

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA**

**PROYECTO INTEGRADOR**

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA,  
HISTOLÓGICA Y MECÁNICA DE UN ANDAMIO  
OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL PARA SU  
USO EN MEDICINA REGENERATIVA”**

**ALUMNO: AIASSA, LUDMILA**

**DIRECTORA: SALVATIERRA, NANCY ALICIA**

**CODIRECTOR: NIEVAS, EDUARDO GABRIEL**

**CÓRDOBA, REPÚBLICA ARGENTINA**

**OCTUBRE 2023**

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto integrador es el producto de varios meses de trabajo, a lo largo de los cuales, he contado con la colaboración, el apoyo y la compañía de numerosas personas. Por esto, quisiera expresar en las siguientes líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra, han hecho posible llevar a cabo este trabajo.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mi Profesora y Directora de proyecto Nancy Salvatierra, por darme la oportunidad de realizar el proyecto integrador en su área, por su exigencia en la calidad científica, por sus comentarios y consejos, por compartir su sabiduría conmigo. No sólo quiero agradecerle su disponibilidad en la planificación y análisis de los estudios realizados, sino también su calidad humana. Ha representado un ejemplo de constancia, metodología y rigor científico.

Igualmente quisiera agradecer de forma especial al Dr. Eduardo Nievas, co-director de este proyecto integrador, quien me ha guiado en varios ensayos realizados para este trabajo gracias a su experiencia en ingeniería en tejidos.

Asimismo, agradezco al equipo de laboratorio del Departamento de Química de la Facultad de ciencias exactas, por su disponibilidad para responder mis múltiples dudas, por los ensayos de citotoxicidad realizados con Romina Comin, especialmente por haber puesto a mi disposición todos los equipos con los que cuenta en su departamento.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a aquellos con quien he compartido de forma más cercana estos años de trabajo, por un lado mi compañera Juana Spain, con quienes compartí desde el cursillo hasta la última materia, ni hablar de todas las horas de estudio y por otro lado mi amiga mas cercana Lic. Candelaria Patiño con quien a pesar de la diferencia de carreras siempre fue una gran compañera de preparación de finales.

A todos mis compañeros de trabajo, muchas gracias por su amistad y compañerismo en este último tramo. A mi novio, gracias por su disponibilidad a colaborar y su apoyo.

Quisiera agradecer de forma especial a mi familia por su paciencia, por animarme y siempre transmitirme su apoyo y optimismo, ni hablar de esos días de parcial que me llevaban en auto, o esos choques perdonados por suceder en camino a la facultad.

# ÍNDICE

## Contenido

PORTADA .....	1
AGRADECIMIENTOS .....	2
RESUMEN.....	5
PALABRAS CLAVES.....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
Objetivos.....	9
MARCO TEÓRICO .....	10
Anatomía Vegetal.....	10
Estructura externa de las plantas .....	10
Estructura celular interna .....	10
Andamios Vegetales.....	14
Protocolos de descelularización de vegetales.....	14
Celulosa y su Uso en Ingeniería en Tejidos .....	14
Descelularización de vegetales.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
Protocolo de Descelularización.....	18
Análisis Histológico .....	19
Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	20
Caracterización Mecánica.....	20
Ensayo de Tracción .....	20
Reología .....	22
Ensayo de Reometría.....	22
Cuantificación de SDS.....	23
Cuantificación de ADN .....	24
Preparación de la Muestra.....	24
.....	25
Cantidad de ADN remanente .....	25
Ensayo de Citotoxicidad-(ISO 10993-5) .....	25
Evaluación de la Biocompatibilidad.....	26
Obtención de los extractos .....	26

Ensayo de viabilidad celular .....	27
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS .....	29
Protocolo de Descelularización.....	29
Análisis Histológico .....	30
Microscopía Óptica: .....	31
Análisis en Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	32
Ensayo de Tracción .....	33
Ensayos de Reometría.....	37
Barrido de Amplitud .....	37
Barrido de Frecuencia .....	39
Cuantificación de SDS.....	40
Cuantificación de ADN .....	41
Ensayo de citotoxicidad.....	42
DISCUSIÓN .....	44
CONCLUSIÓN.....	46
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXO .....	52
Código de análisis de tracción .....	52
Codigo para los ensayos sobre el protocolo 1 .....	52
Codigo para los Graficos de Módulo de Young.....	54
Preservación de Conductos Vasculares Foliares .....	55

## RESUMEN

A pesar de los importantes avances en la fabricación de andamios por ingeniería de tejidos, la entrega de nutrientes y de oxígeno en el tejido desarrollado sigue siendo el mayor desafío. También la poca disponibilidad de órganos y los altos costos en su obtención, ha llevado a la ciencia a mirar hacia tejidos de distinto origen. Las similitudes en la estructura vascular de los tejidos vegetales y animales, permitió pensar en el desarrollo de un tejido vegetal descelularizado como andamio prevascularizado para aplicaciones de ingeniería tisular. Nos proponemos en este proyecto implementar una metodología para la obtención de andamios acelulares de hojas de espinaca con la finalidad de proveer un andamio con una vascularización intacta que pueda servir como cimiento para la recelularización posterior con células animales y/o humanas adultas o embrionarias. Los resultados muestran que el protocolo de descelularización permitió obtener andamio con una estructura microscópicamente conservada, con mínimos contenidos de ácidos nucleicos y detergentes residuales y sin evidencias de citotoxicidad. Además, la metodología desarrollada para la descelularización constituyó

una forma eficiente para la obtención de un andamio de origen vegetal con una arquitectura tridimensional preservada las cuales podrían ser recelularizadas con células animales o células madre en un paso posterior.

## PALABRAS CLAVES

Ingeniería de tejidos -- Reino vegetal- - Espinaca - – Descelularización -- Caracterización mecánica -- Caracterización histológica -- Caracterización química – Biocompatible -- Andamio.

## INTRODUCCIÓN

La necesidad de órganos y tejidos disponibles para trasplantes supera ampliamente su disponibilidad. El Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI) establece en sus memorias anuales que los trasplantes realizados son insuficientes para cubrir las necesidades reales, a pesar de la reciente sanción de la ley Justina de donación y trasplante de órganos (Ley 27.447). Esta reglamentación resultó ser una poderosa herramienta que generó un impacto altísimo en materia de donación de órganos, fortaleció el sistema, simplificó procesos y ayudó a posicionar la trasplantología de nuestro país como referente de la región. Sin embargo, la escasez crítica de órganos de donantes conduce a una mayor morbi-mortalidad de miles de pacientes cada año. En nuestro país, según los datos en tiempo real del INCUCAI el total de pacientes que esperan por un trasplante es de 7091 al 10/10/2023 según los datos consignados en el Sistema Nacional de Información de Procuración y Trasplante de la República Argentina (SINTRA). [1]

Los datos presentados nos reflejan que a pesar de la generosidad de los donantes (624 personas donaron sus órganos en el presente año), la aplicación de las leyes y los esfuerzos asistenciales no han podido cubrir hasta el presente las necesidades de la población. Por lo tanto, la insuficiencia de órganos para trasplante constituye un problema de salud prioritario que nos lleva a encontrar soluciones alternativas para restablecer la calidad de vida de los pacientes afectados. Sin tener en cuenta todos aquellos pacientes que si bien tienen la posibilidad de recibir un órgano cargan con el riesgo de rechazo crónico y la morbilidad asociada a un régimen permanente de la terapia inmunosupresora.

Es por esta problemática que surge la ingeniería en tejidos la cual evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos. La piel y los cartílagos artificiales son ejemplos de tejidos fabricados por ingeniería que han sido aprobados por la FDA; sin embargo, actualmente tienen un uso limitado en pacientes humanos. [2].

Aunque se han hecho avances importantes en el desarrollo de la ingeniería de tejidos, la mayoría de las técnicas actuales son incapaces de crear vasos sanguíneos. Técnicas como la carga de andamios con factores proangiogénicos [3], la formación de redes vasculares guiadas por células [4] y los diseños microfabricados [5] han demostrado un éxito limitado en la recapitulación completa de la vasculatura nativa. Además, la microvasculatura (<10 mm de diámetro) no se puede fabricar funcionalmente con las técnicas de biofabricación actuales, como la impresión 3D.

En lugar de intentar diseñar una red vascular, se cambió el enfoque a la implementación de técnicas de descelularización basadas en perfusión para la obtención de andamios bioinspirados [6]. La descelularización elimina el material celular de un tejido u órgano dejando un armazón acelular que consiste en matriz extracelular (MEC), cuya composición depende del tejido u órgano del que se deriva [7], preservando al mismo tiempo una red vascular intacta [8]. Al eliminar el material celular del tejido de un donante, un injerto descelularizado dejaría de ser inmunogénico y al mismo tiempo conservaría la estructura macroscópica del órgano [9]. Los tejidos y órganos descelularizados pueden luego recelularizarse con las propias células del paciente para crear un injerto autólogo [8]. Estas técnicas de perfusión fueron primero aplicadas a tejidos animales donde la composición bioquímica nativa y la estructura jerárquica del tejido del órgano descelularizado derivan directamente del donante del mismo. Esto conduce inherentemente a una inconsistencia entre los órganos derivados de diferentes pacientes, o descelularizados utilizando diferentes métodos, debido a variables de confusión como la edad, la patología del organismo o del tejido y las características específicas del protocolo de descelularización [7,10,11]. En particular, el análisis de la composición de proteínas mediante espectrometría de masas ha mostrado diferencias drásticas en la composición de los tejidos descelularizados entre diferentes pacientes [12,13]. Además, los tejidos decelularizados de mamíferos son de difícil obtención. Por lo tanto, hasta el presente no ha sido posible obtener órganos completos para su uso en la clínica. Es así que el uso de andamios a partir de tejidos vegetales fue considerado una fuente de tejido más consistente, efectiva y de mayor disponibilidad para mejorar las perspectivas, aumentando el número viable de injertos a un costo significativamente menor [14].

Las plantas y los animales tienen enfoques fundamentalmente diferentes para transportar líquidos, químicos y macromoléculas, sin embargo, hay similitudes sorprendentes en sus estructuras de red vascular. La vasculatura de las plantas sigue la Ley de Murray [15], que es la ley fisiológica que describe el diseño de red cónica y ramificada del sistema cardiovascular humano [16]. Las estructuras dentro del tejido vegetal [17], al igual que el tejido humano [18], exhiben propiedades mecánicas variadas, lo que permite funciones variadas. Las paredes celulares vegetales están compuestas por una variedad de polisacáridos, los más destacados son la celulosa, la pectina y la hemicelulosa [19]. La celulosa, que es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas, es un biomaterial bien estudiado para una variedad de aplicaciones clínicas [20]. La celulosa es biocompatible y se ha demostrado que promueve la cicatrización de heridas [21]. Además, los andamios de ingeniería de tejidos celulósicos derivados de rodajas de manzana descelularizadas han demostrado la capacidad de unión y proliferación de células de mamíferos [22] y se descubrió que eran biocompatibles cuando se implantaban por vía

subcutánea in vivo [23]. La pectina [24] y la hemicelulosa [25] también se han estudiado como biomateriales para la ingeniería de tejido óseo y la cicatrización de heridas, respectivamente. Las similitudes innatas y la aparente biocompatibilidad de la matriz extracelular vegetal nos impulsaron a mirar a través de reinos e investigar si las plantas y sus vasculaturas innatas podrían servir como andamios perfusibles para diseñar tejido humano.



## Objetivos

El objetivo general de este proyecto integrador es el desarrollo de un andamio tridimensional descelularizado a partir de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y su posterior caracterización bioquímica, histológica y mecánica para su potencial aplicación en medicina regenerativa.

Nos proponemos en este proyecto caracterizar desde diferentes perspectivas los andamios obtenidos para conocer su capacidad de funcionar como *scaffolds*. Se realizarán estudios de las propiedades mecánicas, contenido de ADN residual, contenido de detergente residual, preservación y conservación de la microarquitectura celular y el comportamiento biológico mediante la biocompatibilidad *in vitro*.

Nuestra hipótesis de trabajo es que *andamios de origen vegetal obtenidos por descelularización demuestran un alto potencial para ser utilizadas como plataformas para ingeniería de tejidos*.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un protocolo de descelularización para hojas de espinaca mediante el uso de diferentes agentes químicos.
- Cuantificar el contenido de ADN remanente y el detergente residual en la matriz obtenida posterior al protocolo de descelularización optado.
- Caracterizar morfológicamente el andamio mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido para evaluar la preservación de la estructura tisular.
- Caracterizar mecánicamente el andamio obtenido mediante estudios de reometría y ensayos de tracción.
- Evaluar la biocompatibilidad del andamio mediante el ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular según la Norma ISO 10993:5.

## MARCO TEÓRICO

### Anatomía Vegetal

#### Estructura externa de las plantas

El cuerpo de las plantas vasculares está conformado por las estructuras principales denominadas tallos, hojas y raíz. El origen común de estos órganos proviene del embrión de la semilla y a la madurez conforman una estructura continua. [26]

#### Estructura celular interna

Las células vegetales se caracterizan por presentar elementos exclusivos: pared celular, vacuolas y plástidos. Estas células se agrupan formando tejidos, los cuales presentan variaciones estructurales según los tipos celulares que los componen y la forma en las que se conectan entre sí. Los órganos de las plantas vasculares se caracterizan por presentar tejido vascular o de conducción, además de otros tejidos no vasculares. Los tejidos conductores (xilema y floema) forman un sistema cohesionado, continuo y que se extiende por toda la planta. El xilema está asociado a la absorción y conduce agua y solutos por todo el cuerpo de la planta y, el floema, a la conducción de las sustancias elaboradas por la fotosíntesis. [26]



Figura 1: Xilema primario en corte longitudinal, por tallo de *Zea mays* "maíz". Se observan vasos del protoxilema y metaxilema. [27].

#### Vacuolas

Las vacuolas son otro carácter exclusivo de la célula vegetal. Pueden llegar a ocupar el 90% del volumen celular, dejando el citoplasma restringido a la periferia de la célula. En su interior hay principalmente agua y sustancias hidrosolubles y su función principal es la turgencia de los tejidos por presión osmótica. [26]

### Células oclusivas

Son aquellas células especiales que delimitan un espacio intercelular (poro u ostiolo) que conforman un estoma. La epidermis foliar no presenta espacios intercelulares excepto el ostiolo. Los estomas son los encargados del intercambio gaseoso en el cuerpo primario de la planta y están directamente relacionados a la fotosíntesis. Por el ostiolo entra el CO<sub>2</sub> necesario para el proceso y se libera el O<sub>2</sub> producto del mismo. [26]

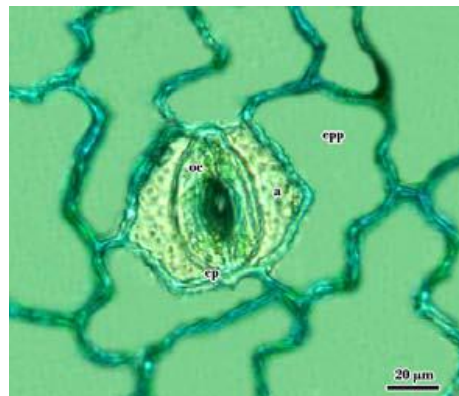


Figura 2: Epidermis en vista superficial de la hoja de *Vinca sp*. Se observa un estoma paracítico. Las dos células auxiliares son paralelas a las oclusivas. [27].

