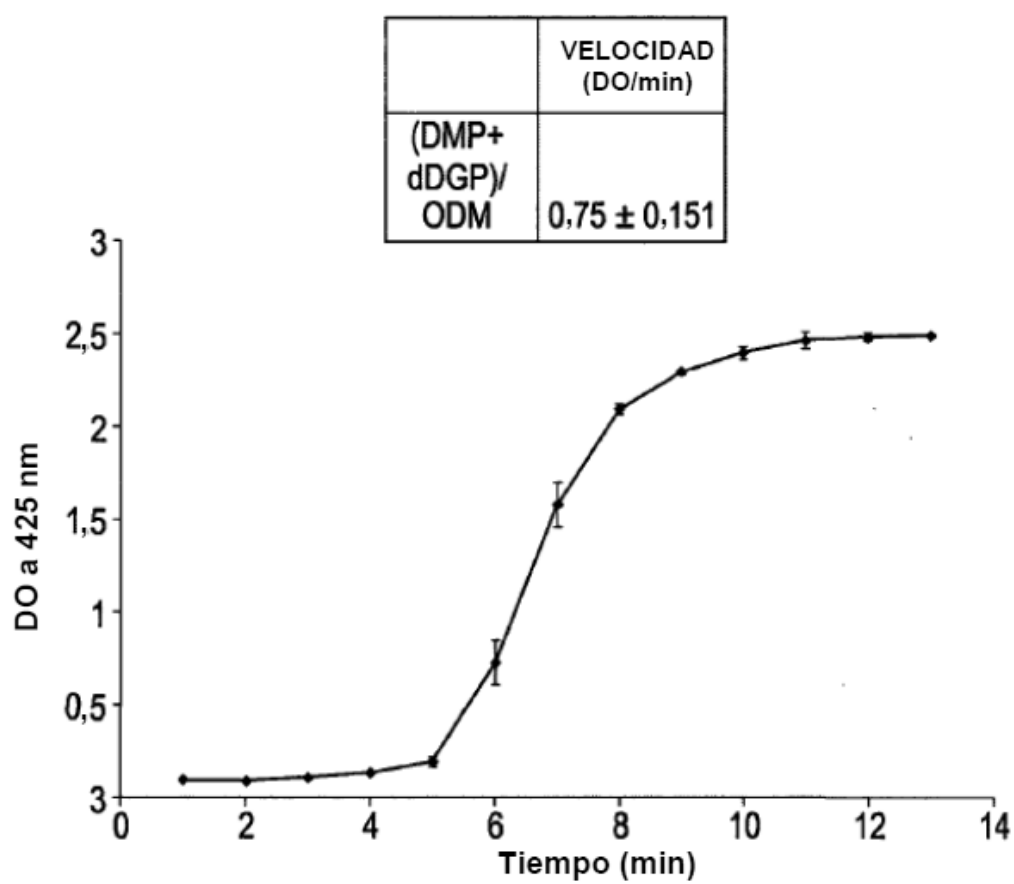


Fig. 15

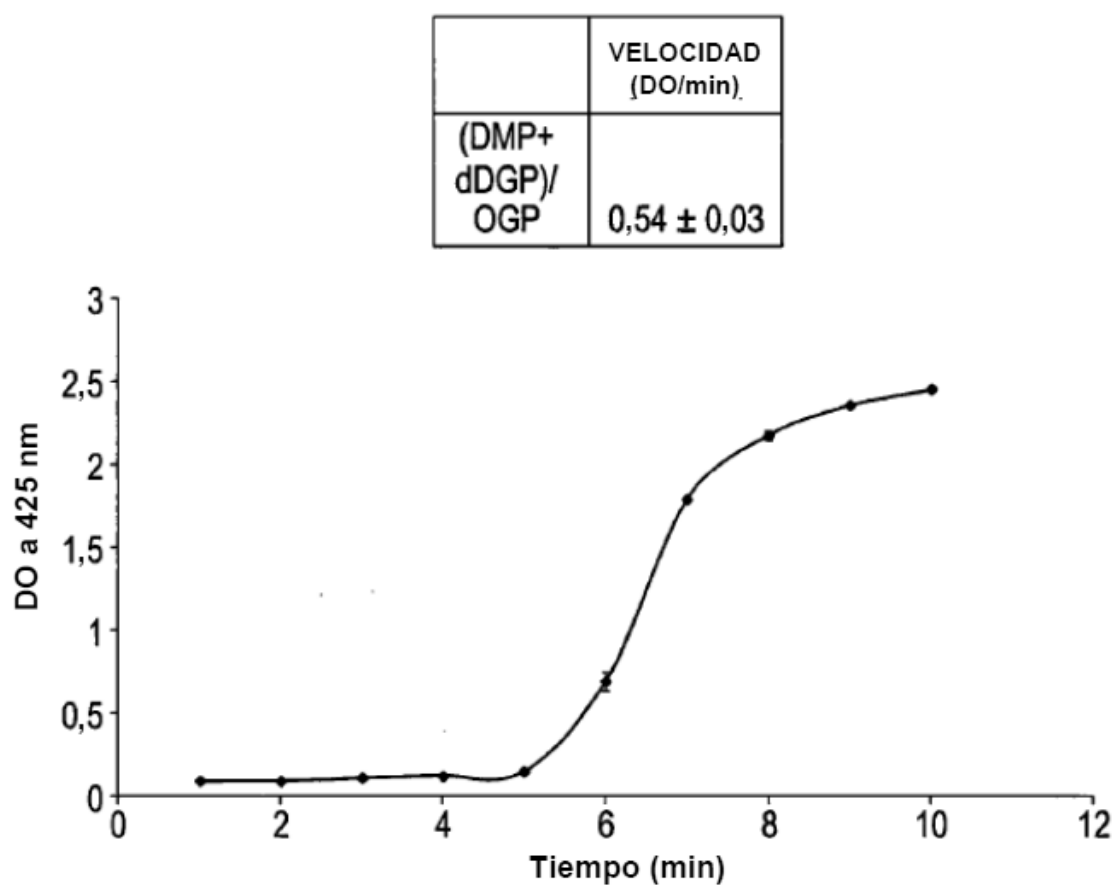


Fig. 16

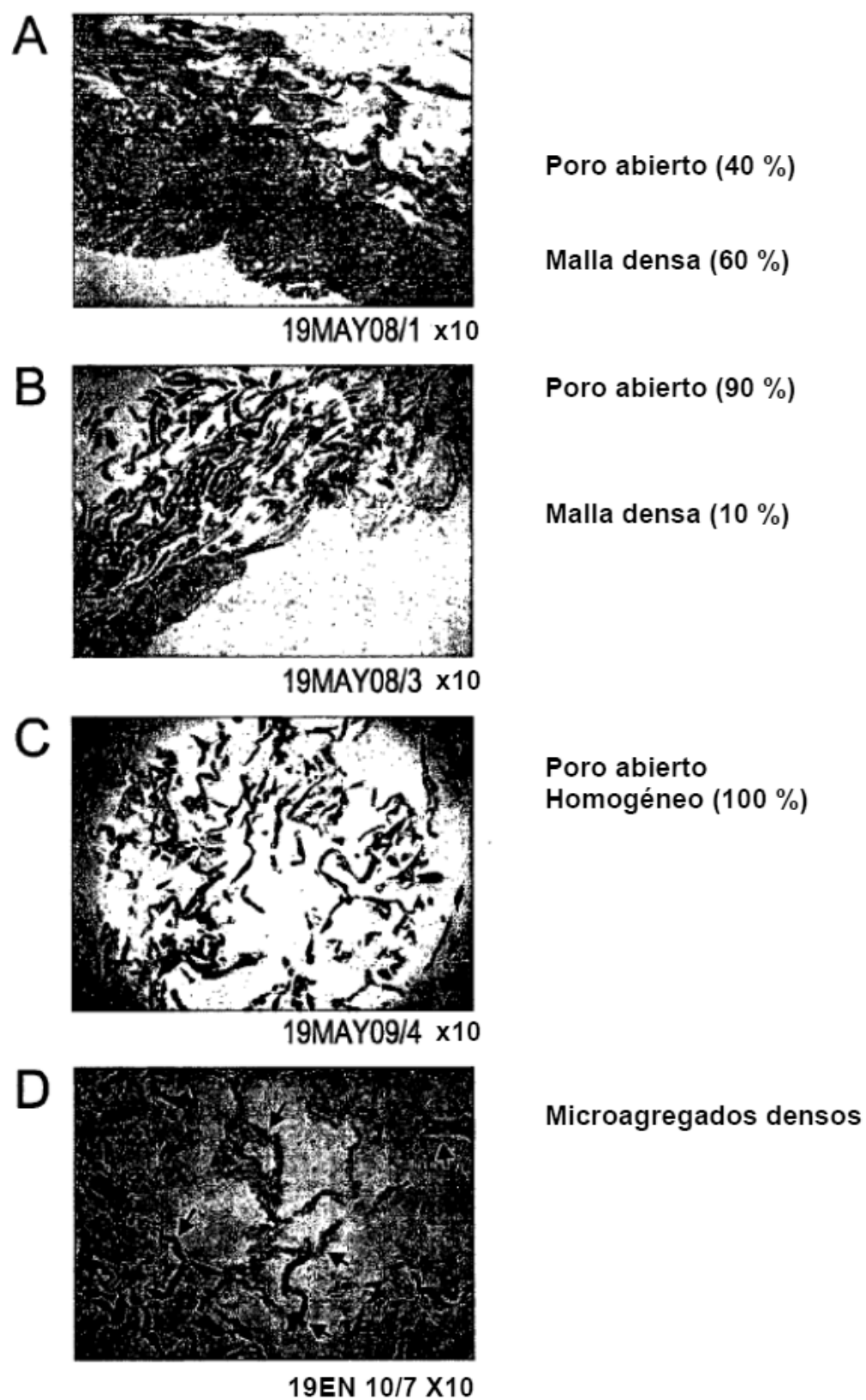


Fig. 17

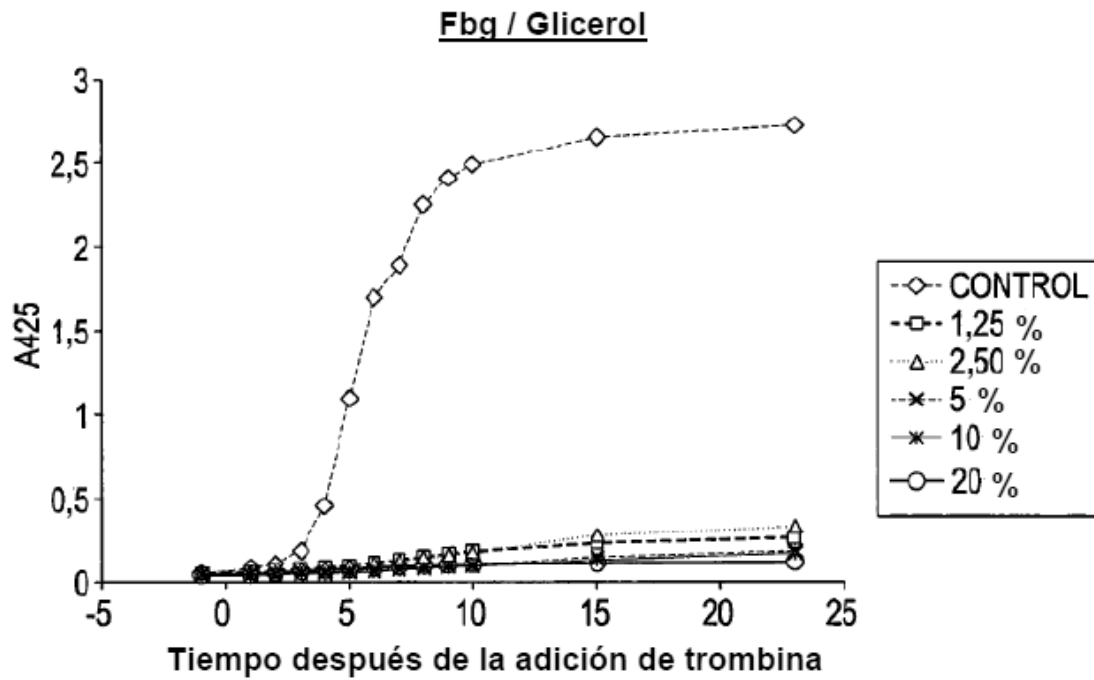


Fig. 18A

