



Revista Mexicana de Ingeniería  
Biomédica

ISSN: 0188-9532

rmib.somib@gmail.com

Sociedad Mexicana de Ingeniería  
Biomédica  
México

Paredes-Puerto, A.; Camacho-Villegas, T.; Vallejo-Cardona, A.; Esquivel-Solís, H.  
Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos  
Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, vol. 38, núm. 1, enero-abril, 2017, pp. 103-  
114  
Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica  
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61949530009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.7](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.7)

# Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos

## Recombinant Collagens for Tissue Engineering Scaffolds

A. Paredes-Puerto<sup>1</sup>, T. Camacho-Villegas<sup>1</sup>, A. Vallejo-Cardona<sup>1</sup>, H. Esquivel-Solís<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CONACYT - Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

### RESUMEN

Las colágenas son cada día más atractivas en la fabricación de andamios para Ingeniería de Tejidos, por su biocompatibilidad, manejo y capacidad de producirlas industrialmente. El objetivo del presente artículo fue presentar un análisis sobre el avance en la investigación, el desarrollo y producción de colágenas recombinantes de humano, los sistemas de producción y sus usos en Ingeniería de Tejidos. Se realizó una revisión de la literatura científica internacional arbitrada en bases de datos como Scopus, PubMed y Google Académico y se empleó aquella relevante a nuestro objetivo. Se encontró que el desarrollo de colágenas recombinantes de humano muestra un avance significativo y en la actualidad los sistemas de expresión, como bacterias y plantas, presentan ventajas sobre la calidad de la estructura y la biocompatibilidad, aunque con rendimientos todavía bajos. Mientras que existe escasa información sobre sus aplicaciones en Ingeniería de Tejidos, principalmente cartílago y hueso, en modelos animales y estudios clínicos. En las fuentes de información no se incluyeron patentes, por lo que nuestros hallazgos están limitados a publicaciones científicas. El presente trabajo, presenta los avances más recientes sobre la ingeniería de colágenas recombinantes y sus aplicaciones biomédicas en fabricación de tejidos con potencial uso clínico. Por lo que su factibilidad en la medicina regenerativa es prometedor y se requiere mayor investigación que permita su aplicación en un futuro cercano.

**PALABRAS CLAVE:** Colágeno, Andamios, Ingeniería de Tejidos.

### ABSTRACT

Due to its biocompatibility, handling and industrial production capacity, collagens have been increasingly attractive in the manufacture of scaffolds for Tissue Engineering. The aim of the present work was to present an analysis on the progress in research, development and production of human recombinant collagens, expression systems and their uses in Tissue Engineering. A review of the international scientific peer-reviewed literature in databases such as Scopus, PubMed and Google Scholar was done and that relevant to our objective was employed. The development of human recombinant collagens was found to be significant, and currently the expression systems, like bacteria and plants, show advantages over structure quality and biocompatibility, albeit with still restricted yields. However, there is narrow information about its applications in Tissue Engineering, mostly studied for cartilage and bone, in animal models and clinical studies. We did not include patents in the study, thus our findings are limited to scholar data. The present work presents the most recent advances in the engineering of recombinant collagens and their biomedical applications in the manufacture of tissues with potential clinical applications. The potential of recombinant collagens in regenerative medicine is promising and more research is needed that might allow a broad application in the near future.

**KEYWORDS:** Collagen, Scaffolds, Tissue Engineering.

### Correspondencia

DESTINATARIO: H. Esquivel-Solís

INSTITUCIÓN: Centro de Investigación y Asistencia en  
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

DIRECCIÓN: Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la  
Normal, Guadalajara, Jalisco, México.