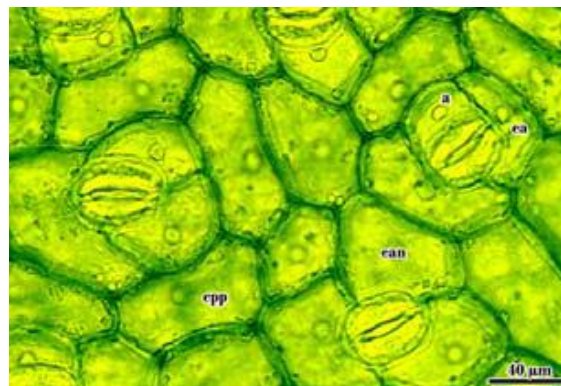


Figura 3: Epidermis en vista superficial de la hoja de *Solanum glaucophyllum*. Se observan estomas anomocíticos y anisocíticos. [27].

### Pared celular

Todas las células vegetales presentan pared celular, aunque generalmente, las gametas masculinas y femeninas carecen de ella. Según el tipo y grosor de la pared celular se determina el tipo y función de tejido. La pared celular es considerada una matriz extracelular porque se localiza por fuera de la plasmalema (membrana plasmática) y es sintetizada hacia el exterior por la propia célula. Por lo tanto, la pared se produce de adentro hacia fuera, siendo las capas externas las viejas y las internas las nuevas. La pared celular no es una cubierta inerte, sino que interviene en numerosos procesos celulares. Está

compuesta por una fase microfibrilar de naturaleza cristalina y una fase matricial. La fase microfibrilar (60%) está formada por largas microfibrillas de grosor uniforme (10 nm). Estas microfibrillas presentan una sección transversal circular u oval y están constituidas por 30 a 100 unidades de celulosa dispuestas linealmente paralelas a la longitud de la fibrilla. De esta manera, las moléculas de celulosa están ordenadas en el espacio constituyendo un todo cristalino que es la causa de la birrefringencia cuando se observa la pared celular con luz polarizada [26].

Se ha demostrado que las microfibrillas tienen una región central cristalina rodeada por una superficie no tan cristalina casi amorfa formada por moléculas de celulosa menos ordenadas y compactas. La fase matricial no cristalina constituye la matriz de la pared y contiene polisacáridos (pectinas y hemicelulosas), proteínas (polipéptidos de hidroxiprolina con cadenas laterales de oligosacáridos o glucoproteínas) y, en algunos casos, compuestos fenólicos como la lignina. [26].

La pared, principalmente, está conformada de las siguientes partes desde afuera hacia adentro: laminilla media (cemento entre una célula y otra), pared primaria y pared secundaria. Una célula puede llegar a la madurez con pared primaria (tejidos epidérmico, tejido de reserva, etc.) o, si su función lo determina, tendrá pared secundaria (tejidos de sostén y de conducción). [26].

La laminilla media es la primera capa en formarse durante la división celular. Es por esto que es la capa más externa de la célula con características de gel compuesto por sustancias pécticas. Las pectinas de la laminilla media conforman cadenas entrecruzadas unidas por iones calcio, confiriendo una estructura amorfa. [26].

La pared primaria es delgada y su espesor oscila entre 1 a 3 micrones. Las microfibrillas de celulosa se ordenan en forma transversal, longitudinal y oblicua, formando un enrejado (crecimiento por intususcepción). Posee entre 2 a 25 % de celulosa y las cadenas de celulosas contienen 2000 unidades. Debido a que presenta un 40 a 50 % de hemicelulosas (fase matricial), la pared primaria está considerablemente hidratada. Por ello, permite el pasaje de sustancias hidrofílicas a través de ella [26].

La resistencia de la pared primaria se debe a la resistencia de las microfibrillas y depende de la orientación de las mismas. Asimismo, se estira en forma plástica, permitiendo el alargamiento de la célula en los momentos de diferenciación celular o de turgencia [26].

En los tejidos de sostén y de conducción del agua, las células una vez elongadas comienzan a depositar fibrillas en forma paralela constituyendo una trama homogénea (crecimiento por aposición) sobre la pared primaria. En esta capa de la pared celular denominada pared secundaria, las cadenas de celulosa contienen 14000 unidades. Una vez que se ha depositado el espesor de pared secundaria destinado a cada tejido,

generalmente, la célula muere y solo quedan las gruesas paredes secundarias con un lumen celular. La resistencia en esta pared será mayor en direcciones paralelas a las microfibrillas y menores en direcciones sub-perpendiculares a las mismas. La presencia de lignina en la matriz de la pared secundaria permite la resistencia a la compresión y aplastamiento. La lignina es un polifenol que forma una trama tridimensional mediante uniones covalentes y no covalentes con los polisacáridos y glucoproteínas de la matriz [26].

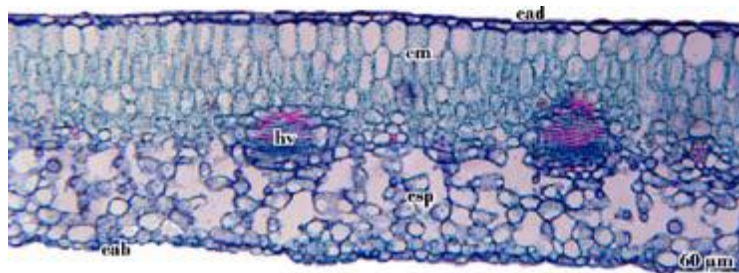


Figura 4: Hoja de *Ligustrum* sp., en corte transversal. Se observa el mesofilo de estructura dorsiventral, con parénquima en empalizada hacia la cara adaxial y parénquima esponjoso hacia la cara abaxial. [27].

## Andamios Vegetales

### Protocolos de descelularización de vegetales

Para la obtención de andamios de origen vegetal se utiliza lo que se llama protocolo de descelularización, este protocolo se centra en dos métodos para descelularizar tejidos vegetales, como hojas y tallos. El primer método es una técnica basada en detergentes que utiliza una serie de baños para eliminar el ADN y la materia celular, este es un método utilizado ampliamente para la descelularización de tejidos mamíferos, y fue adaptada de modo que tenga resultados exitosos en tejido vegetal. La segunda metodología no utiliza detergentes y está adaptado de un protocolo de "skeletonization" generalmente utilizado para eliminar los tejidos blandos de las hojas. Este protocolo se centra en la descomposición de manera natural de hojas y frutas, sumergiendo en agua durante períodos prolongados de tiempo (semanas a meses). Este método es más lento y permite eliminar los residuos celulares evitando alterar significativamente la estructura del tejido blando [28][29][30][31][32][33].

A continuación se expondrán los métodos más comúnmente utilizados [34]:

### Celulosa y su Uso en Ingeniería en Tejidos

La celulosa, compuesta principalmente por cadenas lineales de  $\beta(1 \rightarrow 4)$  unidades de D-glucosa unidas, es el polisacárido más abundante en naturaleza. La celulosa se puede obtener de una variedad de materiales naturales. fuentes tales como paredes celulares vegetales, algunas fuentes bacterianas y algas, hongos. Además de su facilidad de disponibilidad, la celulosa tiene propiedades muy atractivas para el campo biomédico, incluyendo la biocompatibilidad, la capacidad de biodegradación, su baja citotoxicidad y propiedades mecánicas ajustables [36].

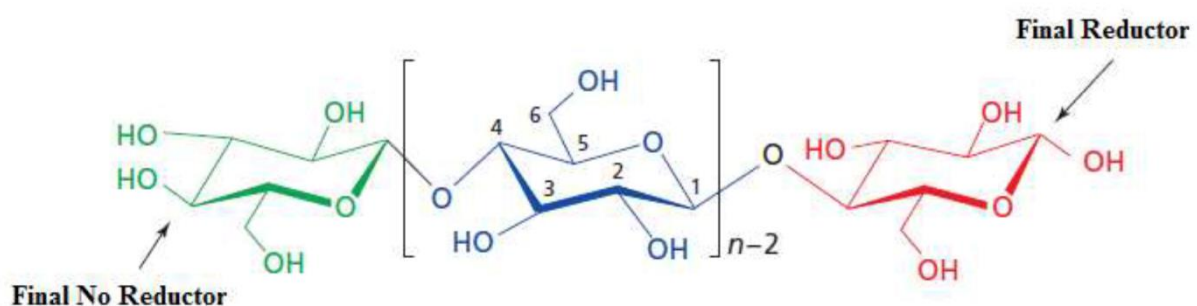


Figura 5: Estructura molecular de la celulosa (Wertz, J., Mercier, J. & Bédoué, O. (2010). *Celulose Science and Technology*. 1ª Ed pp 24)

Recientemente, la celulosa ha sido investigada para diversas aplicaciones biomédicas como apósitos para heridas, membranas de diálisis y especialmente hemomateriales para diálisis e implantes. Es un material deseable para aplicaciones cardiovasculares como injertos vasculares debido a su resistencia mecánica, flexibilidad y compatibilidad sanguínea. Además, la celulosa bacteriana también es atractiva para los huesos, la ingeniería de tejidos y regeneración de cartílago debido a su capacidad de imitar fibras de colágeno y formar una matriz para el tejido recuperación. Algunos estudios sobre la regeneración del tejido dental sugieren que se puede utilizar nanocelulosa o celulosa modificada químicamente para la reparación del tejido periodontal debido a su deseable mecánica propiedades y capacidad de cicatrización de heridas [35][36].

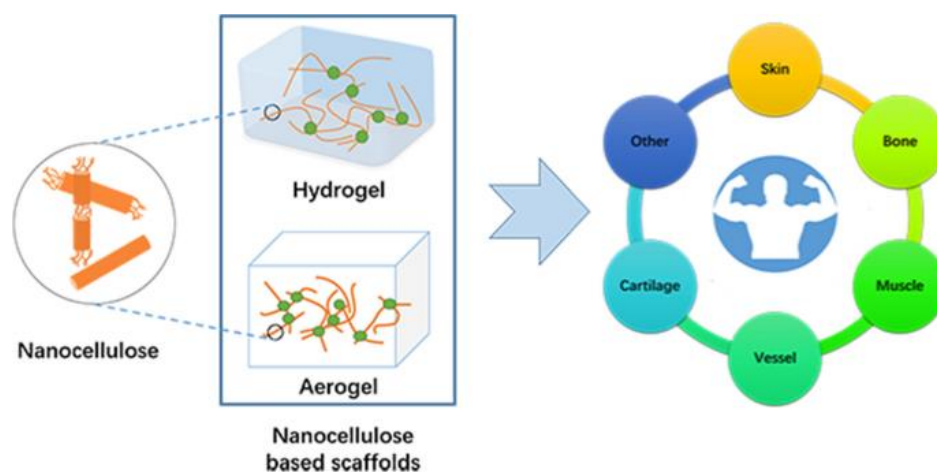


Figura 6: Usos de nanocelulosa para reparación de tejidos (Wei, Z., et al. Cellulose 28, 7497–7520 (2021).

### Descelularización de vegetales

La utilización de vegetales dentro de la ingeniería en tejidos comenzó en el año 2017, en Toronto Canadá, con investigaciones sobre la obtención de andamios vegetales a partir de hojas de espinaca, Perejil, Ajenjo dulce y raíces de maní utilizando un protocolo de decelularización que permite eliminar el contenido genético de las células de dichos tejidos. Aquí se utilizaron técnicas de perfusión de detergentes para la decelularización de hojas de espinaca. Análisis histológicos permitieron identificar células con núcleos y cloroplastos en hojas nativas, sin presencia de las mismas organelas en sus contrapartes decelularizadas. los estudios mecánicos mostraron un adecuado desempeño y con módulos tangente máximos cercanos a valores de tejidos animales [40].

El andamio también fue fotografiado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), lo que indica que el proceso de decelularización no afectó las propiedades topográficas de la superficie de la hoja [14][37][38].

Otros estudios a partir de similares andamios se utilizaron como soporte para determinar el potencial angiogénico de fibroblastos y células endoteliales dérmicos humanos sobre la superficie cuando fueron pretratados con un recubrimiento de gelatina o colágeno [41].

Investigaciones más recientes permitieron afirmar que los tejidos vegetales descellularizados son una alternativa válida como andamios de ingeniería de tejidos, gracias a la estructura tridimensional que mimetiza los tejidos nativos a regenerar y el microambiente biomimético para el crecimiento de células y tejidos [49]. Estos estudios demostraron la amplia gama de características de tejido animal que pueden cubrir las diferentes partes de la planta y ofrecer una oportunidad única para el desarrollo de andamios específicos, a partir de las rasgos morfológicos, mecánicos y particularidades físicas de cada planta. En concordancia con esto, tres diferentes tejidos vegetales de diferentes órganos vegetales, como un fruto (manzana), una raíz (zanahoria) y un tallo (apio), fueron utilizados para preparar andamios cuyas propiedades particulares como la porosidad y características mecánicas diferenciales fueron dirigidas hacia la regeneración del tejido adiposo, tejido óseo y tendones, respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de la microarquitectura, porosidad, transporte de agua y principalmente el comportamiento mecánico de estos tejidos permitieron desarrollar andamios que mimetizaron propiedades típicas de tejidos humanos [38, 42].



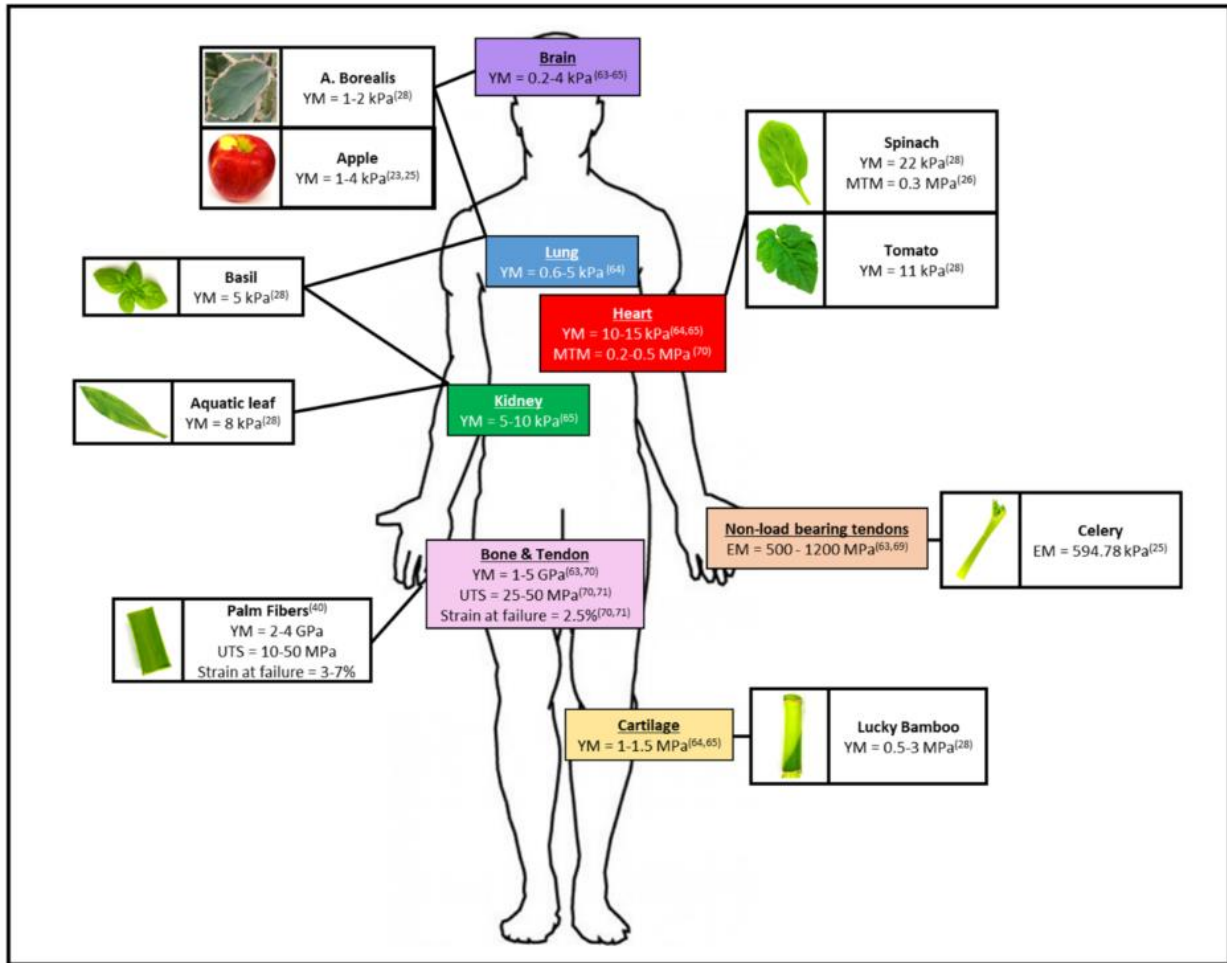


Figura 7: Correlación de propiedades mecánicas entre andamios de distintos vegetales descelerizados y el tejidos humanos [42].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Protocolo de Descelularización

Se utilizaron hojas de espinaca *baby* fresca (*Spinacia oleracea L.*) adquiridas comercialmente en las variedades estacionales de invierno y/o verano. En primer lugar, cada hoja de espinaca aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> se sumergió completamente en n-hexano (Sigma St Louis, USA) durante 1 h en un agitador rotatorio a 60 rpm a fin de remover la cera cuticular. Posteriormente, se enjuagaron minuciosamente con agua desionizada y se procedió a su inmersión en diferentes concentraciones de duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma St Louis, USA) de 1% y 10% P/V según el protocolo empleado durante un período de 4 a 5 días (Tabla 1). En el día final, las hojas de espinaca se enjuagaron 3 veces con agua desionizada durante 1 h y se sumergieron en distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial 5%, 8% y 10% V/V en agua desionizada a fin de remover pigmentos y detritos celulares. Al cabo de 4 h se extrajeron y se enjuagaron exhaustivamente 3 veces con agua desionizada y se las conservó en 1% de solución de suero fetal bovino (PBS) con antibiótico a 4°C. En la siguiente Tabla se detallan los diferentes protocolos de descelularización empleados en este trabajo.