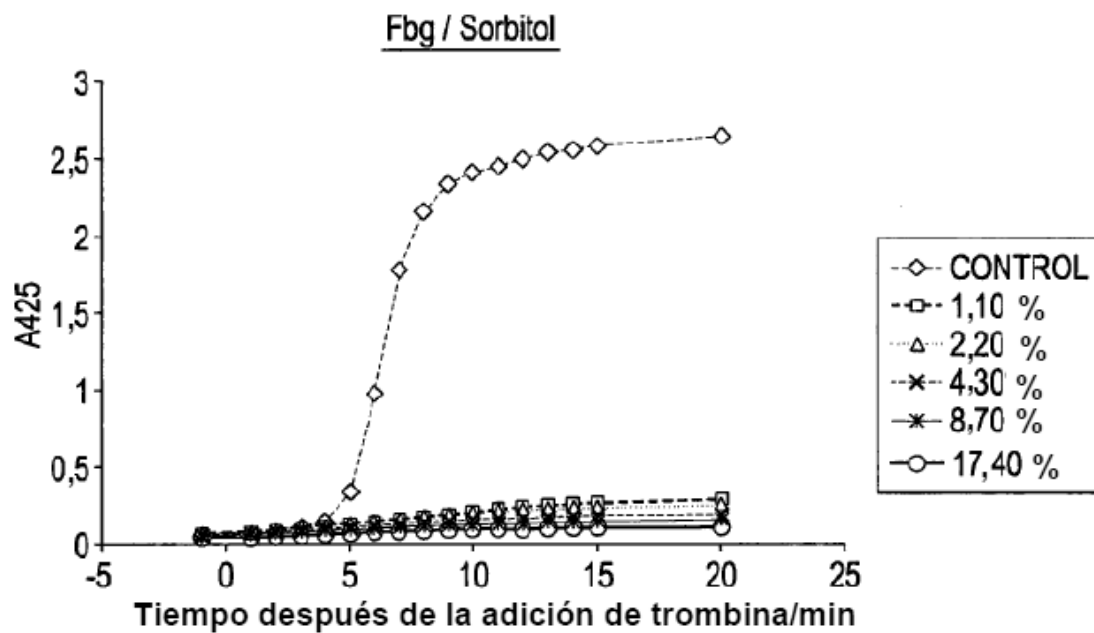


Fig. 18B

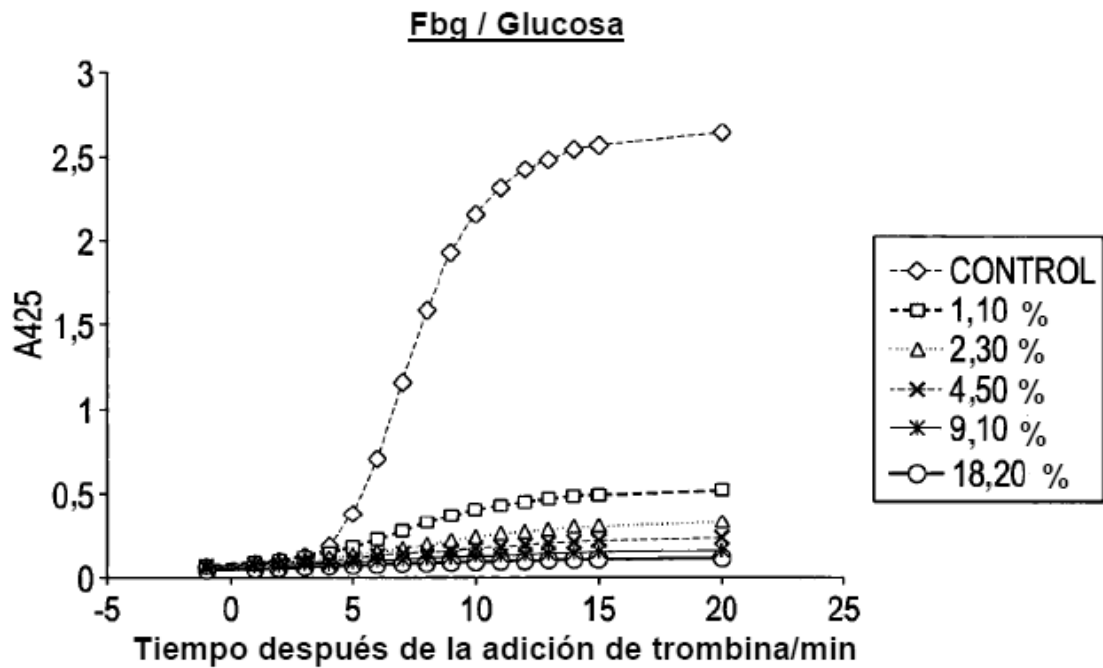


Fig. 18C

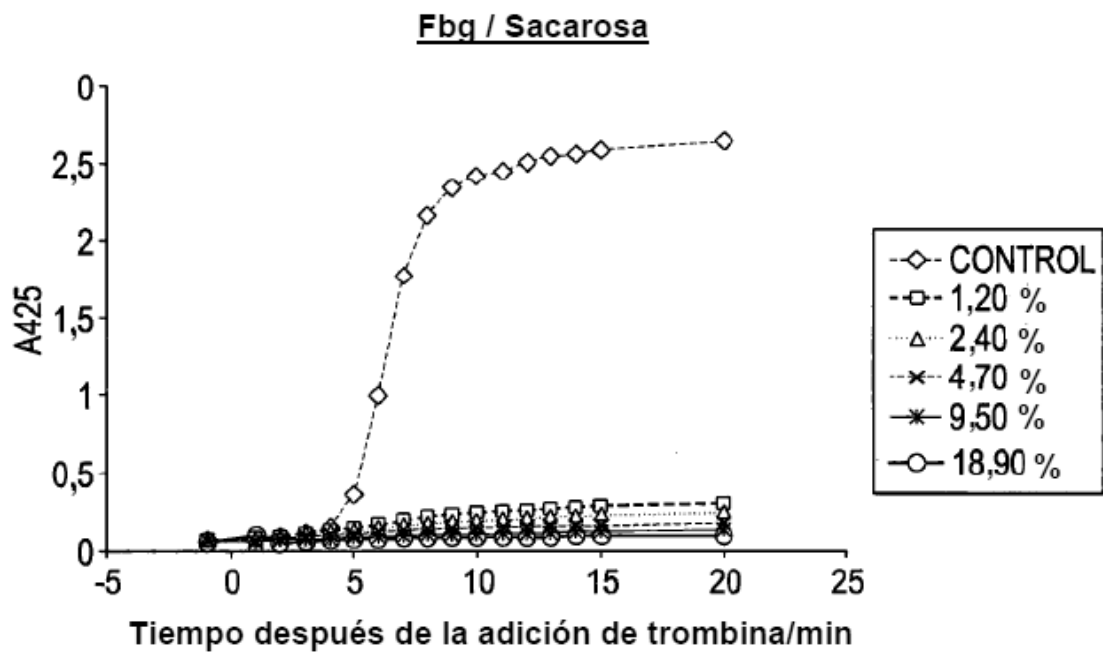


Fig. 18D

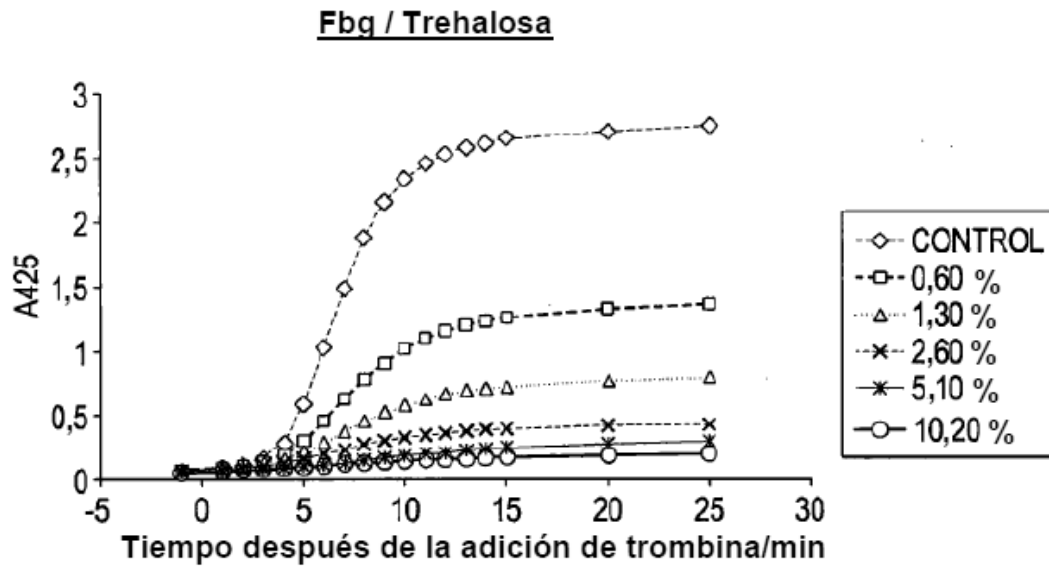


Fig. 18E

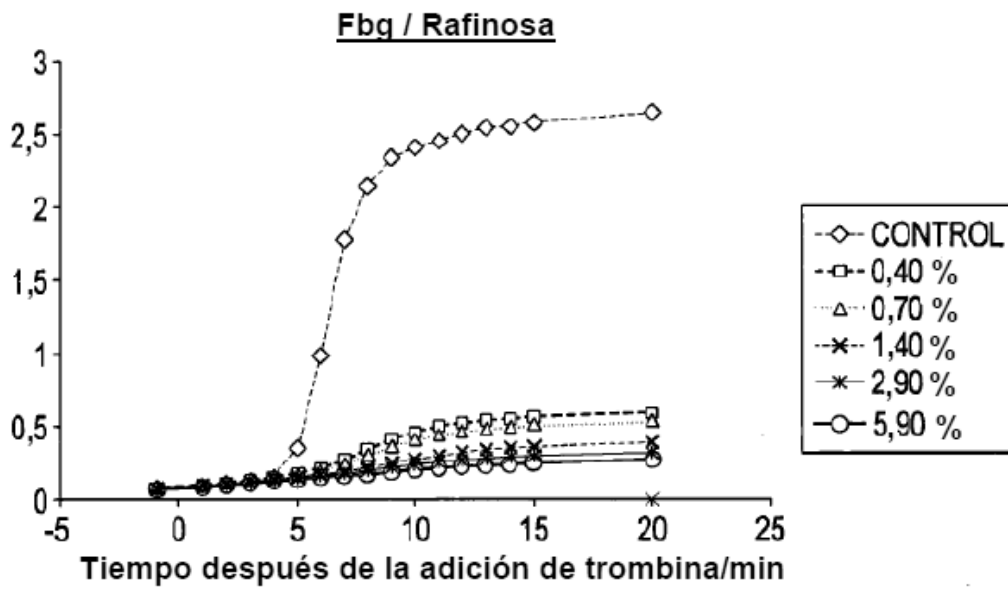