CORREO ELECTRÓNICO: hesquivel@ciatej.mx

### Fecha de recepción:

8 de julio de 2016

### Fecha de aceptación:

24 de noviembre de 2016

## INTRODUCCIÓN

En esencia, la Ingeniería de Tejidos se fundamenta en utilizar una combinación de células, señales moleculares y andamios porosos para cultivar tejidos *in vitro*<sup>[1]</sup>. La Ingeniería de Tejidos y la Medicina Regenerativa buscan desarrollar biomateriales que permitan, no solo el restablecimiento estructural, sino también que fomenten la regeneración funcional para evitar reemplazar órganos o tejidos<sup>[2]</sup>. Los andamios porosos para Ingeniería de Tejidos juegan un papel central al imitar la porosidad, el tamaño de poro y la interconectividad de los tejidos, para proporcionar un ambiente adecuado para la adhesión, proliferación, diferenciación celular y para mimetizar la función de los tejidos humanos nativos<sup>[3]</sup>. Incluso, éstos pueden ser fabricados de tal manera que provean guías bioquímicas y/o biomecánicas que mimeticen la matriz extracelular de tejidos humanos<sup>[3]</sup>.

Algunos de los esfuerzos iniciales de la Ingeniería de Tejidos, estuvieron enfocados al uso de polímeros sintéticos como redes químicamente entrecruzadas (hidrogeles)<sup>[2]</sup>, poliuretanos<sup>[4]</sup>, poli(ácido láctico)<sup>[5]</sup>, poli(ácido glicólico)<sup>[5]</sup>, poli(glicerol sebacato)<sup>[6]</sup>, entre otros. Este tipo de materiales, permiten formar andamios con características mecánicas de formas muy bien controladas. Sin embargo, éstos materiales carecen de las señales químicas, mecánicas y biológicas que posee la matriz extracelular natural. Aunque éstas señales pueden ser añadidas de manera externa para mejorar las características del andamio obtenido, parecen ser insuficientes para producir tejidos similares a los nativos<sup>[7]</sup>.

Una de las estrategias que se ha empleado con éxito, incluye producir por medio de la tecnología recombinante diversas proteínas fibrilares de la matriz extracelular (ECM), tales como colágena tipo I y II, queratina, elastina y fibrina. De estas proteínas fibrilares, específicamente los diversos tipos de colágena obtenidos por la tecnología recombinante, se han usado en la fabricación de andamios, debido a su capacidad de ser producidas y modificadas con técnicas moleculares y

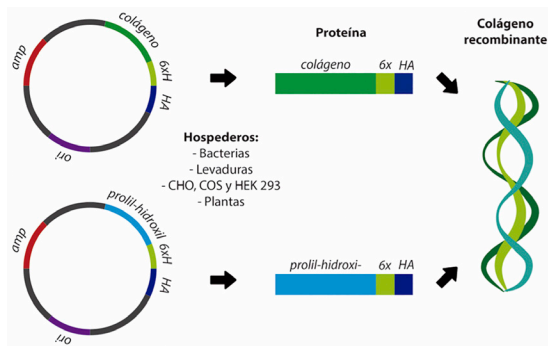
por su biocompatibilidad<sup>[8, 9, 10]</sup>. Por lo anterior, se están convirtiendo en buenos candidatos base de materiales avanzados de gran demanda en el área biomédica<sup>[10]</sup>. Fueron los resultados reportados en el año 2000 por Ruggiero et al. usando plantas transgénicas de tabaco, donde se logró la producción exitosa de colágena recombinante, los que abrieron las puertas para la explotación de esta tecnología<sup>[11]</sup>. Sin embargo, fue hasta 2007 que Neubauer et al. presentaron un sistema que permitía su producción en cantidades aprovechables a nivel comercial de colágeno recombinante, siendo ésta investigación la que abrió las puertas a los laboratorios de materiales enfocados a la ingeniería de tejidos<sup>[12]</sup>. Por ejemplo en 2004, la compañía Fibrogen®, comenzó a distribuir comercialmente colágena recombinante potencialmente menos inmunogénica pues es idéntica a la nativa de humano, pero con características estables entre lotes de producción<sup>[13]</sup>.

Debido a que este campo promete mejoras en la biocompatibilidad, biodegradabilidad y simulación de las condiciones normales de los tejidos generados al usar andamios basados en colágenas recombinantes, el presente artículo se enfoca en los recientes avances en la expresión recombinante y el uso de colágenas recombinantes humanas en Ingeniería de Tejidos.