Protocolo	variedad	Hexano	SDS	Días	NaClO	Lavado
1	invierno	1h	10%	5	10%	1 día
2	verano	1h	10%	5	10%	1 día
3	verano	1h	10%	4	8%	3 día
4	verano	1h	10%	4	5%	3 día
5	verano	1h	1%	4	5%	3días

Tabla 1 Diferentes protocolos implementados en el método de descelularización



Figura 8: Hojas de espinaca seleccionadas con SDS en una agitador rotatorio a 60 rpm a inicio de la descelularización.

## Análisis Histológico

La efectividad de la descelularización fue evaluada a través de técnicas convencionales de microscopía óptica con tinción histológica Hematoxilina–Eosina (HE). Las muestras de hojas nativas y descelularizadas fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol y montadas en un taco de parafina para su corte por micrótomos para posterior observación en un microscopio óptico (Neocientífica SA). En primer lugar, se realizaron observaciones macroscópicas y a 10 x en hojas sin descelularizar, control, y hojas descelularizadas luego de los diferentes protocolos empleados. Para la tinción de HE, muestras de hojas descelularizadas y control fueron cortadas con bisturí en fragmentos de 15 mm<sup>2</sup> y se las sumergió dentro de *cassettes* en una solución de formol tamponado (100 ml de p-formaldehído 40%, 4 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1000 ml vf) durante 24 horas, para detener los procesos celulares catalíticos y así obtener la estructura con mínimas modificaciones.

Posteriormente, los cortes fueron montados en un taco de parafina, se realizaron cortes longitudinales y transversales para sus análisis microscópicos. Con la finalidad de observar la presencia de núcleos y contenido celular se usó la técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina [36]. Esta técnica consiste en el teñido de color violeta de los núcleos por medio del colorante básico (catiónico), la hematoxilina, y de color rosado el contenido citoplasmático por el colorante ácido (aniónico), la eosina.

Se realizaron los mismos pasos para las muestras de hoja descelularizada de los protocolos 2 y 5.

Las mismas fueron analizadas en un microscopio óptico y se obtuvieron micrografías a diferentes aumentos con el fin de observar la integridad de los andamios obtenidos.



Figura 9: Taco de hojas de espinaca control

## Microscopía electrónica de barrido (SEM)

A fin de evaluar la ultraestructura de las matrices descelularizadas se procedió a tomar muestras de 100 mm<sup>2</sup> de hojitas descelularizadas y sin descelularizar, control. Estas fueron deshidratadas durante 10 minutos en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Posteriormente, se realizó un secado a punto crítico seguido de un proceso de metalizado con Oro. Cada muestra fue analizada en un microscopio electrónico marca Carl Zeiss- Sigma (LAMARX- CONICET): a 3 kV a 100x y 500x.



Figura 10: Hojas de espinaca control, y descelularizadas luego de completar el proceso de preparación para la obtención de imágenes en el SEM.

## Caracterización Mecánica

### Ensayo de Tracción

Los ensayos de tracción se llevaron a cabo en el Área de Biología Odontológica (ABO) de la Facultad de Odontología de la UNC. Hojas de espinaca descelularizadas se cortaron en forma rectangular de 30 mm de longitud, 3 mm de ancho y 3 mm de espesor. Las muestras a partir de los cortes longitudinales de la nervadura principal con sección constante se fijaron a una máquina de ensayos universal (Digimess RS-8000-5), fijando la velocidad de avance de carro en 2 mm/min. A partir de los valores de fuerza registrados en los ensayos y de las dimensiones de las probetas, se calcularon los valores de esfuerzo “ $\sigma$ ” y de deformación unitaria “ $\epsilon$ ” para posteriormente obtener las curvas de tensión–deformación y los respectivos módulos de elasticidad y de resistencia mediante la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Para la obtención de la deformación unitaria se calculó con la diferencia entre la longitud final (Lf) de la hoja en la región de comportamiento elástico, y la longitud inicial (Li), en relación con la longitud inicial medida.

$$\epsilon = \frac{(Lf - Li)}{Li}$$

Luego para la obtención del valor de esfuerzo se calculó la relación entre la fuerza aplicada (F) y el área de la sección de la nervadura principal de la muestra (A):

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Por último, el área fue calculada con la siguiente formula, donde utilizamos la constante  $\pi$  y el radio de la nervadura principal (r).

$$A = \pi r^2$$

Se realizó el ensayo sobre los protocolos 1, 2 y 5, tomando cinco hojas de cada protocolo. Una vez obtenidos los datos de los ensayos, se los procesó mediante el uso del lenguaje de programación Python y conocimientos sobre el análisis de datos. Se utilizaron las librerías pandas, numpy, matplotlib y seaborn, para el cálculo de las variables utilizadas y la obtención de gráficos de deformación por tensión uniaxial aplicada.



Figura 11: hojas cortadas en forma de rectangular máquina de ensayos universal (Digimess RS-8000-5)

## Reología

La reometría es una técnica utilizada para medir la viscosidad y otras propiedades reológicas de un material. La información que se puede obtener a partir de un ensayo de reometría suele ser:

*Viscosidad:* La viscosidad es una medida de la resistencia de un material a fluir. La viscosidad se puede medir en diferentes condiciones, incluyendo tasa de corte, esfuerzo de corte y tiempo.

*Consistencia:* La consistencia es una medida de la dificultad de un material para fluir. La consistencia se puede medir en términos de la viscosidad y la tasa de corte.

*Elasticidad:* La elasticidad es una medida de la capacidad de un material para recuperar su forma original después de una deformación. La elasticidad se puede medir en términos de la relación entre la deformación y la fuerza aplicada.

*Flujo:* El flujo es una medida de la cantidad de material que fluye a través de un orificio o en un recipiente en un período de tiempo específico. El flujo se puede medir en términos de la velocidad y la densidad del material.

*Módulo de viscoelasticidad:* El módulo de viscoelasticidad es una medida de la combinación de la viscosidad y la elasticidad de un material. El módulo de viscoelasticidad se puede medir en diferentes condiciones, incluyendo frecuencia y amplitud.

## Ensayo de Reometría

Para los ensayos de Reometría se seleccionaron hojas de las descelularizaciones 1, 2 y 5. Se seleccionó una geometría de 5 mm de diámetro, y con un punzón se cortaron las hojas de forma tal que queden cubiertas completamente por la geometría.

Se realizan estudios de barrido de amplitud, con condiciones de frecuencia y temperatura constantes (21°C). Se selecciona una amplitud de 0.1 para todas las muestras, debido a que todas se encuentran en zona de elasticidad dentro de esa amplitud, y luego se hace un barrido en el rango de las frecuencias, con una amplitud constante de 0,1 y temperatura constante a 21°C.

Se procedió a realizar el análisis reométrico mediante un reómetro (Rheoplus Physica MCR 301 Anton Paar), se utilizó una geometría de placa PP (5 mm de diámetro) y se cortaron discos de muestras de hojas descelularizadas de los protocolos 1,2 y 5, con un sacabocados de 5 mm de diámetro.

El primer paso del ensayo consistió en realizar un barrido de amplitud a una frecuencia constante, se configuró el equipo en una frecuencia constante de 1 Hz y un estiramiento variable entre 0,01% y 10%, con 6 puntos por década. El resultado de ese

primer paso se utilizó para establecer la Región Viscoelástica Lineal (RVL) de cada una de las matrices.

Una vez determinado un valor de estiramiento para cada matriz, dentro de la RVL se procedió al segundo paso del ensayo. Este consistió en un barrido en frecuencia del material, configurado con una amplitud constante de 0,99%, y una frecuencia variable entre 0,1 a 10 Hz con 13 puntos por década. Los resultados de ambas partes del ensayo fueron procesados con la aplicación Rheoplus 32 V3.10 21003376-33024 (Facultad de Ciencias Químicas, UNC).



Figura 12: Reómetro Rheoplus con geometría colocada y hoja decelularizada presentada para comenzar el estudio.

## Cuantificación de SDS

Para la cuantificación del SDS se tomaron muestras de la última hora del lavado del proceso de descelularización y se siguió el protocolo propuesto por Arand et al [44]. Esta técnica colorimétrica cuantitativa se basa principalmente en la eliminación de cantidades traza de SDS a partir de diferentes preparaciones que contengan incluso proteínas y ácidos nucleicos mediante el agregado de cloroformo que tiene la capacidad de precipitar eficientemente el detergente [44].

La curva de calibración se construyó mediante la preparación de seis diluciones seriadas de SDS de 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001% y 0%. Brevemente, se tomó una muestra de 300  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado, se agregó 300  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y se agitó manualmente. Posteriormente, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de reactivo de azul de metileno (250 mg de azul de metileno, 50 gr de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en un volumen final de 1000 ml). Se agitó y la mezcla se extrajo con 1,2 ml de cloroformo mediante agitación exhaustiva. Después de una breve centrifugación (2500 rpm durante 2 min), la fase

orgánica inferior se transfirió con una pipeta Pasteur a un vaso Eppendorf de 1,5 ml que contenía 50 mg de sulfato de sodio anhidro. El tubo se invirtió varias veces para favorecer la eliminación de trazas de agua de la fase de cloroformo mediante el sulfato de sodio y se cuantificó por espectrofotometría a 651 nm frente a un blanco de cloroformo. Los resultados fueron expresados en %P/V.



Figura 13: Fase orgánica del ensayo, con concentraciones para la curva de calibración

## Cuantificación de ADN

### Preparación de la Muestra

Para la cuantificación de ADN se descelerizaron 24 hojas por el protocolo 5 y se seleccionaron otras hojas de espinaca nativas para utilizar como control. Posteriormente, se pesaron las hojas en una balanza analítica Adventurer y se llevaron a una estufa a 32°C con aire forzado hasta la determinación de peso seco. Las hojitas fueron pesadas diariamente durante 72 h hasta peso constante. Se utilizaron para la determinación bioquímica de ADN aproximadamente 200mg de muestra de hojas descelerizadas secas y hojas nativas.





Figura 14: Hojas control y descelularizadas en peso seco.

### Cantidad de ADN remanente

El ADN genómico total de hojas nativas y descelularizadas se extrajo de tejido de las hojas secas (0,25 mg) utilizando el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) de acuerdo con el manual del proveedor. Se utilizaron cinco muestras de cada tratamiento. Las concentraciones de ADN se determinaron utilizando un espectrofotómetro BioSpec-nano. Estos kits proporcionan un aislamiento de ADN basado en sílice rápido y sencillo a partir de muestras vegetales en formato de columna giratoria. Los rendimientos típicos son de 3 a 260  $\mu\text{g}$  de ADN de alta calidad, según la capacidad de unión de la membrana de sílice DNeasy. Los resultados se expresaron ng de ADN por mg de tejido seco.

### Ensayo de Citotoxicidad-(ISO 10993-5)

La norma ISO 10993-1 declara la biocompatibilidad como la capacidad que tiene un dispositivo médico o material para desempeñarse con una respuesta apropiada en una aplicación específica. Para saber si un material será biocompatible se deben realizar pruebas que así lo determinen. La norma ISO 10993 certifica los efectos biológicos de los dispositivos médicos, en ella se establecen los ensayos a realizar para determinar el riesgo biológico que presenta un material o dispositivo. Una de las pruebas que se lleva a cabo es el ensayo de citotoxicidad. [43].

El ensayo de citotoxicidad se lleva a cabo mediante la exposición de células vivas a un material, y se observa su efecto sobre la viabilidad celular y la función. Los resultados del ensayo se utilizan para determinar si un material es tóxico y si debe ser considerado para su uso en dispositivos médicos.

Es importante destacar que la norma ISO 10993-5 es una de las muchas normas que se utilizan para evaluar la seguridad de los materiales en la industria médica, y que su aplicación es específica para productos médicos y materiales relacionados.

El ensayo de citotoxicidad según la norma ISO 10993-5 implica los siguientes pasos:

1. Selección del material: El primer paso es seleccionar el material que se va a evaluar. La norma recomienda que se realice una evaluación previa de la información disponible sobre el material para determinar su potencial de toxicidad.
2. Selección de la célula: El siguiente paso es seleccionar las células que se van a utilizar en el ensayo. La norma recomienda el uso de células relevantes para el uso previsto del material.
3. Preparación del material: El material se prepara para su uso en el ensayo. La norma establece requisitos específicos para la preparación del material, incluyendo la concentración, la forma en que se aplica y el tiempo de incubación.
4. Evaluación de la viabilidad celular: Las células se exponen al material y se evalúa su viabilidad a través de diferentes técnicas, como la detección de la actividad de enzimas específicas o la evaluación de la permeabilidad celular.
5. Análisis de los resultados: Se analizan los resultados de la evaluación de la viabilidad celular y se determina si el material es tóxico o no. La norma establece requisitos para la interpretación de los resultados.
6. Informe final: Se prepara un informe final que incluye la descripción detallada del ensayo, los resultados y la interpretación de los mismos.

## Evaluación de la Biocompatibilidad

La finalidad de las matrices descelularizadas es ser implantadas, por lo tanto, deben ser biocompatibles para evitar reacciones de histocompatibilidad negativa dentro del organismo. Para ello se realizó el ensayo de citotoxicidad *in vitro* recomendado por la ISO 10993 - Biological Evaluation of medical devices (2018) Parte 5 [43].