Fig. 18F

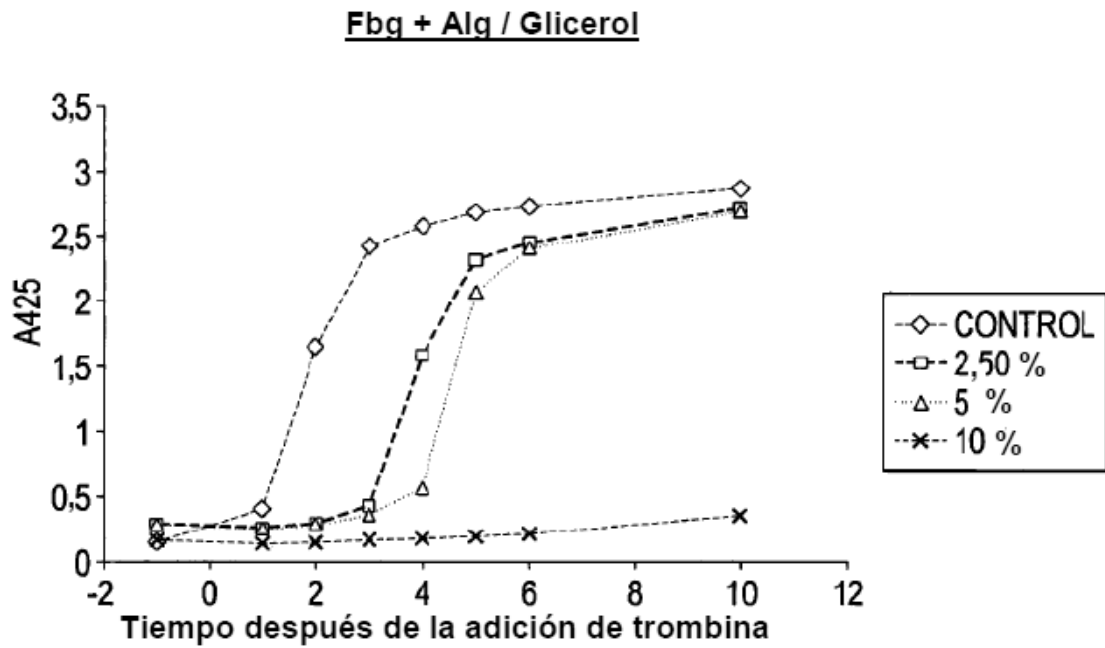


Fig. 19A

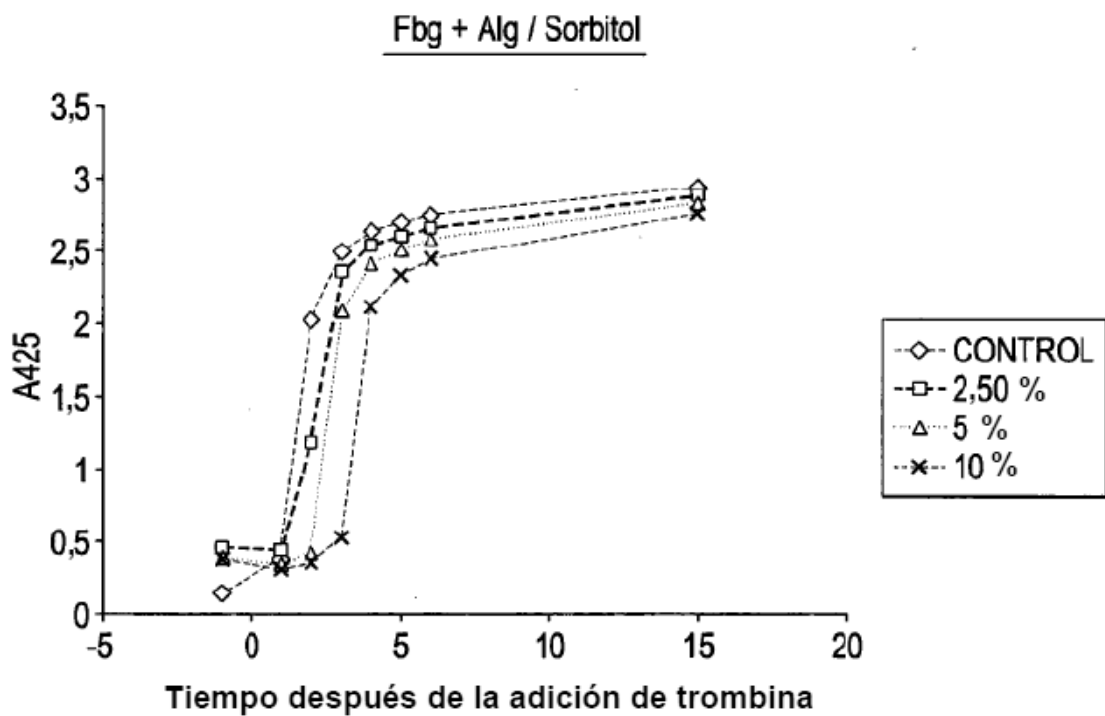


Fig. 19B

Fbg + Alg / Glucosa

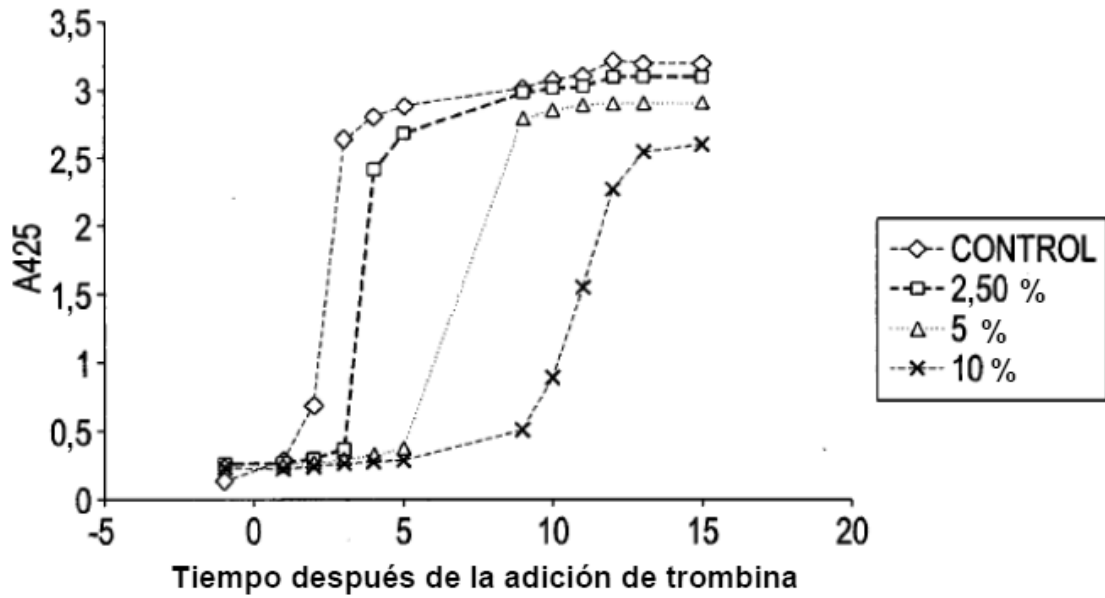


Fig. 19C

Fbg + Alg / Sacarosa