## Colágena

Se han descrito hasta el momento, 28 tipos de colágena y todas están formadas por tres cadenas de aminoácidos<sup>[14]</sup>. Cada una de éstas cadenas está formada por una hélice de poliprolina tipo II, que gira hacia la izquierda y que forman una superestructura de triple hélice orientada en la dirección de giro hacia la derecha. A un nivel molecular, cada cadena está formada de tres aminoácidos (GXY) en los cuales, la glicina siempre ocupa la primera posición. Las otras dos posiciones se encuentran ocupadas por el aminoácido prolina. En la posición Y, la prolina es transformada en 4-hidroxiprolina, lo cual repercute en la estabilidad de la molécula y es necesaria para soportar las temperaturas corporales sin degra-

darse<sup>[15]</sup>. Partiendo de este principio para obtener la expresión del colágena, se realizaron algunas modificaciones de la estructura secundaria que permitieron el entrecruzamiento y la estabilidad de la triple hélice para obtener la colágena recombinante. Por lo tanto, para este procedimiento fue necesario mimetizar la ruta biosintética que confiere la estabilidad a la molécula. En la mayoría de los sistemas esto incluye la coexpresión de 4-hidroxilasa prolina (P4H). En la Figura 1, se ilustra de manera esquemática este proceso.



La colágena ha sido utilizada en múltiples aplicaciones médicas, farmacéuticas y productos de consumo humano por más de 100 años<sup>[16]</sup>. Uno de los mayores retos de un biomaterial es su biocompatibilidad. En el caso de las proteínas recombinantes ésta biocompatibilidad ha sido explorada en muchas ocasiones en estudios de toxicidad, inmunogenicidad y biodegradación. Por ejemplo, la biocompatibilidad de la colágena ha sido ampliamente comprobada y es muy conocida<sup>[17]</sup>.

La inmunogenicidad de la colágena ha sido revisada en estudios diversos como el publicado por Ramshaw *et al.*<sup>[16]</sup>. En general, se puede afirmar que las colágenas obtenidas por métodos recombinantes presentan buena biocompatibilidad, permiten la proliferación celular y no interfieren con el comportamiento celular. Aun así, hay puntos a favor y en contra de las colágenas de fuentes tradicionales y las colágenas recombinantes humanas, los cuales se resumen en la Tabla 1.

**TABLA 1. Comparación entre el colágeno obtenido de fuentes tradicionales y el colágeno obtenido por métodos recombinantes.**

Colágeno obtenido de fuentes tradicionales		Colágeno obtenido por métodos recombinantes	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Baja toxicidad (relativa a otros materiales)	Posible transmisión de enfermedades animales	Baja toxicidad (relativa a otros materiales)	Altos costos
Degradación natural por metaloproteinasas	Reacciones alérgicas	Degradación natural por metaloproteinasas	Bajos rendimientos
Fácil de entrecruzar	Contaminación con patógenos	Fácil de entrecruzar	Sistemas de expresión complejos
	Reacción Inmune	Su estructura es la misma que la del colágeno humano nativo	
	Variación lote a lote		

## Sistemas de expresión para obtener colágena recombinante

La colágena utilizada en aplicaciones biomédicas y de Ingeniería de Tejidos, es principalmente colágena tipo I que se extrae de forma abundante de huesos de bovino. Sin embargo, la colágena que se obtiene por métodos recombinantes, ofrece una serie de ventajas como la disponibilidad y la calidad controlada del producto, la ausencia de contaminantes de animales, la potencialidad de producir los tres tipos de colágena principales y la posibilidad de seleccionar dominios específicos de expresión o la producción de moléculas quiméricas.

Los sistemas que se utilizan para la expresión de colágena recombinante incluye células procariotas y células eucariotas. A continuación, se describen algunas características y retos del uso de estos dos sistemas.

## Sistemas de expresión de colágena recombinante en procariotas

La bacteria *Escherichia coli* es la más utilizada para la expresión de proteínas, incluyendo las de la matriz extracelular como la colágena. No obstante, hay algunos problemas para este sistema de expresión, en particular para colágenas provenientes de mamíferos. En principio, se requiere la coexpresión de la enzima P4H la cual es muy problemática en bacterias. Esto ha sido resuelto al usar una cepa con un citosol particularmente oxidante<sup>[18]</sup>. Sin embargo, la producción de estas proteínas generalmente lleva a la formación de cuerpos de inclusión no deseados en las bacterias o la producción de su versión desnaturalizada<sup>[19]</sup>.