### Obtención de los extractos

Los ensayos propuestos por la parte 5 de la Norma fueron realizados a partir de extractos derivados de las matrices descelularizadas y controles, ambas desinfectadas. Los extractos fueron obtenidos de acuerdo a lo recomendado por la Parte 12 de la Norma ISO 10993 [37]. Brevemente, las matrices estériles se cortaron en piezas de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> y se las sumergió en 1 ml de medio de cultivo celular DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1% antibióticos y 1% de glutamina dentro de un tubo Eppendorf. Se mantuvo en agitación constante a 37°C durante 72 h. Estos extractos se usaron

inmediatamente luego de su correcta preparación para evitar contaminaciones, cambios en la composición u homogeneidad. El pH del extracto no fue modificado para ser apto en cultivo celular.

### Ensayo de viabilidad celular

Se utilizó la línea celular Vero CCL81. La misma se cultivó en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 4 mM de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4 mM de Piruvato de Sodio (Sigma, St Louis, USA) y 10.000 unidades/mL de penicilina-10.000  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomina, a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 3 días.

Se evaluó la citotoxicidad de los andamios descelularizados y no descelularizados, mediante ensayo colorimétrico de MTT que permite valorar la viabilidad y cuantificar la proliferación celular. El ensayo se realizó de acuerdo a lo recomendado por la norma ISO 10993:5 [43], utilizando diferentes extractos de las muestras según la norma ISO 10993-124. Condiciones de extracción: 1,25 cm<sup>2</sup> de cada tipo de aloinjerto/ml de DMEM se incubaron a 37°C durante 72 horas. A continuación, se obtuvieron los extractos al 100% después de la adición de SFB (10% v/v). Adicionalmente, se prepararon extractos al 25, 50 y 75% por dilución en DMEM suplementado. Las células se sembraron en pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo y se cultivaron en las condiciones descritas arriba por 24 horas. Luego, el medio fue retirado y se agregó 50  $\mu\text{l}$  de cada extracto a los respectivos pocillos. Después de 24 horas se retiraron los extractos y se lavaron las células con buffer fosfato salino. Por último, se adicionó 50  $\mu\text{l}$  de MTT (1 mg/ml) a cada pocillo y luego de 90 minutos los cristales de formazán formados se disolvieron en alcohol isopropílico y la absorbancia se cuantificó a 595 nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Como control negativo de citotoxicidad se utilizó polietileno de alta densidad (PEHD 30 micrones, condiciones de extracción: 6 cm<sup>2</sup>/ml de DMEM) y como control positivo una solución de fenol al 0,2% en buffer fosfato salino. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

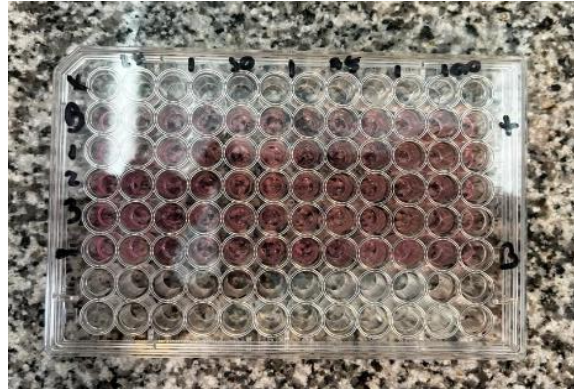


Figura 15: Placa de cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de extractos.

### Análisis estadístico

Todos los resultados se representan como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba t de Student o ANOVA de una vía según el caso. Cuando el ANOVA indicó efectos significativos, se llevó a cabo un análisis a posteriori entre las medias individuales de Bonferroni con el software *GraphPadPrism*. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado una diferencia significativa.

## RESULTADOS

### Protocolo de Descelularización

Los protocolos propuestos en este trabajo mostraron diferencias en la calidad de las hojitas descelularizadas obtenidas en cuanto a la integridad y maleabilidad del parénquima foliar luego del uso de las diferentes concentraciones de detergente y/o del hipoclorito de sodio. Los protocolos 1 y 2 difieren solamente en la variedad estacional de la hoja y ambos fueron usados para los ensayos mecánicos a fin de posibilitar el uso de las hojas en cualquier época del año. Los protocolos 3 y 4 fueron descartados para los ensayos mecánicos y bioquímicos porque los resultados fueron muy similares al protocolo 2 y 5 respectivamente (datos no mostrados). Finalmente, el protocolo 5 con una concentración de 1% de SDS mostró una mejor manipulación de las hojas para los ensayos de tracción y reométricos así también como en los estudios del comportamiento biológico.

La siguiente figura (Fig. 16) muestra el resultado del proceso de descelularización según el protocolo 5 a lo largo de 4 días. Desde el tiempo 0, donde se observa macroscópicamente el aspecto y coloración normal de una hoja *baby* de espinaca hasta la decoloración final al cabo de 4 días. En el día final de descelularización se puede observar un andamio de aspecto completamente traslúcido con la integridad y el tamaño foliar conservado.



**Figura 16: Etapas del proceso de descelularización. a: Antes de iniciar; b, c, d y e: etapas intermedias del protocolo con decoloración parcial y árbol vascular conservado; f: El proceso finalizado.**

## Análisis Histológico

Las siguientes imágenes muestran una hoja control, sin descelularizar, y una descelularizada luego del protocolo 5. El protocolo de descelularización desarrollado en este trabajo logró obtener una matriz foliar completamente descelularizada con las nervaduras donde se distingue su integridad y transparencia. Además, pudieron observarse los pequeños estomas conservados sobre la superficie de las hojas (Fig. 17).



Figura 17: Micrografía Óptica de hoja descelularizada donde se notan claras las esporas de la hoja. (aumento 40x).



Figura 18: Micrografías de hoja de espinaca A) sin descelularizar y B) andamio descelularizado (10x).

### Microscopía Óptica:

La microscopía óptica mostró la ausencia completa de restos celulares en las matrices descelularizadas analizadas. En la Figura 19A y C se puede observar la presencia de células en el parénquima foliar con sus núcleos, asimismo también se observa el sistema de conducción (xilema y floema) de las nervaduras. La Fig. 19B y D muestra los cortes sagitales y transversales de un andamio descelularizado con la ausencia total de núcleos y citoplasma celulares así también la integridad anatómica conservada tanto en el parénquima como en el sistema vascular, importante para su uso futuro como vehículo para la recelularización con estirpes celulares apropiadas (Ver Anexo).

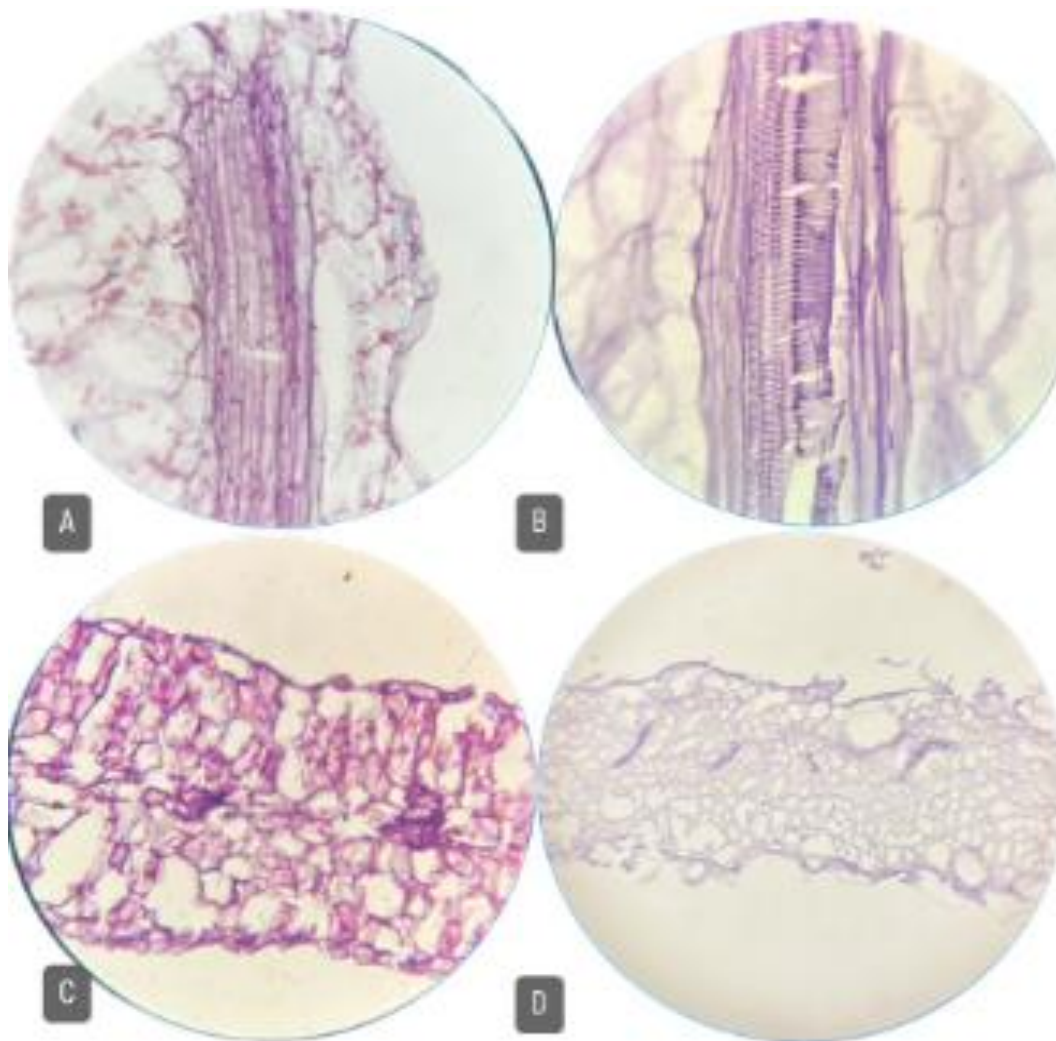


Figura 19: Micrografías de la sección sagital de una hoja de espinaca con tinción HE (A) de una hoja control y (B) de una hoja decelularizada del protocolo 3 (40x). Micrografías de la sección transversal de una hoja de espinaca con tinción HE (C) de una h hoja control y (D) de una hoja decelularizada del protocolo 3(10x).

## Análisis en Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Con la microscopía electrónica de barrido se observó a distintos aumentos, una preservación correcta de la ultraarquitectura foliar luego del protocolo de descelularización desarrollado, comparada a las muestras control (Fig. 20 A y C) indicando que el proceso de descelularización no afectó las propiedades topográficas de la superficie de la hoja.

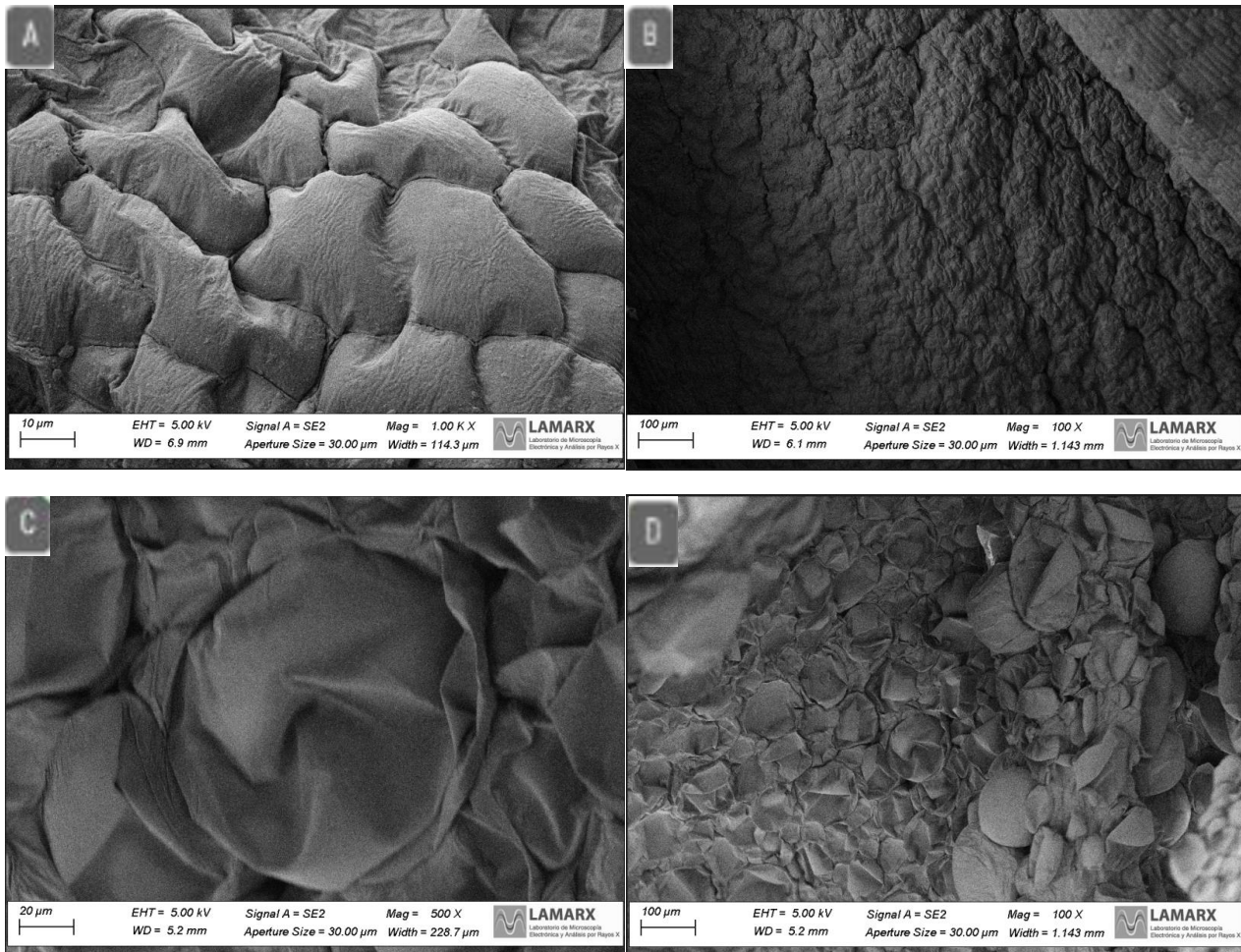


Figura 20: Micrografías electrónicas de hoja control 1000x (A), 100x (B), y hoja decelularizada 500x(C) y 100x (D).



## Ensayo de Tracción

Los andamios de los protocolos 1, 2 y 5 fueron utilizados para los ensayos de tracción.

En la Fig. 21 se observan los resultados de los ensayos realizados sobre hojas descelularizada por el protocolo 1. En el gráfico podemos visualizar una gran dispersión de las tensiones aplicadas en cada muestra, si bien una de las muestras soportó tensiones altas, este comportamiento no vuelve a aparecer en las siguientes muestras que indicaría una variabilidad entre los andamios obtenidos.