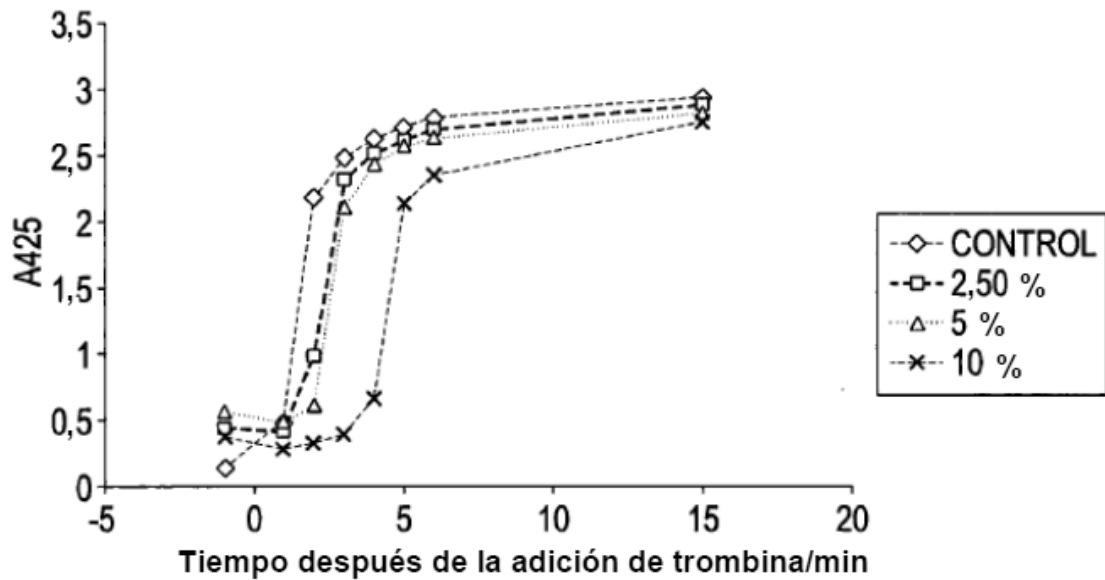


Fig. 19D

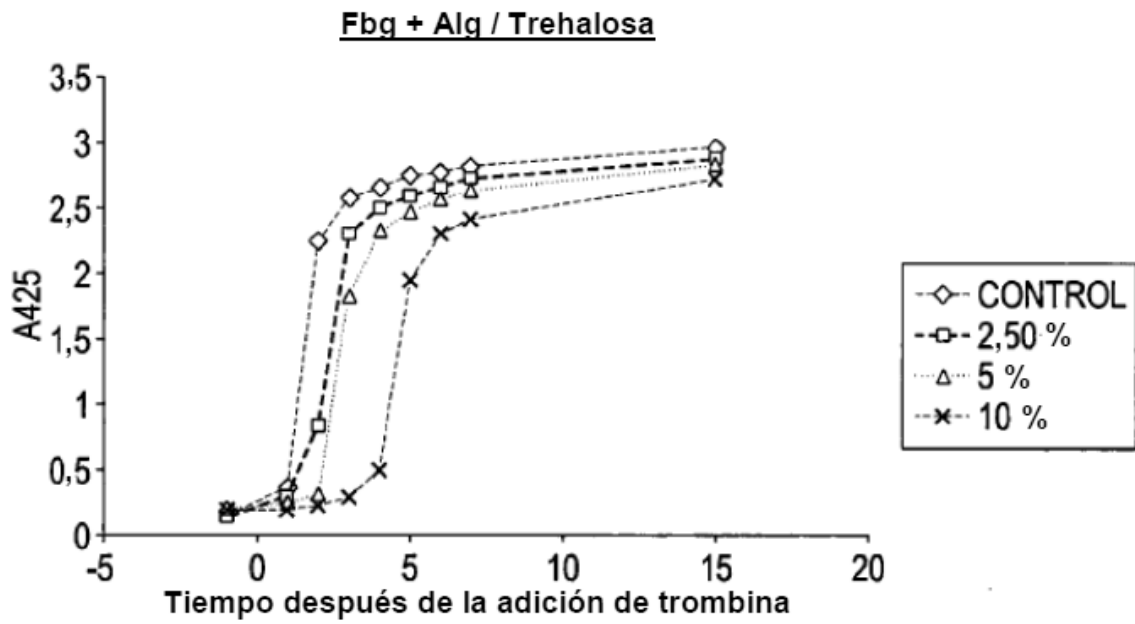


Fig. 19E

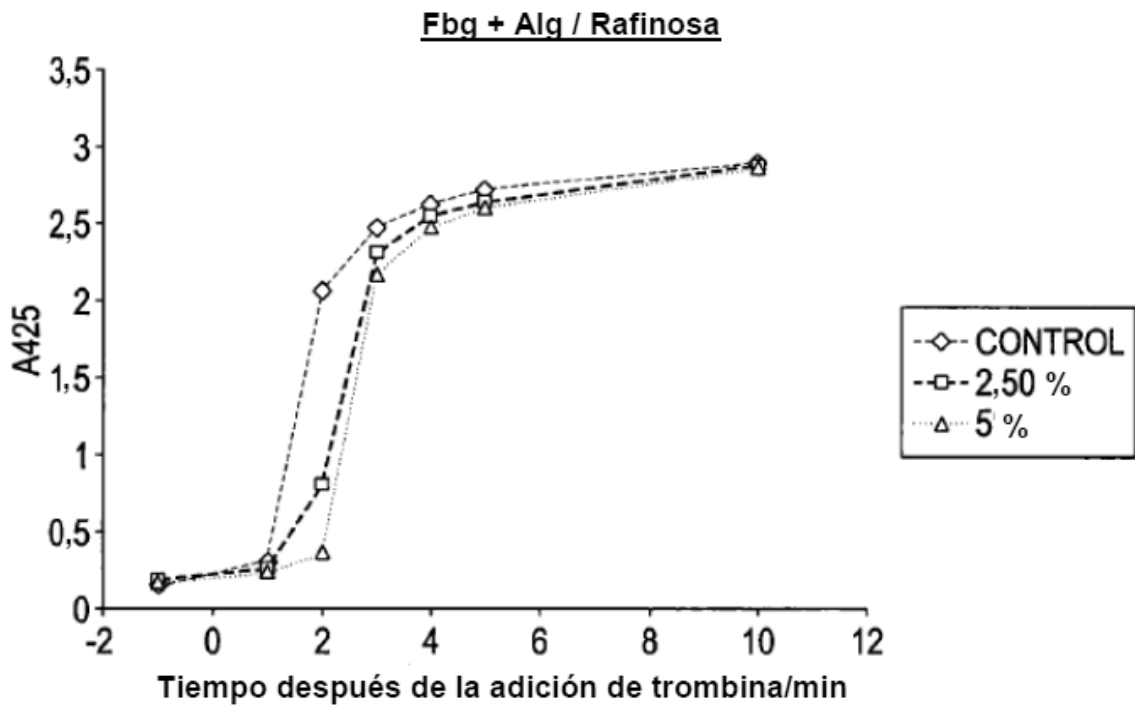


Fig. 19F

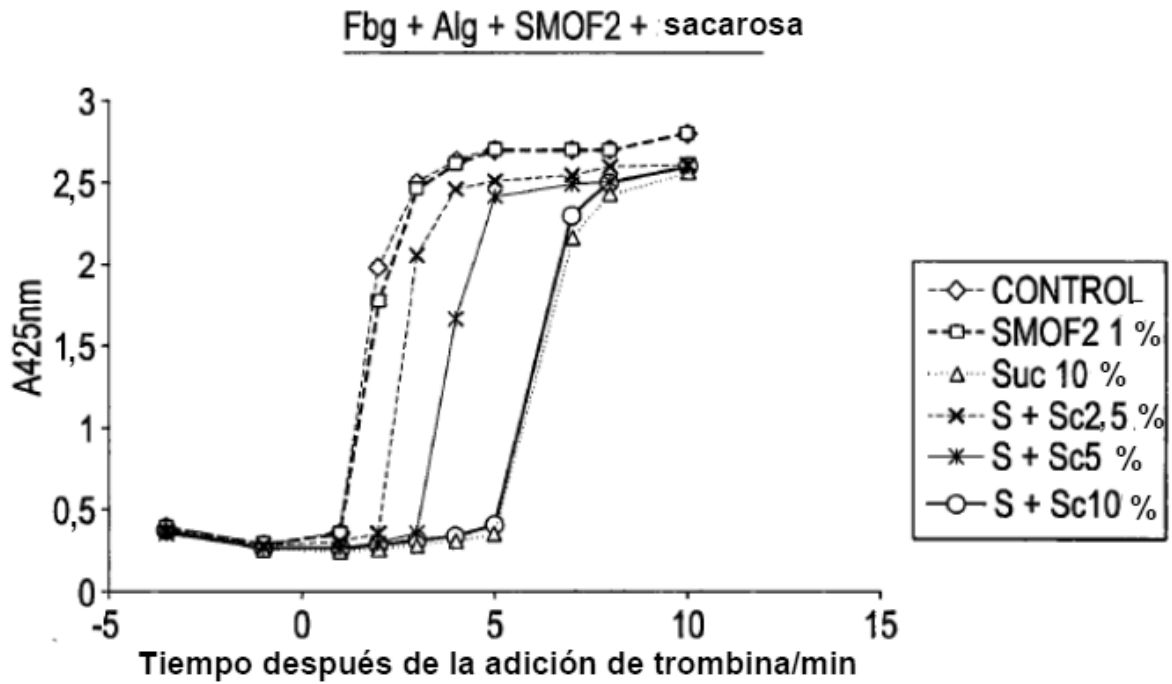


Fig. 20A