Se han publicado algunos trabajos en donde se mejora esta tecnología, sobre todo para producir colágeno humano. Entre las estrategias empleadas podemos mencionar el aumento del crecimiento y expresión por medio de variaciones del CO<sub>2</sub><sup>[20]</sup>, aumentando la presión para mejorar la transferencia de oxígeno y la optimización de la relación carbono/nitrógeno en el cultivo<sup>[21]</sup>.

Sin embargo, en ninguno de estos casos se analizó si la cantidad de proteína obtenida correspondió a colágena o a su versión desnaturalizada.

Con base en resultados obtenidos en *Pichia pastoris* se ha demostrado que el ensamblaje de colágenas de humano tipo I y III depende de la eficiencia de trimerización y que, por medio de la coexpresión de una secuencia de 29 aminoácidos que se localiza normalmente en el C- terminal de la secuencia de trimerización de la fibritina del bacteriófago T4, se pueden generar entre 2 y media a tres veces más colágeno<sup>[22]</sup>.

Estos estudios coinciden en que la hidroxiprolina endógena en la cadena de colágena es necesaria para la estabilidad de la triple hélice. Estos materiales han sido analizados de manera extensiva por medio de técnicas de espectroscopía de dicroísmo circular (DC), dispersión dinámica de luz (DLS) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) para estudiar su estructura y estabilidad. En todos los casos, se ha encontrado que estas colágenas presentan una transición térmica alrededor de los 36 - 37 °C<sup>[23, 24, 25]</sup>. Estas características hacen que las proteínas sean excelentes candidatos para su uso como biomateriales en andamios para Ingeniería de Tejidos.

## Sistemas de expresión de colágena recombinante en eucariotas

La falta de los sistemas de procesamiento post-traducciona en procariotas ha favorecido el desarrollo de los sistemas en células eucariotas que expresen colágena de forma recombinante. Sin embargo, como en todos los casos, cada uno de los sistemas tiene sus ventajas y desventajas. En el caso de algunas líneas celulares eucariotas como CHO (células de ovario de hámster chino), COS (células tipo fibroblasto derivadas de riñón de mono), HEK 293 (células de riñón de embrión humano) y HT1080 (células de fibrosarcoma de tejido conectivo humano), se tiene la ventaja de contar con toda la maquinaria post-transducciona de

producción de colágena. Sin embargo, la desventaja suele ser el bajo rendimiento de producción, que puede ir de 0.1 a 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  [26]. Por otro lado, en el caso de las células HEK 293, se pueden alcanzar rendimientos de 80  $\text{mgL}^{-1}$ . Por lo que, aun cuando estos sistemas ofrecen una forma sencilla de producir colágena estable, los rendimientos no permiten su viabilidad comercial.

Debido a la limitación de la coexpresión de P4H en células de insectos y los bajos rendimientos de las células de mamífero, los sistemas basados en levaduras han sido explorados como una opción. Estos sistemas han sido optimizados para expresar cuando menos tres genes, uno para colágena y dos para P4H. Varios sistemas han sido diseñados basándose en *Saccharomyces spp.* integrando los tres genes [24, 27]. La producción de colágena tipo I de humano en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, reveló que los extremo N- o C- del propéptido de colágeno (procolágeno) así como la ausencia de hidroxilación en prolina, no son necesarios para la formación de la triple hélice [28]. Otros sistemas se han basado en *P. pastoris* para obtener mejores rendimientos de colágenas no modificadas en sistemas recombinantes. Baez *et al.* en 2005, lograron mejorar los rendimientos de éstos sistemas basados en *P. pastoris* hasta 1.5  $\text{gL}^{-1}$  para cadenas completas de colágena y 14  $\text{gL}^{-1}$  para fragmentos definidos [22, 29].