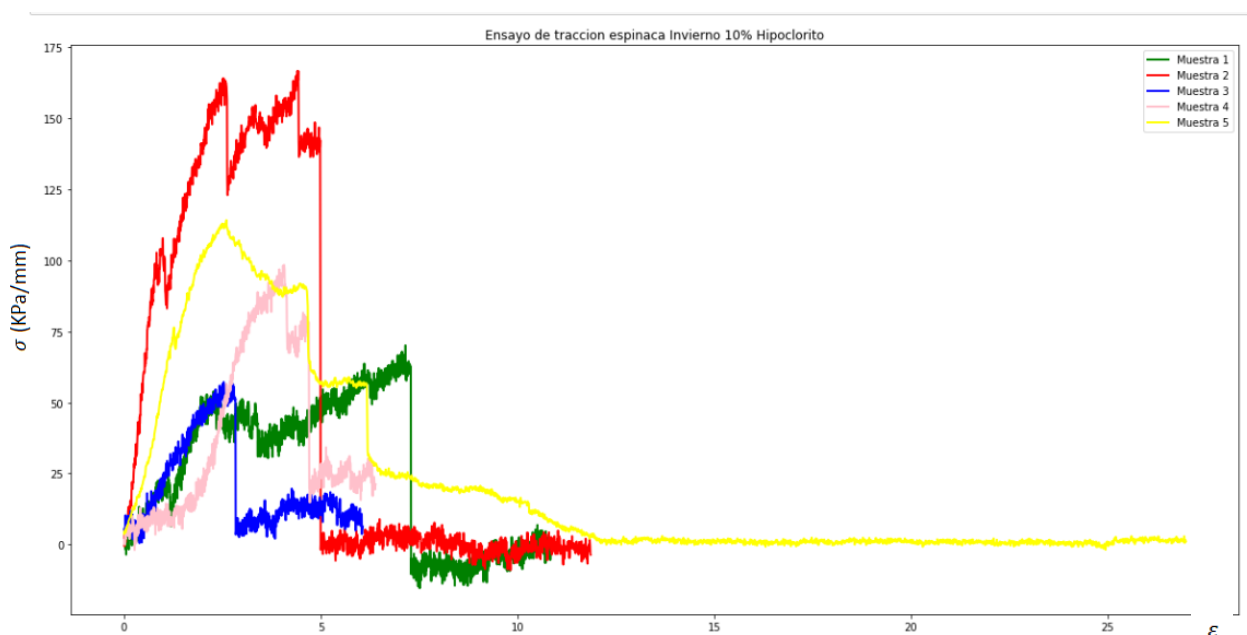


Figura 21: Ensayo de tracción sobre las hojas del protocolo 1, donde en el eje de las abscisas deformación unitaria de la muestra, y en el eje de las ordenadas tenemos el esfuerzo de tensión sobre las muestras.

La Fig. 22 muestra la curva representativa de tensión-deformación sobre hojas del protocolo 2 de descelularización. El gráfico muestra andamios más resistentes que los del protocolo 1, sin embargo con una elasticidad mucho menor.

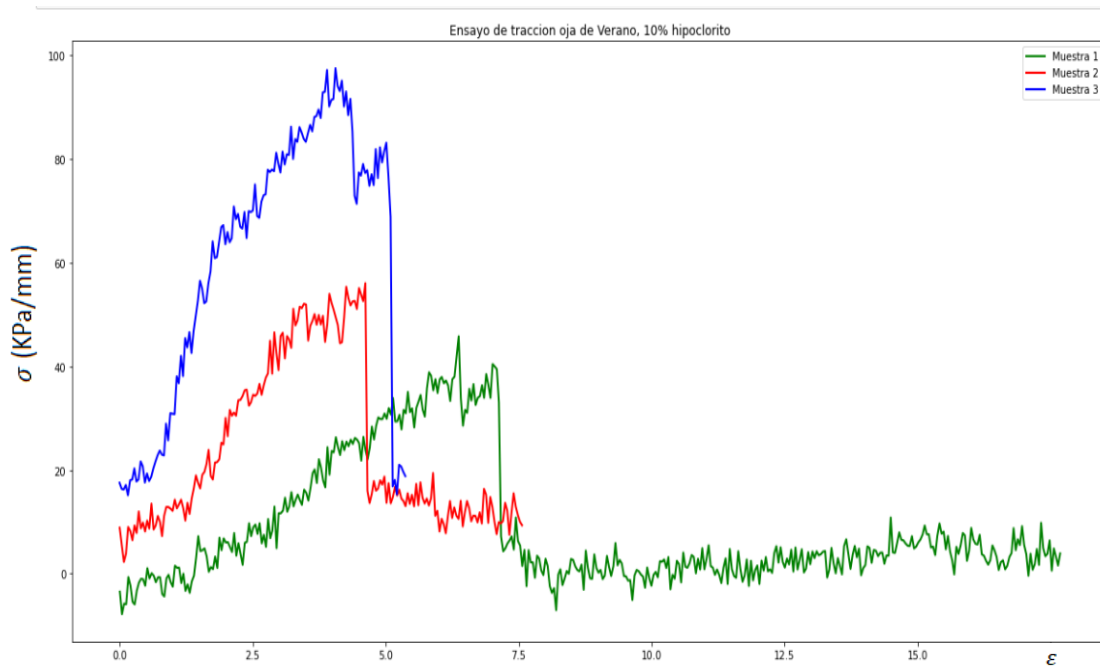


Figura 22: Ensayo de tracción sobre las hojas del protocolo 2.

En la Fig. 23 a partir de andamios obtenidos por el protocolo 5, debido a la mejor conservación de la integridad del andamio, las tensiones calculadas fueron altas, lo que implicaría una menor elasticidad y mayor rigidez.

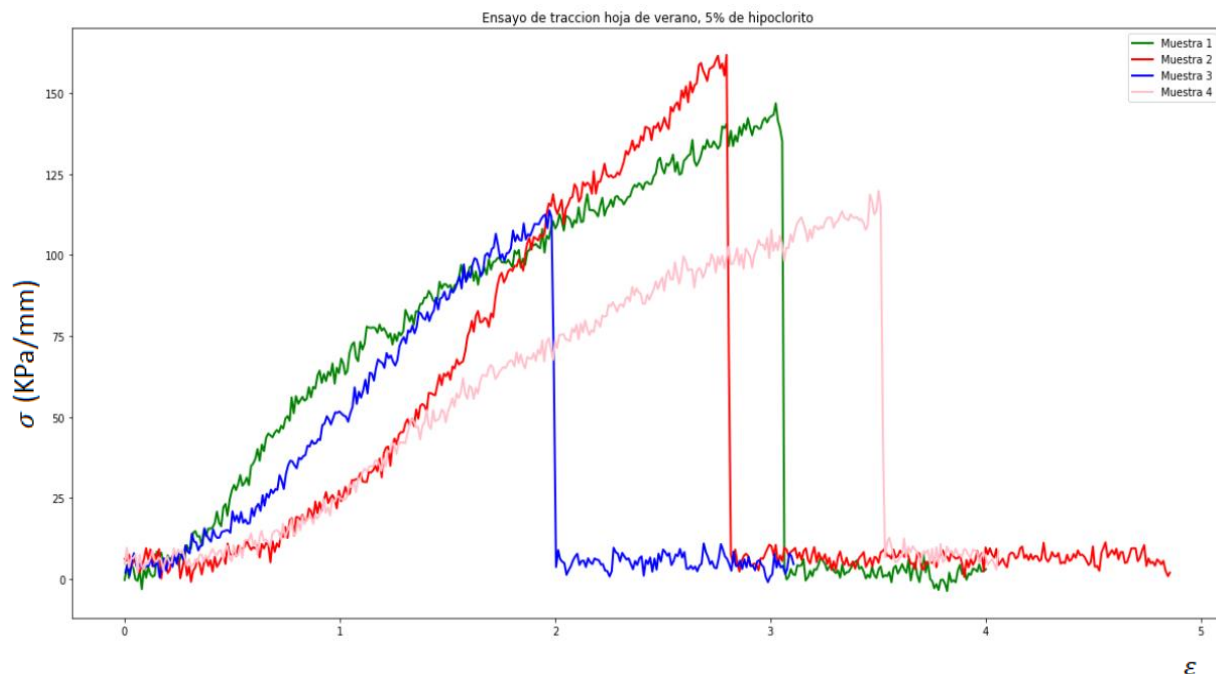


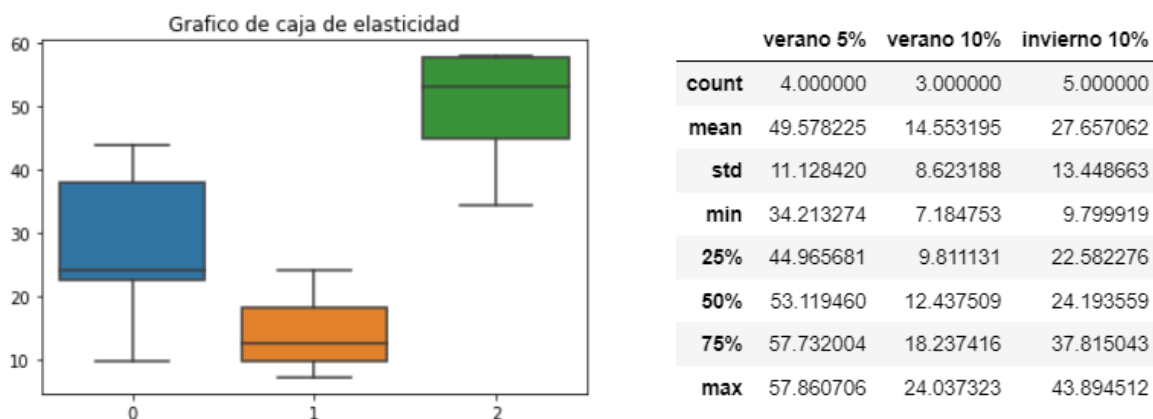
Figura 23: Ensayo de tracción sobre las hojas del protocolo 5.

En función de las curvas de tensión-deformación, se calcularon los módulos de Young en los 3 protocolos empleados. El módulo de Young, es la relación entre tensión calculada, y la

deformación unitaria. Esto implica que mientras mayor es este módulo, más grande es la fuerza que debe aplicarse a la muestra para lograr una deformación longitudinal, entonces la elasticidad es menor. Análogamente, si el modulo es de un valor bajo, esto implica que la muestra es más elástica. A partir del análisis de los gráficos de caja obtenidos mediante un código realizado en lenguaje Python (Fig. 24). En las hojas del protocolo 1 observamos una mediana asimétrica, lo que significa que los datos están sesgados y la mitad de estos se encuentra con una elasticidad inferior a 24 KPa-. Esto se debe a que estas muestras presentan valores poco constantes y tenemos una diferencia considerable entre cada muestra.

A continuación, analizamos el protocolo 2 donde notamos valores más bajos de modulo, como también presentaba valores bajos de deformación longitudinal inferimos que se trata de una muestra con poca elasticidad y poca rigidez, lo cual demuestra propiedades físicas poco aceptables para un andamio.

Por último, en los datos analizados de las hojas del protocolo 5 vemos que la mediana se encuentra en un valor de 53 KPa, lo cual es más del doble que los otros protocolos. Este dato sumado a que las muestras se deformaron una distancia considerable, podemos afirmar que las muestras de este protocolo presentan mayor rigidez y permiten la manipulación necesaria para



**Figura 24: Gráfico de cajas del módulo de Young de los protocolos analizados, con la tabla de los valores estadísticos expuestos, realizados con Python.**

ser utilizadas como andamios. Por último, los datos tomados muestran simetría y consistencia como mencionamos anteriormente

La Fig. 25 muestra los valores de los módulos de Young para los andamios a partir de los 3 protocolos ensayados. Un ANOVA de una vía muestra un valor de la elasticidad de 53,1 KPa para el andamio obtenido por el Protocolo 5 significativamente mayor ( $p < 0,2740$ ) respecto de los valores obtenidos con el Protocolo 1 (24,1 KPa) y con el Protocolo 2 (12,4 KPa.).

Los valores del Módulo de Young calculados para las muestras de los diferentes protocolos según lo descrito en Materiales y Métodos se presentan en la Figura 17. Un ANOVA de una vía revela un efecto significativo de los diferentes protocolos de descelerización utilizados sobre el módulo de elasticidad en los andamios foliares

obtenidos ( $F(2,12) = 15,11, p < 0,0005$ ). La prueba de Bonferroni mostró que las diferentes combinaciones de concentración de detergente y de hipoclorito de sodio modificaron la elasticidad significativamente luego del protocolo 1 ( $p < 0,05$ ) y protocolo 2 ( $p < 0,001$ ) respecto de las matrices obtenidas por protocolo 5. No se observaron diferencias significativas en el Módulo de Young entre los andamios obtenidos después del protocolo 1 y del protocolo 2.

Los protocolos 1 y 2 mostraron un módulo de Young significativamente menor que el protocolo elegido para los ensayos, lo que sugeriría que se obtuvieron andamios que resisten a fuerzas de tensión bajas, que indicaría que la hoja descelularizada queda débil y difícil de manipular para ser utilizada como andamio. El Protocolo 5 mostró un andamio, donde mejoraron las propiedades físicas de tensión y de elasticidad mejorando la manipulación del mismo.

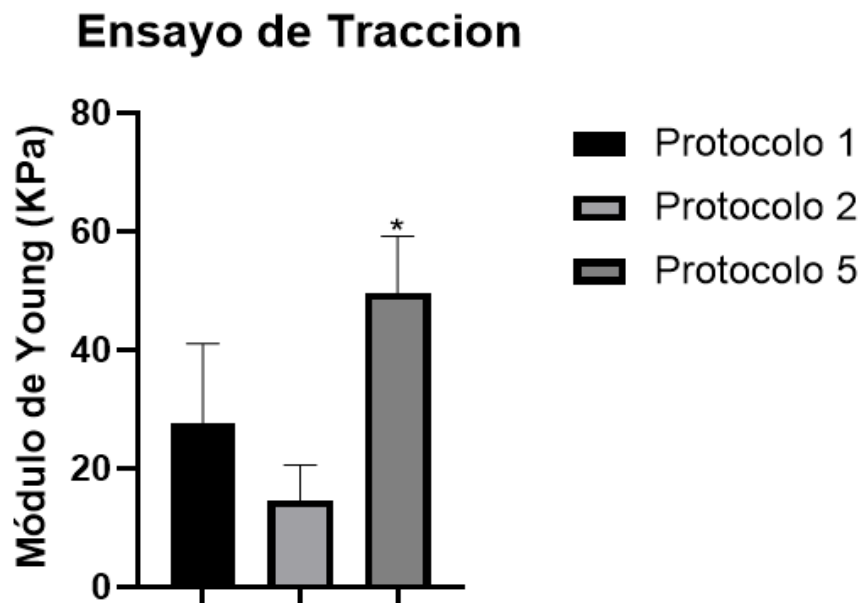


Figura 25: Módulo de Elasticidad de hojas descelularizadas de acuerdo a los diferentes protocolos empleados (n=4. \*p < 0,0005), (ANOVA de una vía).

## Ensayos de Reometría

### Barrido de Amplitud

Por medio del ensayo reológico se obtuvieron los rangos elásticos y viscoso de las muestras de los andamios obtenidos de los protocolos 1,2,3,4, y 5. Comenzamos realizando un barrido de amplitud para todas las muestras con un  $n=2$ , de aquí sacamos el rango de amplitud en el cual las muestras son elásticas. Con esta información, buscamos la amplitud en el cual todas las muestras son elásticas para luego realizar un barrido de frecuencia utilizando esta amplitud, con el fin de ver el comportamiento de los andamios para luego poder evaluar cómo va cambiando la estructura y clasificarla en viscosa, viscoelástico sólido, viscoelástico líquido y elásticos.

En la Figura 26 tenemos en el eje de las abscisas los valores de ángulo de deformación realizados sobre las muestras, y en el eje de las ordenadas la presión realizada por la muestra para volver a su forma inicial. Luego también tenemos en estos gráficos, dos líneas trazadas por ensayo, una llamada  $G'$  o módulo de almacenamiento (si está por encima de  $G''$  indica que la muestra se comporta como un sólido) lo cual está marcada con cuadrados, y otra  $G''$  o energía que se disipa (si está por encima de  $G'$  indica que la muestra se comporta como un líquido) y esta demarcada con triángulos. Cuando  $G' > G''$  se puede inferir que la muestra se trata de una estructura resistente, tridimensional y de tipo gel o sólido, cuanto mayor sea el ángulo en el cual son paralelas  $G'$  y  $G''$  mayor elasticidad tiene la muestra. Entonces, en las figuras mencionadas,  $G'$  y  $G''$  se encuentran de la misma forma, lo cual coincide con el hecho de que estamos estudiando muestras tridimensionales que son sólidos. Y por último, todas son elásticos en el ángulo 0,1 rad, por lo que se decide realizar el barrido de frecuencia con este ángulo. Cuando  $G'$  disminuye, significa que la estructura se rompe, lo cual indica que la muestra se deforma de forma permanente y que no se encuentra más en el rango elástico.