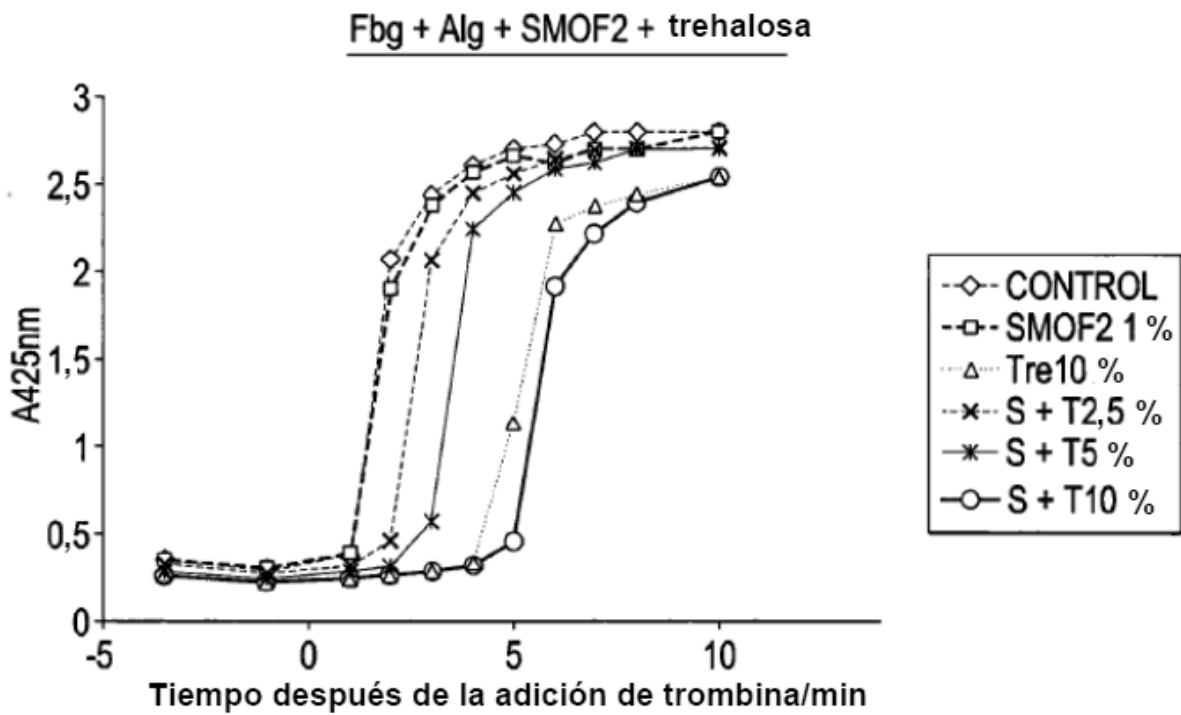


Fig. 20B

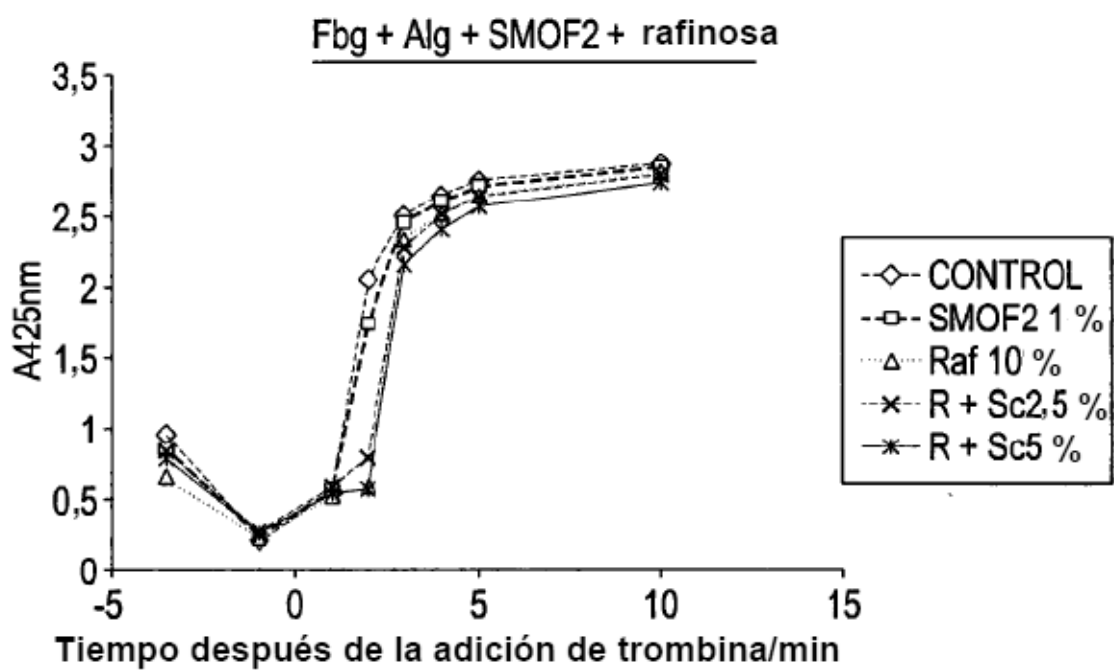
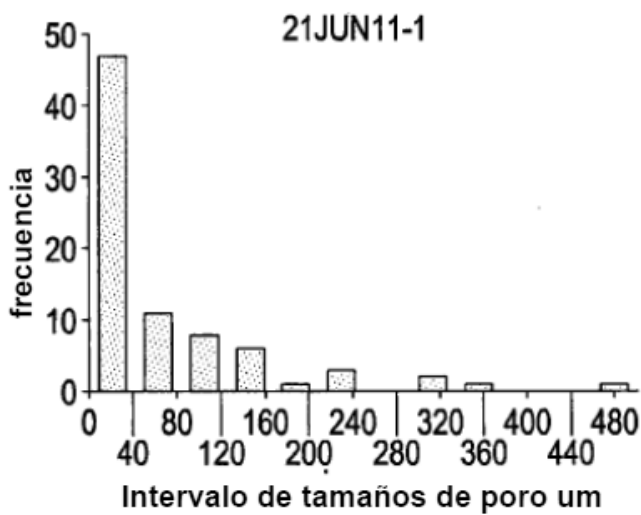
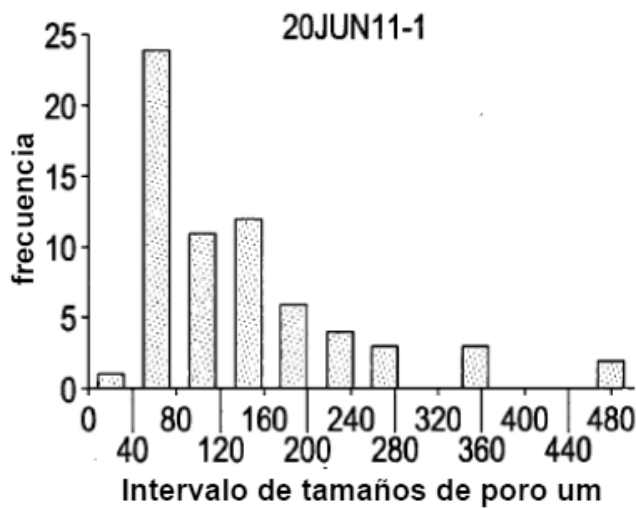
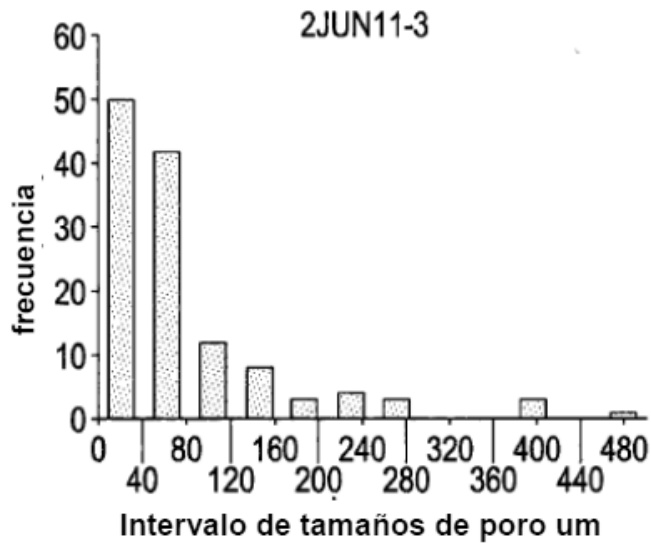


Fig. 20C

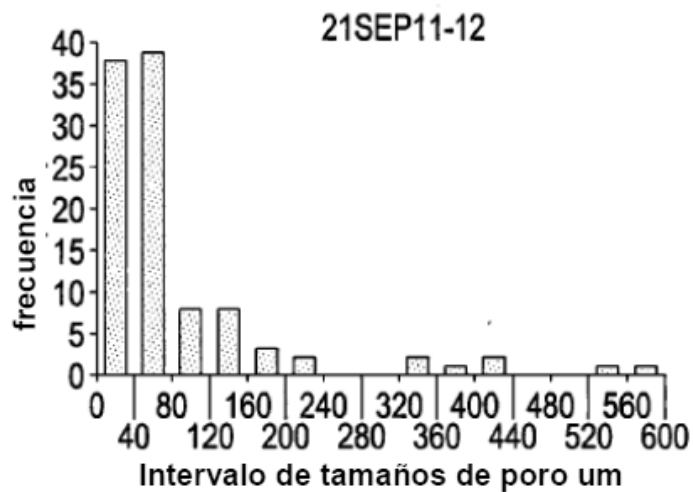
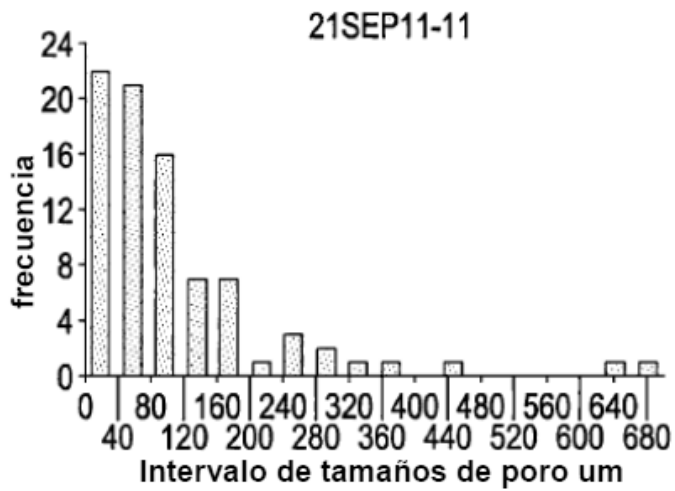
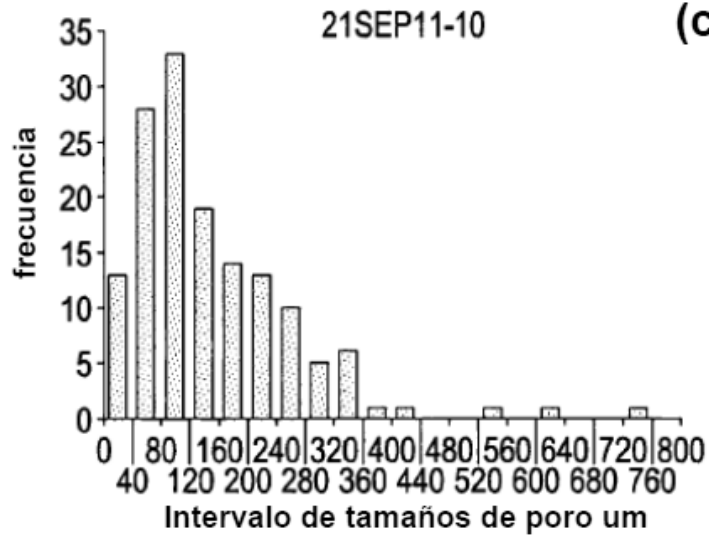
Armazones de SMOF1

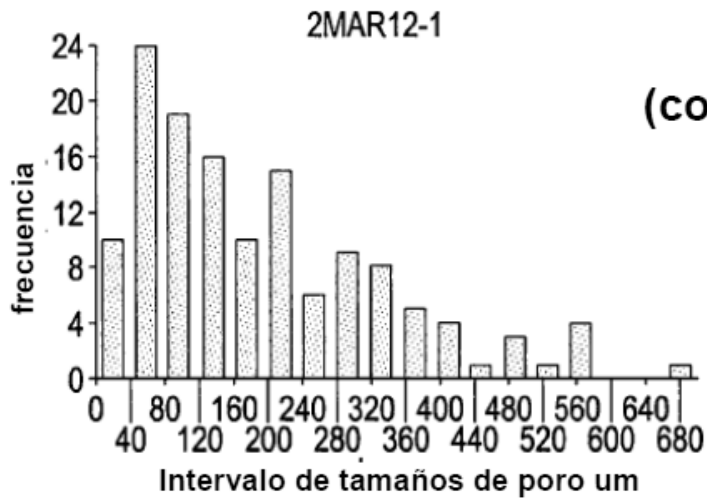
Fig. 21



Armazones de SMOF2

Fig. 21
(continuación)