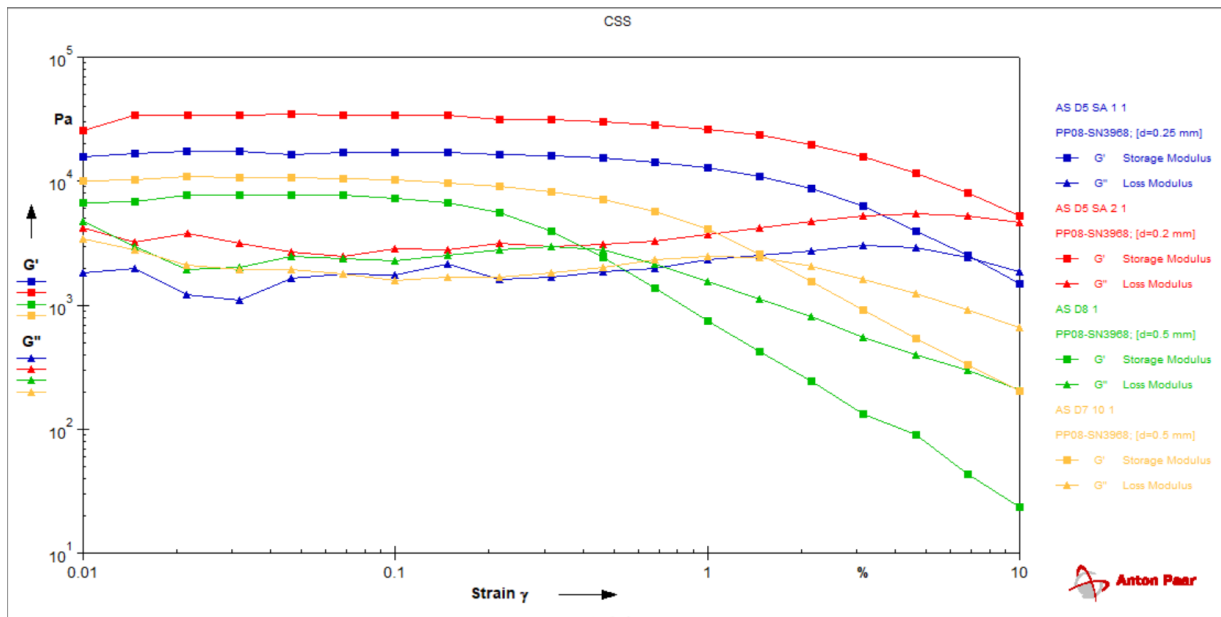


Figura 26: Graficos del promedio de los ensayos de cada muestra. Curva roja representa el protocolo 2, curva azul representa protocolo 3, curva amarilla representa protocolo 4 y curva verde representa protocolo 5.

## Barrido de Frecuencia

Luego para el barrido de frecuencia, se eligió una frecuencia angular de 0,1rad y 10 Hz. Aquí tenemos en el eje de las abscisas la frecuencia aplicada a la muestra, mientras que en el eje de las ordenadas tenemos la presión que ejerce la muestra al movimiento aplicado. También tenemos graficado el componente  $G'$  y  $G''$  para cada muestra.

En este ensayo, cuando  $G' > G''$  y estas se mantienen paralelas, es un indicador de que hay un desfase entre  $0-45^\circ$ , lo cual indica que el andamio es un material viscoelástico sólido (tiene más condición de sólido elástico que de líquido).

Por último, en la Figura 27 vemos como varía significativamente los valores tomados en el barrido de frecuencia debido al cambio de la elasticidad por el cambio de los parámetros en el protocolo de descelularización.

Siendo estos valores directamente proporcionales al aumento y disminución del porcentaje de hipoclorito implementado, su tiempo de exposición y si la hoja es de invierno o verano.

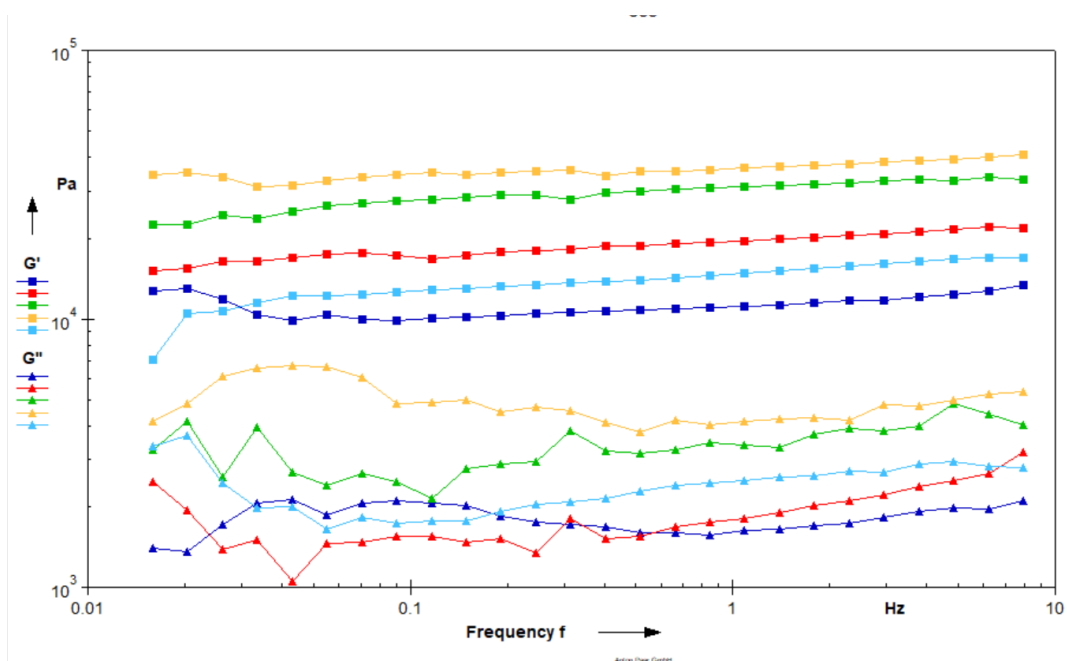


Figura 27: Protocolo 1 (amarillo), protocolo2 (verde), protocolo 3 (rojo), protocolo 4 (celeste), protocolo 8 (azul)

En los resultados de las hojas del protocolo de decelularización elegido (5), notamos valores de módulo de almacenamiento y módulo de pérdida más bajos en comparación con los valores obtenidos de las hojas que pasaron por un protocolo muy abrasivo, esto a la vez significa que el módulo de corte de las hojas del protocolo 5 es menor al módulo de corte de las hojas de los otros protocolos. El módulo de corte, también conocido como la resistencia a la deformación o relación esfuerzo/deformación, nos indica que las hojas que se encuentran más enteras, y con una estructura más rígida, tienen menos tolerancia a deformaciones, son hojas que tienen menos elasticidad que las que son tratadas con un hipoclorito más concentrado.

## Cuantificación de SDS

Obtener un andamio acelular con la menor cantidad de SDS residual, puede ser un factor determinante para la recelularización y la adherencia y proliferación celular posterior. La Figura 28 muestra la cantidad de SDS residual en los *scaffolds* luego del protocolo de descelularización utilizado. Las matrices exhibieron un contenido, al finalizar el procedimiento de descelularización, de  $0,0005 \pm 0,001$  % P/V en comparación con la concentración al inicio del mismo proceso, que fue del 1 % P/V. Estos valores obtenidos brindaron la evidencia de que los sucesivos lavados implementados llevaron a una eliminación prácticamente total del detergente, esencial para evitar una futura interacción negativa en el proceso de recelularización posterior. El Test de Student reveló una diferencia significativa entre el principio del ensayo con la concentración final obtenida, luego del protocolo ensayado con un  $p < 0,0001$  y un  $t=157,0$ .

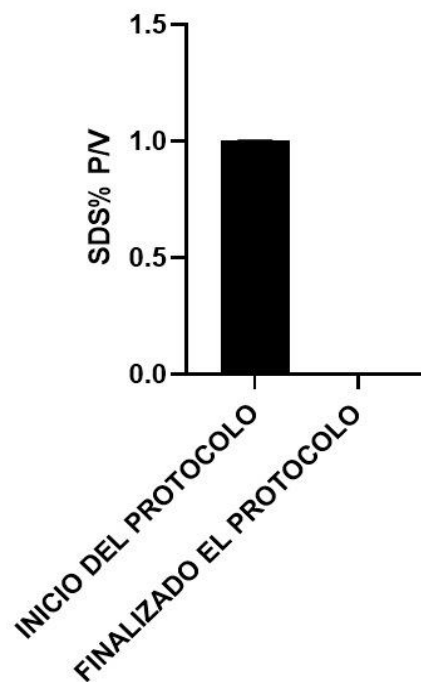


Figura 28: Gráfico de concentración de SDS inicial de las hojas y final.  $n=3$  \*  $p < 0,0001$   $t=157,0$  (Test de Student) .



## Cuantificación de ADN

El contenido de ADN remanente es indispensable para evitar una reacción de histoincompatibilidad en el proceso de recelularización posterior, el cual está establecido en bibliografía en una cantidad menor a 50 ng / mg de tejido). Un test de Student reveló una disminución significativa ( $t=4,943$ ,  $p < 0,001$ ) (de ADN entre los andamios descelularizados ( $35,58 \pm 10,06$  ng de ADN/mg de tejido) y las hojas nativas ( $237,94 \pm 90,99$  ng de ADN/mg de tejido). (Fig. 29).

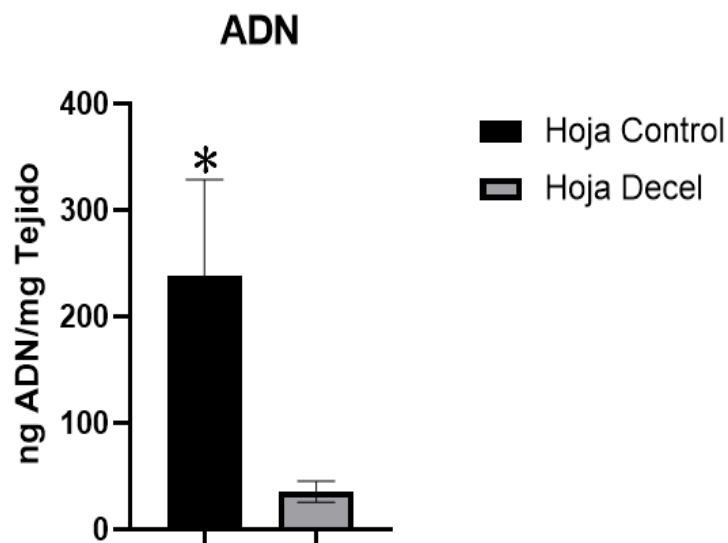


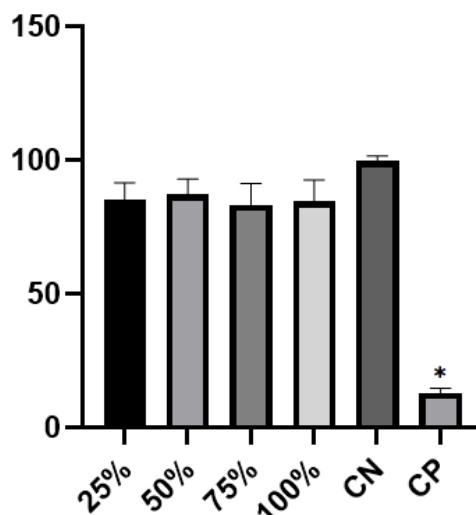
Figura 29: Cuantificación de ADN de hoja control y andamio descelularizado. (n= 5, \*p= 0,001).

## Ensayo de citotoxicidad

La ausencia de citotoxicidad del andamio resultante luego de la descelularización es indispensable para poder considerarse como un andamio seguro para la resiembra con las diferentes estirpes celulares que deberán adherirse y proliferar sobre los *scaffolds* obtenidos.

En la Fig. 30, un ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del andamio control sobre la viabilidad celular ( $F(5, 48) = 251,9, p < 0,001$ ). El test de comparaciones múltiples *a posteriori* de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los diferentes extractos preparados y el control positivo ( $p < 0,001$ ). Además, todos los valores de las diferentes concentraciones de los extractos fueron superiores al 70% recomendado por la Norma ISO 10993:5 [37].

### Citotoxicidad Hoja Control



**Figura 30: Hoja control. Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM.  $n = 3$ . \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$  (Test de bonferroni).**

Una ANOVA de una vía para el efecto de la descelularización en el protocolo 4 reveló un efecto significativo del andamio control sobre la viabilidad celular ( $F(5, 48) = 237,6, p < 0,001$ ). El test de comparaciones *a posteriori* de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los diferentes extractos preparados y el control positivo ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, el valor del extracto 100% fue menor al 70% lo que estaría indicando que en el procedimiento de descelularización pudo haber quedado algún resto de algunos de los agentes descelularizantes que puede estar provocando un efecto citotóxico o también que el proceso de lavado no fue muy eficiente pudiendo quedar algún remanente de SDS. Los extractos más diluidos no mostraron citotoxicidad según lo recomendado por la ISO 10993:5 [37].

### Citotoxicidad Protocolo 4

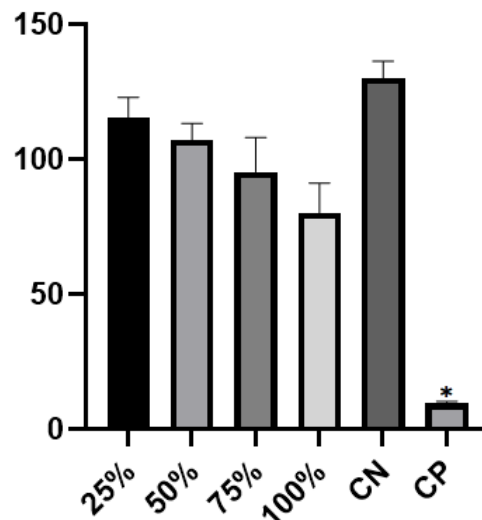


Figura 31: Protocolo 4. Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética ± ESM. n= 3. \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$  (Test de bonferroni).

Una ANOVA de una vía de los andamios obtenidos a partir del protocolo 5 de descelerización mostró un efecto significativo sobre la viabilidad celular ( $F(5, 48) = 393.1$   $p < 0,0001$ ). El test *a posteriori* de Bonferroni reveló una viabilidad significativamente mayor en todas las concentraciones de extractos preparadas a partir de los andamios del protocolo 5 ( $p < 0,001$ ) respecto del control positivo. Estos resultados nos sugieren que el andamio obtenido carece de citotoxicidad bajo las condiciones ensayadas.

### Citotoxicidad Protocolo 5

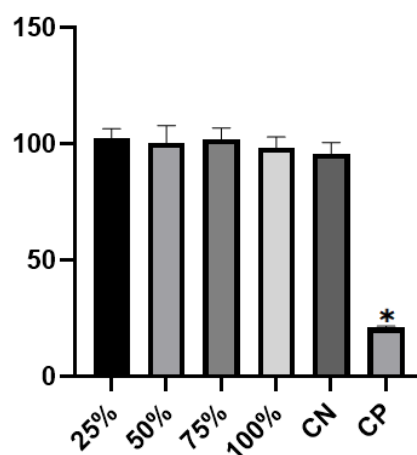


Figura 32: Protocolo 5. Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética ± ESM. n= 3. \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$  (Test de bonferroni).

## DISCUSIÓN

La descelularización es una metodología desarrollada cuyo objetivo final es la eliminación celular completa de un tejido sin afectar negativamente la composición, la actividad biológica o la integridad mecánica del resto de la matriz tridimensional. Su finalidad es obtener matrices acelulares como un andamio de origen natural para la potencial repoblación de diferentes estirpes celulares [44]. Las técnicas y los tiempos de procedimiento descriptos en la literatura son disímiles y la optimización de una metodología simple, sencilla y a tiempos cortos se constituyó en nuestro objetivo principal. El protocolo de descelularización desarrollado en este trabajo permitió obtener un andamio tridimensional descelularizado a partir de hojas de espinaca con características mecánicas, histológicas y con un comportamiento biológico compatible para ser recelularizado posteriormente.

El uso de andamios de origen vegetal surge ante la posibilidad de desarrollar estructuras con una microarquitectura 3D conservada, una red vascular preservada y con propiedades mecánicas que simulen las de un tejido animal que pueda ser utilizado como plataforma para la integración tisular sin incompatibilidades histoquímicas indeseadas. En función a esto, nos propusimos optimizar las concentraciones de los agentes químicos descelularizantes para obtener un andamio con propiedades mecánicas y reométricas óptimas para la resiembra con células madre mesenquimales. Varios estudios han comenzado a utilizar andamios vegetales descelularizados para proporcionar soporte estructural y biomecánico para la recelularización con células de mamíferos, allanando así el camino para el uso de material vegetal para generar injertos de tejido ya vascularizados [14][37][42]. Esta experiencia se basa en la utilización de varios métodos potenciales de descelularización del material vegetal, incluidos químicos como soluciones hipo/hipertónicas, detergentes, disolventes; físicos (por ej. congelación/descongelación, agitación mecánica o enzimáticos como tripsina y nucleasas) [14][37][42]. Sin embargo, las plantas son organismos muy resistentes, presentan una cubierta de ceras en la superficie de los órganos foliares que le permite soportar la exposición a múltiples cambios ambientales, como el viento, la lluvia o el sol evitando principalmente la pérdida de agua para mantener la tonicidad, por lo tanto, requieren un procesamiento más drástico que los tejidos animales más sensibles. De este modo, se optó por un tratamiento químico previo con un solvente orgánico, el n-hexano, que eliminó por completo la cutícula foliar volviéndola permeable al detergente. Este paso previo fue fundamental porque se evitó el uso de otros agentes químicos o mayores concentraciones de detergentes que pudieran

dañar la arquitectura de la hoja, degradar las proteínas o dejar residuos tóxicos en el andamio.

El tratamiento químico con el detergente iónico SDS al 1 % (protocolo 5) y 10% (protocolo 1-4) fueron adecuadas para solubilizar las membranas celulares y nucleares y desnaturalizar las proteínas citoplásmicas sin afectar la pared celular (Figura 16). Los análisis histológicos mostraron la completa remoción del contenido celular y la correcta preservación del árbol vascular (Fig. 18 y 19). Estos resultados indican que una concentración de 1 % de SDS con agitación constante durante 3 días fue suficiente para lograr una descelerización completa de la hoja de espinaca entera. Además, el uso de un único detergente permitió la eliminación del contenido celular sin afectar el tejido foliar. Esto es de vital importancia ya que la mayoría de los autores utilizan 10% de SDS y la presencia de otros detergentes no iónicos para la remoción citoplásmica [14][47][46]. Es conocido que la presencia de detergentes no iónicos puede dejar residuos en los tejidos al no ser completamente diluido en agua a tiempos cortos necesitando mayor tiempo de enjuague de las muestras o el agregado de otro tipo de solvente para su eliminación completa. La presencia de SDS residual no posibilitaría la existencia de un andamio biocompatible, es decir, que el ingreso de nuevas estirpes celulares en la etapa de recelularización podría presentar algún tipo reacción de histocompatibilidad negativa en el huésped por lo que su eliminación marca un punto importante para la resiembra posterior. La Fig. 28 muestra la cantidad de SDS residual (0,0005%) luego de los lavados lo que nos estaría indicando una ventaja sustancial en el uso de este surfactante acuoso y fácilmente descartado del sistema tras sucesivos lavados.

El material nuclear residual dentro del *scaffold* puede contribuir a problemas de citocompatibilidad e incluso generar respuestas adversas del huésped tras la repoblación celular. Aunque las técnicas de descelerización no pueden eliminar el 100% del material celular, la bibliografía reporta que la cantidad de ADN remanente no puede exceder los 50 ng/mg de tejido seco [39]. La Fig. 27 muestra que el contenido de ADN residual luego de la descelerización fue de  $35,58 \pm 10,06$  ng de ADN/mg de tejido seco indicando que el proceso de lavado exhaustivo y los procedimientos químicos empleados lograron remover la mayor parte del contenido nuclear. Estos resultados corroborarían la falta de presencia de núcleos observada histológicamente por las diferentes microscopías ópticas (Fig. 19B y D).

Además, la reducción en la concentración de hipoclorito de sodio facilitó la obtención de andamios con características mecánicas más favorables para la manipulación de los andamios previo a la resiembra celular. Las mayores concentraciones de NaClO debilitaron las hojas otorgándoles más elasticidad, pero también presentando deformaciones

permanentes con la aplicación de fuerzas pequeñas. En el protocolo 5 se logró una concentración adecuada en el que se mantuvieron las propiedades elásticas y la integridad del parénquima foliar. En las pruebas mecánicas de tracción mediante la aplicación de una fuerza uniaxial, las matrices descelularizadas mostraron un comportamiento característico según la concentración de agentes químicos utilizados según se observa en las curvas de tensión-deformación (Fig. 23). Los valores del módulo de Young para los diferentes tratamientos (Fig. 25) revelaron un comportamiento diferente en la elasticidad dependiendo del protocolo de descelularización empleado. El SDS 10% ejerció una disminución significativa en las propiedades mecánicas respecto de las matrices con SDS 1% y con 5% de NaClO, indicando una menor rigidez, la cual podría estar correspondiendo a cambios químicos provocados por la mayor concentración de ambos agentes con la superficie de la membrana acelular. Las tensiones registradas en los andamios obtenidos fueron del orden de las descritas en bibliografía para andamios de corazón humano [14][47], lo cual sugeriría que podrían utilizarse como plataformas naturales para repoblar con células cardíacas para su uso en medicina regenerativa. Los estudios reológicos de las matrices descelularizadas obtenidas van en concordancia con los ensayos de tracción indicando propiedades biomecánicas que lo hacen favorable para el uso en reemplazo de andamios cardíacos.

Los diferentes estudios llevados a cabo en este trabajo muestran que los andamios desarrollados poseen comportamientos biomecánicos excelentes, no contienen detergentes residuales y el contenido de ADN remanente está por debajo de lo sugerido para no producir reacciones de histoincompatibilidad. Así es que como paso final nos propusimos evaluar la citobiocompatibilidad de las matrices en el ensayo de citotoxicidad recomendado por la norma ISO 10993:5. Los resultados observados en la Fig. 32 demostraron que los andamios no presentaron citotoxicidad bajo las condiciones ensayadas y que la viabilidad celular fue superior al 70%. Los valores de viabilidad celular encontrados no presentaron diferencias significativas con el control negativo por lo que dichos andamios podría ser utilizado como *scaffolds* para un proceso de recelularización posterior.

## CONCLUSIÓN

Como conclusión, se obtuvieron andamios a partir de hojas de espinaca por diversos protocolos de descelularización. El protocolo 5 demostró ser el más adecuado ya que se disminuyeron las concentraciones de agentes químicos en un plazo final de 4 días y los andamios obtenidos presentaron una microarquitectura conservada, libre de restos celulares, con un árbol vascular conservado y biocompatible.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

A continuación de este trabajo nos encontramos con el desafío de implantar células animales y humanas en dichos andamios, y poder cultivar y crecer tejidos sobre ellos, con la esperanza de que en un futuro se pueda realizar ensayos clínicos con parches de tejidos obtenidos con estas hojas de espinaca tan económicas y abundantes, y así colaborar con la problemática de la necesidad de órganos y tejidos para trasplantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] SINTRA, <https://www.argentina.gob.ar/salud/incuca>
- [2] National institutes of health (.gov), Usos de nanocelulosa para reparación de tejidos (Wei, Z., et al. *Cellulose* 28, 7497–7520 (2021).
- [3] M.C. Peters, P.J. Polverini, D.J. Mooney, Engineering vascular networks in porous polymer matrices, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 668e678.
- [4] H. Gerhardt, VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting, *Organogenesis* 4 (2008) 241e246.
- [5] J.T. Borenstein, H. Terai, K.R. King, E.J. Weinberg, M.R. Kaazempur-Mofrad, J.P. Vacanti, Microfabrication technology for vascularized tissue engineering, *Biomed. Microdevices* 4 (2002) 167e175, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016040212127>.
- [6] H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.-K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, et al., Perfusion decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart, *Nat. Med.* 14 (2008) 213e221, <http://dx.doi.org/10.1038/nm1684>.
- [7] J.R. Gershlak, J.I.N. Resnikoff, K.E. Sullivan, C. Williams, R.M. Wang, L.D. Black, Mesenchymal stem cells ability to generate traction stress in response to J.R. Gershlak et al. / *Biomaterials* 125 (2017) 13e22 21 substrate stiffness is modulated by the changing extracellular matrix composition of the heart during development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439 (2013) 161e166, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.074>.
- [8] J.P. Guyette, J. Charest, R.W. Mills, B. Jank, P.T. Moser, S.E. Gilpin, et al., Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix, *Circulation Res.* 118 (2015) 56e72, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306874>. CIRCRESAHA.115.306874.
- [9] J.J. Song, H.C. Ott, Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 424e432.
- [10] K.E. Sullivan, K.P. Quinn, K.M. Tang, I. Georgakoudi, L.D. Black III, Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res. Ther.* 5 (2014) 1e16, <http://dx.doi.org/10.1186/scrt403>.
- [11] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials* 27 (2006) 3675e3683, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>.
- [12] T.D. Johnson, R.C. Hill, M. Dzieciatkowska, V. Nigam, A. Behfar, K.L. Christman, et al., Quantification of decellularized human myocardial matrix: a comparison of si patients, *Proteomics Clin. Appl.* 10 (2016) 75e83, <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201500048>.
- [13] S.E. Gilpin, J.P. Guyette, G. Gonzalez, X. Ren, J.M. Asara, D.J. Mathisen, et al., Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale, *J. Heart Lung Transpl.* 33 (2014) 298e308, <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.030>.



- [14] Gershlak, J. R.; Hernandez, S.; Fontana, G.; Perreault, L. R.; Hansen, K. J.; Larson, S. A.; Binder, B. Y.; Dolivo, D. M.; Yang, T.; Dominko, T.; Rolle, M. W.; Weathers, P. J.; Medina-Bolivar, F.; Cramer, C. L.; Murphy, W. L.; Gaudette, G. R. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2017, 125, 13–22.
- [15] K.A. McCulloh, J.S. Sperry, F.R. Adler, Water transport in plants obeys Murray's law, *Nature* 421 (2003) 939e942, <http://dx.doi.org/10.1038/nature01444>.
- [16] C.D. Murray, The physiological principle of minimum work: I. the vascular system and the cost of blood volume, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 12 (1926) 207e214.
- [17] L.J. Gibson, The hierarchical structure and mechanics of plant materials, *J. R. Soc. Interface* 9 (2012), <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0341rsif20120341e2766>.
- [18] I. Levental, P.C. Georges, P.A. Janmey, Soft biological materials and their impact on cell function, *Soft Matter* 3 (2007) 299e306.
- [19] F.A. Pettolino, C. Walsh, G.B. Fincher, A. Bacic, Determining the polysaccharide composition of plant cell walls, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1590e1607, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.081>.
- [20] W.K. Czaja, D.J. Young, M. Kawecki, R.M. Brown, The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1e12, <http://dx.doi.org/10.1021/bm060620d>.
- [21] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, R.M. Brown, Microbial cellulose the natural power to heal wounds, *Biomaterials* 27 (2006) 145e151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>.
- [22] D.J. Modulevsky, C. Lefebvre, K. Haase, Z. Al-Rekabi, A.E. Pelling, Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture, *PLoS ONE* 9 (2014) e97835, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097835>.
- [23] D.J. Modulevsky, C.M. Cuerrier, A.E. Pelling, Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials, *PLoS ONE* 11 (2016) e0157894, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157894>.
- [24] F. Munarin, S.G. Guerreiro, M.A. Grellier, M.C. Tanzi, M.A. Barbosa, P. Petrini, et., Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering, *Biomacromolecules* 12 (2011) 568e577, <http://dx.doi.org/10.1021/bm101110x>.
- [25] L.M. Ferreira, C.S. Sobral, L. Blanes, M.Z. Ipolito, E.K. Horibe, Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 63 (2010) 865e869, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2009.01.086>.
- [26] Apóstolo, Nancy Mariel, Atlas de la anatomía vegetal / Nancy Mariel Apóstolo. -1a ed.- Luján: EdUnLu, 2021.