Armazones de DdSuc

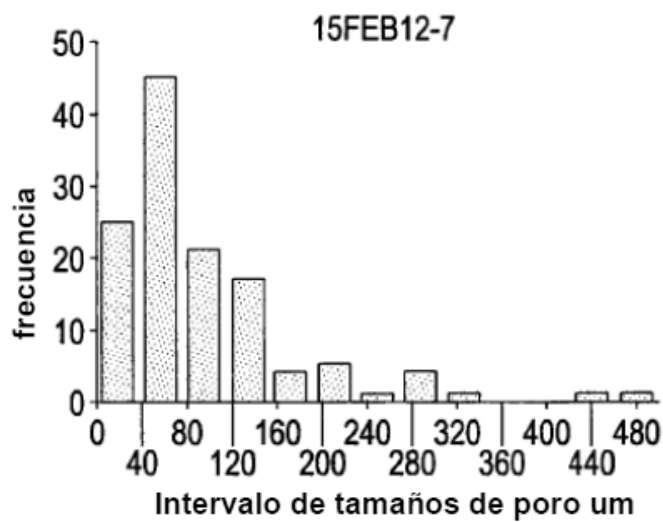
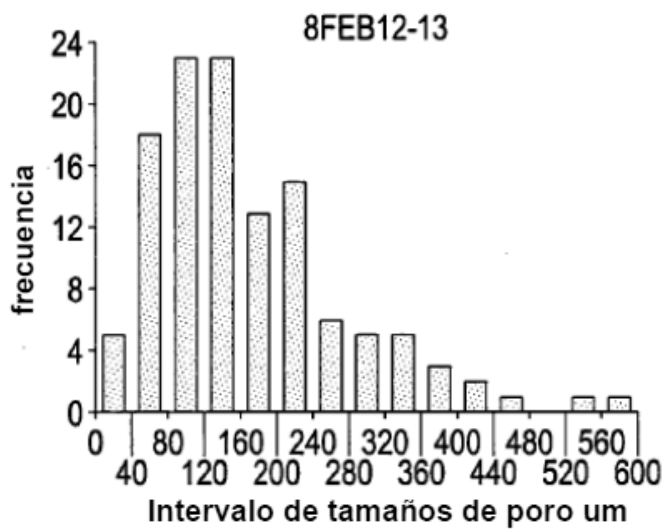
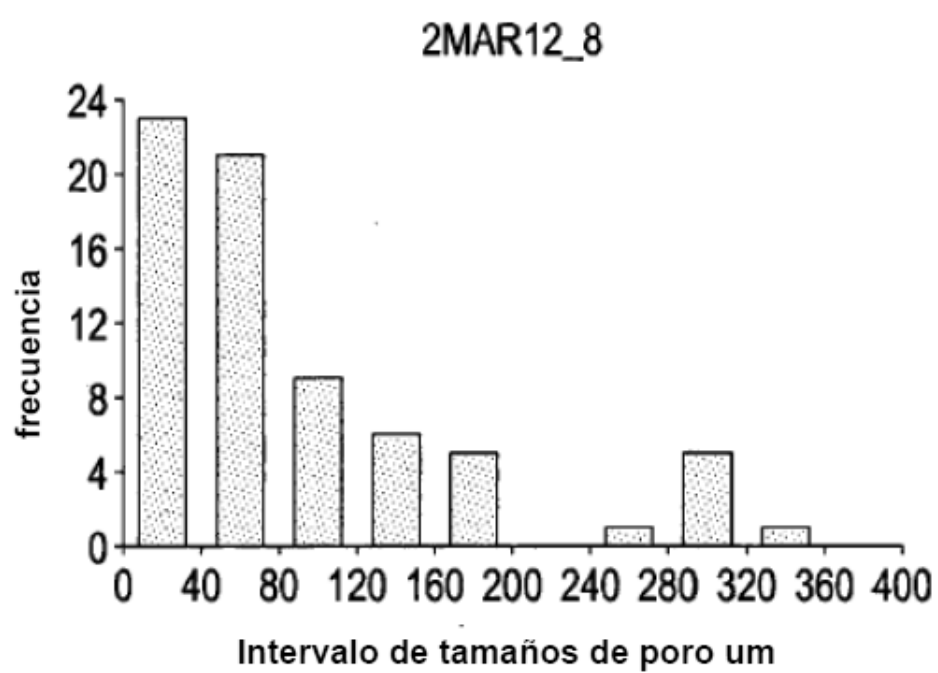


Fig. 21
(continuación)



Resultado de injertos cutáneos de espesor parcial de una sola etapa

Tinción con hematoxalina y eosina

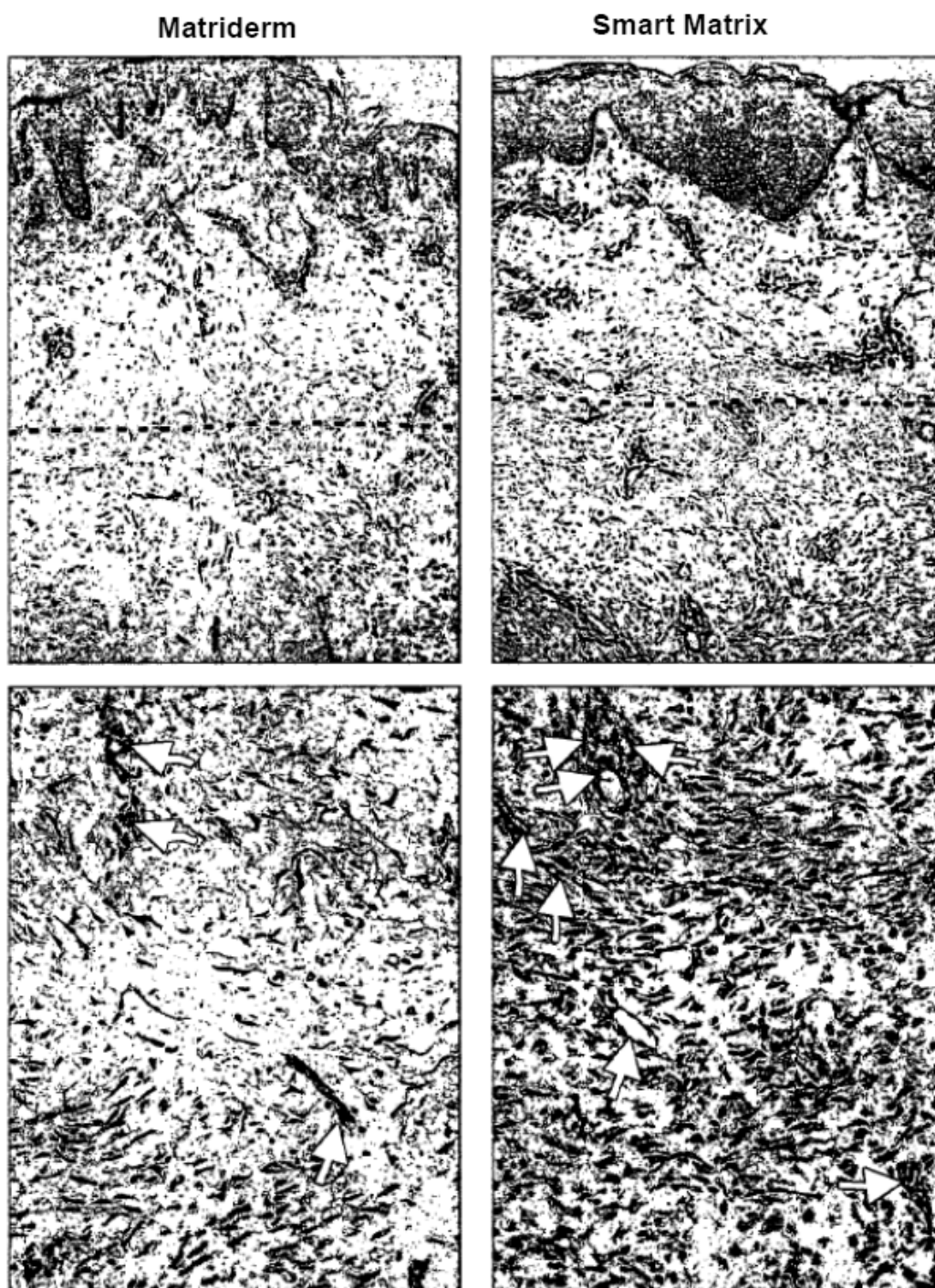


Fig. 22

Función del almacén de Smart Matrix durante 3 semanas



Fig. 22
(continuación)