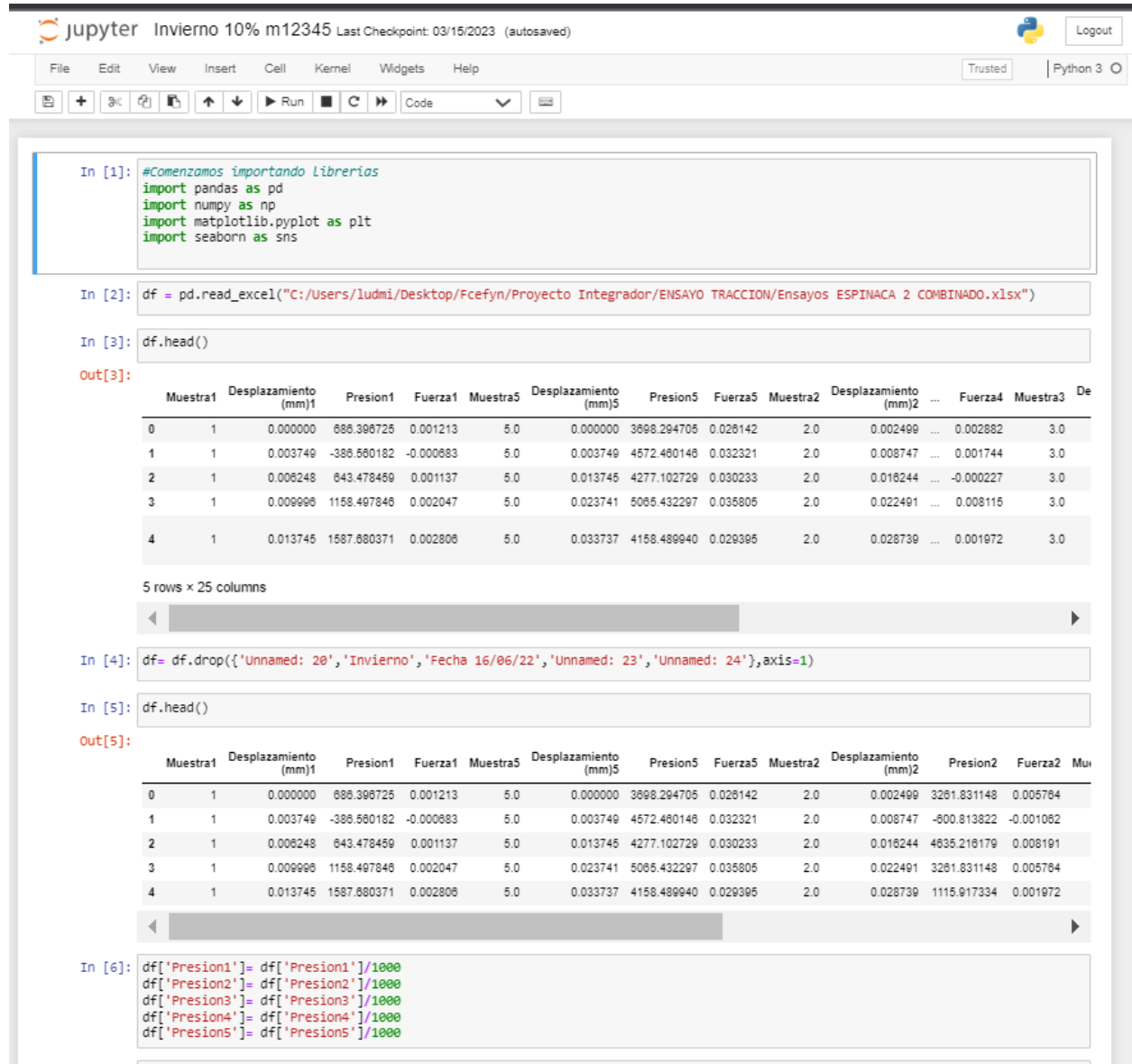
- [27] María Teresa Cosa, Gloria Bruno - Miriam Hadid - Laura Stiefkens - Iris Liscovsky - Ana Marisa Matesevach - Natalia Delbón. ARGENTINA ATLAS DE ANATOMÍA VEGETAL.TEJIDOS Y ÓRGANOS VEGETATIVOS, Cátedra de Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- [28] Ott, H. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. 14 (2), 213-221, (2008).
- [29] Modulevsky, D., Cuerrier, C., Pelling, A. Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials. *PLoS One*. 11 (6), e0157894, (2016).
- [30] Fontana, G. et al. Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture. *Advanced Healthcare Materials*. 6 (8), (2017).
- [31]Hoshiya, T. et al. Decellularized Extracellular Matrix as an In vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation. *Stem Cells International*. 2016, (2016).
- [32] Guyette, J. et al. Perfusion decellularization of whole organs. *Nature Protocols*. 9 (6), 1451-1468, (2014).
- [33] Modulevsky, D.J. et al. Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PLoS ONE*. 9 (5), p.e97835, (2014).
- [34]Adamski, M., Fontana, G., Gershlak, J.R., Gaudette, G.R., Le, H.D., Murphy, W.L. Two Methods for Decellularization of Plant Tissues for Tissue Engineering Applications. *J. Vis. Exp.* (135), e57586, doi:10.3791/57586 (2018).
- [35]Sindhu, K. A.; Prasanth, R.; Thakur, V. K. Medical Applications of Cellulose and its Derivatives: Present and Future. *Nanocellulose Polymer Nanocomposites 2014*, 437–477.
- [36]Asu Ceren Bilirgen, Melis Toker, Sedat Odabas, Ali Kemal Yetisen, Bora Garipcan, and Savas Tasoglu, “Plant-Based Scaffolds in Tissue Engineering”, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2021, 7, 3, 926-938, February 16, 2021 **DOI:** 10.1021/acsbomaterials.0c01527.
- [37] Lacombe, J.; Harris, A.F.; Zenhausern, R.; Karsunsky, S.; Zenhausern, F. Plant-Based Scaffolds Modify Cellular Response to Drug and Radiation Exposure Compared to Standard Cell Culture Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 932.
- [38] Contessi Negrini N, Toffoletto N, Farè S and Altomare L (2020) Plant Tissues as 3D Natural Scaffolds for Adipose, Bone and Tendon Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:723.doi: 10.3389/fbioe.2020.00723.
- [39]P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (2011) 3233e3243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.

- [40] J.P. Guyette, J. Charest, R.W. Mills, B. Jank, P.T. Moser, S.E. Gilpin, et al., Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix, *Circulation Res.* 118 (2015) 56e72, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306874>. CIRCRESAHA.115.306874.
- [41] Serkan Dikici , Frederik Claeyssens and Sheila MacNeil, “Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularization”. *Journal of Biomaterials Applications*, 2019, Vol. 34(4) 546–559! The Author(s) 2019.
- [42] Harris, A.F.; Lacombe, J.; Liyanage, S.; Han, M.Y.; Wallace, E.; Karsunky, S.; Abidi, N.; Zenhausem, F. Supercritical Carbon Dioxide Decellularization of Plant Material to Generate 3D Biocompatible Scaffolds. *Sci. Rep.* 2021, 11, 3643.
- [43] ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in Vitro Methods. 2009. URL <http://doi.acm.org/10.1145/2461466.2461522>.
- [44] M. Arand, T. Friedberg, and F. Oesch, “Colorimetric quantitation of trace amounts of sodium lauryl sulfate in the presence of nucleic acids and proteins,” *Anal. Biochem.*, vol. 207, no. 1, pp. 73–75, Nov. 1992.
- [45] S. F. Badylak, D. Taylor, and K. Uygun, “Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–53, Jul. 2011.
- [46] A. Salehi, M. Amin Mobarhan, J. Mohammadi, H. Shahsavarani, M. Ali Shokrgozar, A. Alipour, Efficient mineralization and osteogenic gene overexpression of mesenchymal stem cells on Decellularized spinach leaf scaffold, *Gene Gene* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144852>
- [47] Harris, A.F.; Lacombe, J.; Zenhausem, F. The Emerging Role of Decellularized Plant-Based Scaffolds as a New Biomaterial. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12347. <https://doi.org/10.3390/ijms222212347>
- [48] J. D. Bancroft and M. Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 2008.
- [49] R.K. Jain, P. Au, J. Tam, D.G. Duda, D. Fukumura, Engineering vascularized tissue, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 821e823, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0705-821>.

## ANEXO

### Código de análisis de tracción

#### Codigo para los ensayos sobre el protocolo 1



**In [1]:** #Comenzamos importando librerias  
import pandas as pd  
import numpy as np  
import matplotlib.pyplot as plt  
import seaborn as sns

**In [2]:** df = pd.read\_excel("C:/Users/ludmi/Desktop/Fcefyn/Proyecto Integrador/ENSAYO TRACCION/Ensayos ESPINACA 2 COMBINADO.xlsx")

**In [3]:** df.head()

**Out[3]:**

Muestra1	Desplazamiento (mm)1	Presion1	Fuerza1	Muestra5	Desplazamiento (mm)5	Presion5	Fuerza5	Muestra2	Desplazamiento (mm)2	...	Fuerza4	Muestra3	De
0	1	0.000000	888.398725	0.001213	5.0	0.000000	3898.294705	0.026142	2.0	0.002499	...	0.002882	3.0
1	1	0.003749	-388.560182	-0.000683	5.0	0.003749	4572.480148	0.032321	2.0	0.008747	...	0.001744	3.0
2	1	0.006248	643.478459	0.001137	5.0	0.013745	4277.102729	0.030233	2.0	0.016244	...	-0.000227	3.0
3	1	0.009998	1158.497846	0.002047	5.0	0.023741	5065.432297	0.035805	2.0	0.022491	...	0.008115	3.0
4	1	0.013745	1587.880371	0.002806	5.0	0.033737	4158.489940	0.029395	2.0	0.028739	...	0.001972	3.0

5 rows x 25 columns

**In [4]:** df= df.drop({'Unnamed: 20','Invierno','Fecha 16/06/22','Unnamed: 23','Unnamed: 24'},axis=1)

**In [5]:** df.head()

**Out[5]:**

Muestra1	Desplazamiento (mm)1	Presion1	Fuerza1	Muestra5	Desplazamiento (mm)5	Presion5	Fuerza5	Muestra2	Desplazamiento (mm)2	Presion2	Fuerza2	Muestra3	Fuerza3
0	1	0.000000	888.398725	0.001213	5.0	0.000000	3898.294705	0.026142	2.0	0.002499	3261.831148	0.005784	0.005784
1	1	0.003749	-388.560182	-0.000683	5.0	0.003749	4572.480148	0.032321	2.0	0.008747	-800.813822	-0.001062	-0.001062
2	1	0.006248	643.478459	0.001137	5.0	0.013745	4277.102729	0.030233	2.0	0.016244	4635.218179	0.008191	0.008191
3	1	0.009998	1158.497846	0.002047	5.0	0.023741	5065.432297	0.035805	2.0	0.022491	3261.831148	0.005784	0.005784
4	1	0.013745	1587.880371	0.002806	5.0	0.033737	4158.489940	0.029395	2.0	0.028739	1115.917334	0.001972	0.001972

**In [6]:** df['Presion1']= df['Presion1']/1000  
df['Presion2']= df['Presion2']/1000  
df['Presion3']= df['Presion3']/1000  
df['Presion4']= df['Presion4']/1000  
df['Presion5']= df['Presion5']/1000

Figura 31: Tratamiento de los datos previo a ser graficados.

**Fórmula**

La forma de calcular el módulo de Young es:

$$E = \sigma / \epsilon$$

Siendo:

- E = módulo de Young, en pascal.
- $\sigma$  = tensión uniaxial o fuerza uniaxial por superficie de la unidad, en pascal.
- $\epsilon$  = deformación o deformación proporcional (esto quiere decir el cambio de longitud dividido por la longitud original).

Por tensión se entiende la fuerza aplicada a la probeta en cada momento, pero OJO por unidad de sección. La unidad de tensión en el SI (sistema internacional) es el Newton/metro cuadrado, aunque a veces por ser prácticos se expresa en Kg/mm2 (milímetros cuadrados). Una vez finalizado el ensayo, la muestra de ensayo rota se recoge para medir la longitud final y se compara con la longitud original o inicial para obtener la elongación.

**Elongacion**

Se calcula con la siguiente fórmula:

$$EL = (L_f - L_o) / L_o$$

```
In [8]: # buscamos Los maximos
Pmax1= df['Presion1'].max()
Pmax2= df['Presion2'].max()
Pmax3= df['Presion3'].max()
Pmax4= df['Presion4'].max()
Pmax5= df['Presion5'].max()

In [9]: print(Pmax1,Pmax2,Pmax3,Pmax4,Pmax5)
70.10318318046116 166.65172499557212 57.1671908301881 98.36873858448061 114.13582599292144

In [10]: condition_1 = df['Presion1'] == Pmax1
condition_2 = df['Presion2'] == Pmax2
condition_3 = df['Presion3'] == Pmax3
condition_4 = df['Presion4'] == Pmax4
condition_5 = df['Presion5'] == Pmax5

In [11]: Lf1= df.loc[condition_1, 'Desplazamiento (mm)1']
Lf2= df.loc[condition_2, 'Desplazamiento (mm)2']
Lf3= df.loc[condition_3, 'Desplazamiento (mm)3']
Lf4= df.loc[condition_4, 'Desplazamiento (mm)4']
Lf5= df.loc[condition_5, 'Desplazamiento (mm)5']

In [12]: Lf1= 7.153445
Lf2= 4.407022
Lf3= 2.531507
Lf4= 4.065906
Lf5= 2.60023
```

Figura 32: tratamiento de los datos para la realización de los graficos de caja sobre la elasticidad.

Lo mismo se repite para el protocolo 2 y 5.

## Código para los Gráficos de Módulo de Young

```
In [16]: import pandas as pd
```

```
In [20]: df_elasticidad = pd.DataFrame({'verano 5%': [48.549816745203756, 57.860706129832856, 57.68910354221798, 34.21327422980596, '?'],
    'verano 10%': [7.184753281284083, 12.43750871897265, 24.037323155181767, '?', '?'],
    'invierno 10%': [9.79991922499735, 37.81504267407154, 22.582276418824083, 24.193559463617852, 43.894512]})
```

```
In [21]: df_elasticidad
```

```
Out[21]:
```

	verano 5%	verano 10%	invierno 10%
0	48.549817	7.184753	9.799919
1	57.860706	12.437509	37.815043
2	57.689104	24.037323	22.582276
3	34.213274	?	24.193559
4	?	?	43.894512

```
In [22]: df_elasticidad = df_elasticidad.replace("?", np.nan)
df_elasticidad.fillna(df_elasticidad.mean())
```

```
Out[22]:
```

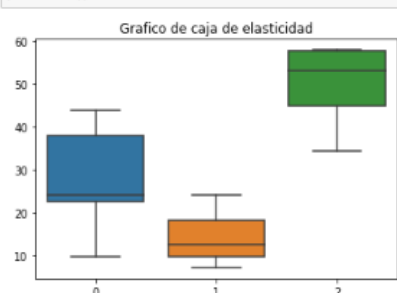
	verano 5%	verano 10%	invierno 10%
0	48.549817	7.184753	9.799919
1	57.860706	12.437509	37.815043
2	57.689104	24.037323	22.582276
3	34.213274	14.553195	24.193559
4	49.578225	14.553195	43.894512

```
In [23]: df_elasticidad.describe()
```

```
Out[23]:
```

	verano 5%	verano 10%	invierno 10%
count	4.000000	3.000000	5.000000
mean	49.578225	14.553195	27.657062
std	11.128420	8.623188	13.448083
min	34.213274	7.184753	9.799919
25%	44.905681	9.811131	22.582276
50%	53.119480	12.437509	24.193559
75%	57.732004	18.237418	37.815043
max	57.860706	24.037323	43.894512

```
In [25]: x = [df_elasticidad['invierno 10%'], df_elasticidad['verano 10%'], df_elasticidad['verano 5%']]
ax = sns.boxplot(data=x)
plt.title("Grafico de caja de elasticidad")
plt.show()
```



```
In [ ]:
```

Figura 33: Código Python de la creación de gráficos de caja mostrados en los resultados.

## Preservación de Conductos Vasculares Foliare

Para demostrar la preservación de los conductos vasculares foliares del andamio de hoja de espinaca se realizó un ensayo simple e ilustrativo, donde se perfunde el andamio con eosina y se observa el flujo del colorante a través de los conductos. Luego a este mismo andamio se lo sumergió en agua desionizada y se observó que el colorante no escapa el andamio, y el medio en el que se encuentra sumergido siguió incoloro.

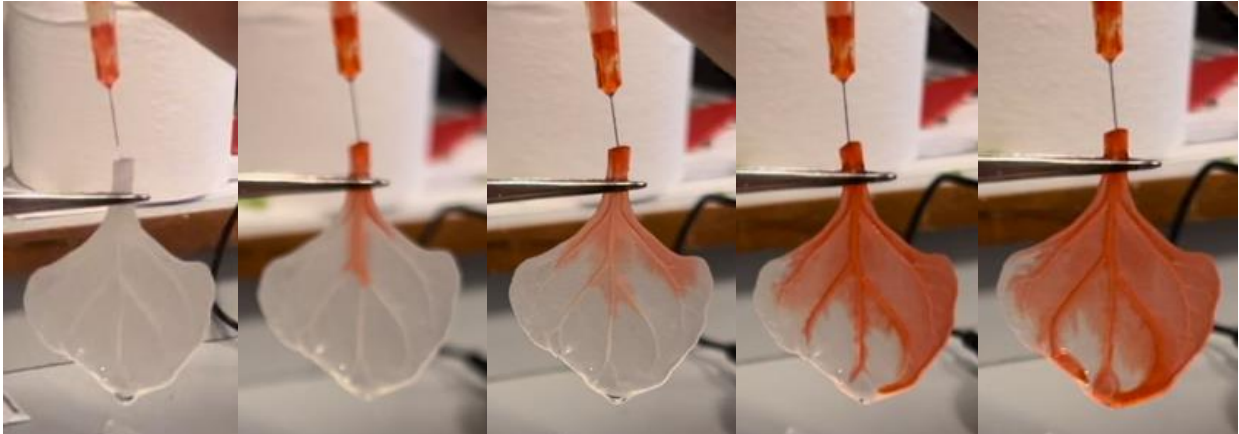


Figura 34: Perfusión del andamio con eosina.