Resultado de injertos cutáneos de espesor parcial de una sola etapa

Tinción con Picro-Sirius

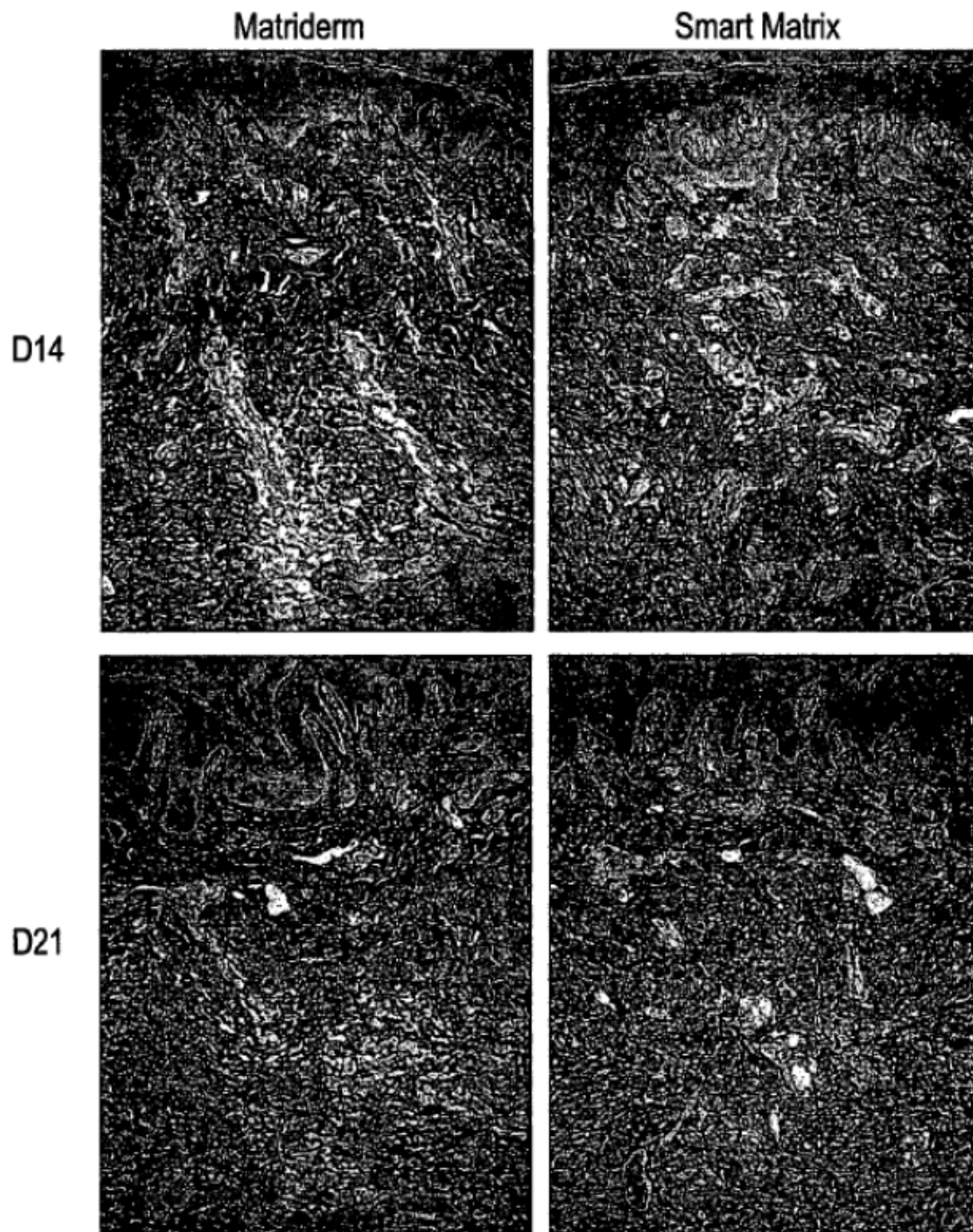


Fig. 22
(continuación)

Curva de tensión-deformación (media)

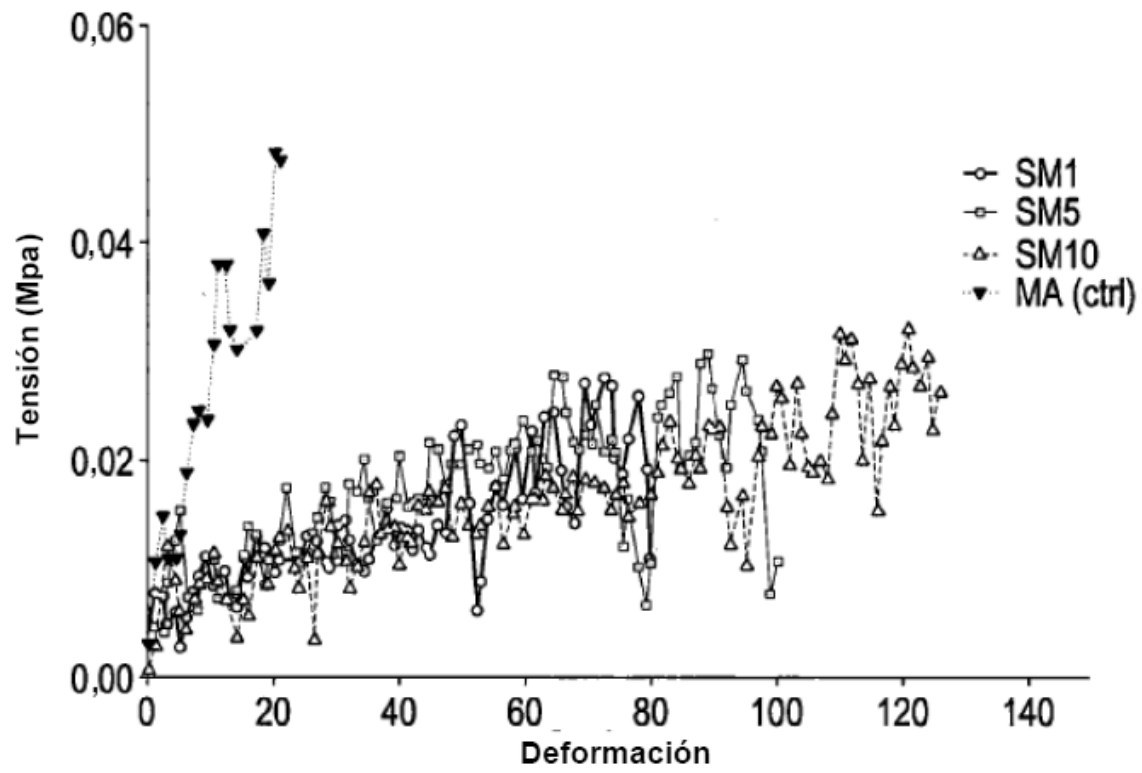


Fig. 23a

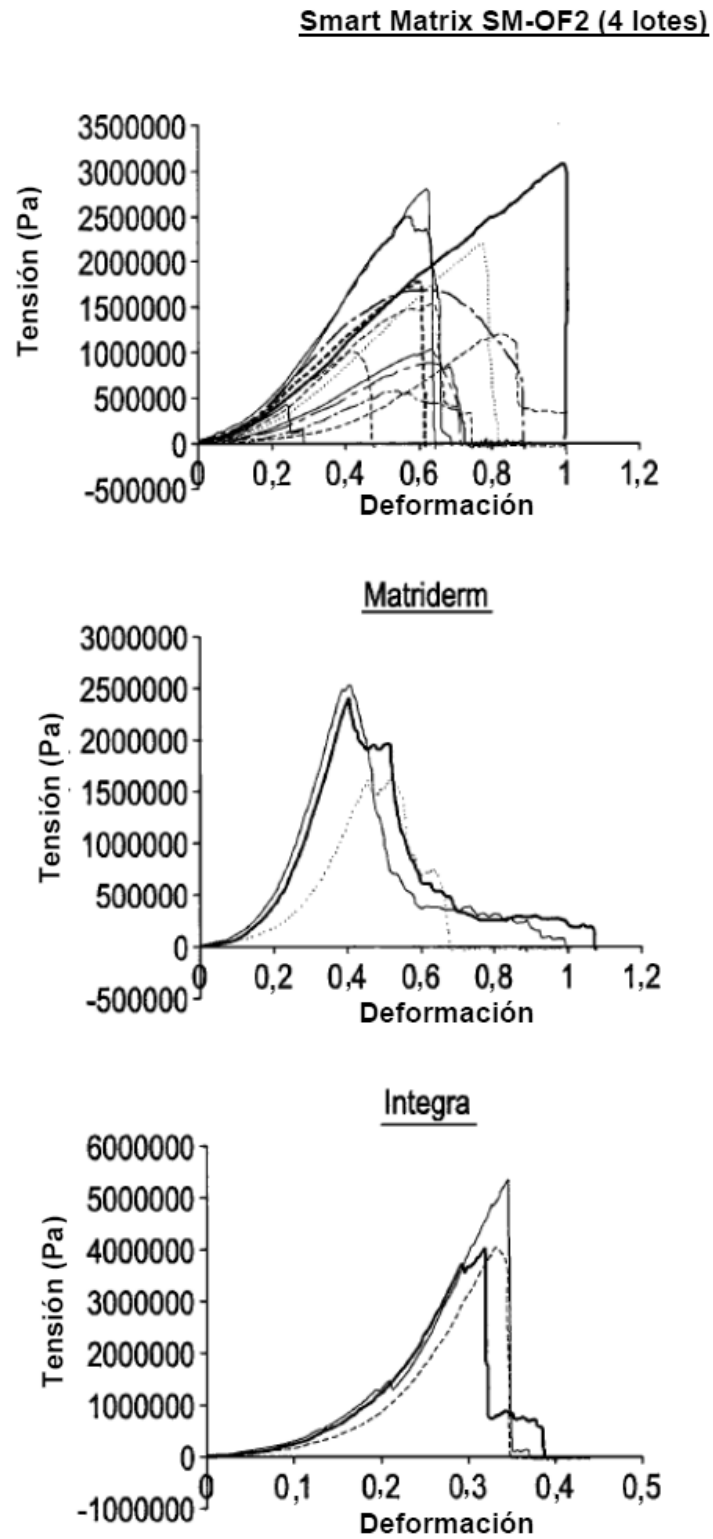


Fig. 23b