La adición de P4H en microorganismos genéticamente modificados como levaduras *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* y bacterias *E. coli*, *Bacillus brevis* y en células de insectos como en plantas de tabaco, para la producción de colágena recombinante de humano probó ser una tecnología escalable y rentable en la síntesis de colágena hidroxilada, con estabilidad térmica similar a colágenas nativas para su uso en muchas aplicaciones médicas como la Ingeniería de Tejidos [29-34]. Adicionalmente, se han empleado animales o plantas transgénicas en los cuales se introduce el DNA foráneo utilizando técnicas convencionales como microinyección del DNA deseado directamente

en un óvulo [35]. Asimismo, un número de proteínas bacterianas similares a la colágena con Gly como cada tercer residuo y un alto contenido de Pro, como los péptidos V-CL-CL de *Streptococcus pyogenes*, se han observado capaces de formar estructuras de triple hélice estables a pesar de la ausencia de hidroxiprolina, y tienen el potencial de formar estructuras fibrilares, útiles para biomateriales y aplicaciones de ingeniería de tejidos [36].

Varias especies de animales transgénicos son capaces de producir proteínas recombinantes en leche, sangre, clara de huevo, semen, orina y glándulas de seda [37]. Un gran número de especies de mamífero han sido utilizadas para este fin incluyendo cerdos, cabras, vacas, conejos y ratones. Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas. Sin embargo, existen pocas publicaciones sobre la producción de colágenas expresadas en animales transgénicos. La expresión de colágena de humano en leche de ratón tuvo como resultado la producción de pro-colágeno sin hidroxilar, el cual era térmicamente inestable. Este resultado se atribuyó a la baja disponibilidad de P4H endógeno [38]. Con la introducción de genes que expresan el P4H, se logró obtener rendimientos de 0.2  $\text{gL}^{-1}$ . Sin embargo, Toman *et al.* lograron mejorar ésta producción hasta rendimientos de 8  $\text{gL}^{-1}$  pero con un peso molecular menor a 37 kDa lo cual indica una menor longitud y estabilidad [39].

En el caso de las plantas transgénicas, se tiene un largo historial de su uso como biorreactores para productos farmacéuticos (p. ej. insulina, lactoferrina y anticuerpos), vacunas y enzimas de procesamiento (tripsina), dado que estos sistemas ofrecen una opción económica y práctica.

El primer modelo reportado para la producción de colágena en plantas fue publicado por Ruggiero *et al.* en el año 2000. Estas plantas fueron capaces de producir colágena humana tipo III, de triple hélice y colágena tipo I en forma de homotrímero [16].



Cabe mencionar que aun cuando éstos sistemas fueron de importancia al demostrar el concepto, la hidroxilación de la prolina en la posición Y estuvo ausente. Esto demostró que la expresión de P4H también es necesaria en plantas para obtener colágena funcional. Sin embargo, la falta de hidroxilación en moléculas de colágena recombinantes expresadas en plantas de tabaco, mostraron una mayor flexibilidad, así como una temperatura de fusión reducida en comparación con homotrímeros y heterotrímeros nativos, mientras que la distribución de aminoácidos cargados se mantuvo sin cambios. Asimismo, se demostró que la ausencia de residuos de hidroxiprolina no impide el plegamiento correcto de colágena recombinante<sup>[40]</sup>. La cebada ha sido utilizada como sistema de expresión de colágena tipo I de cadena completa utilizando tres promotores (ubiquitina de maíz, glutenina específica y alfa-amilasa). Sin embargo, los mejores rendimientos obtenidos usando el promotor de glutenina fueron de  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  por semilla, lo cual es relativamente bajo. Stein *et al.*, retomaron el trabajo con plantas de tabaco agregando la expresión de P4H y de procólágeno-lisina 4-dioxigenasa, lo cual produjo rendimientos de aproximadamente  $20 \text{ g L}^{-1}$  <sup>[31]</sup>. La colágena recombinante carente de hidroxiprolina expresada en plantas transgénicas, tiene una adherencia más débil a plaquetas que en el colágeno completamente hidroxilado, ofreciendo nuevas aplicaciones selectivas para aplicaciones biomédicas en Ingeniería de Tejidos<sup>[41]</sup>.

### Uso de la colágena recombinante en Ingeniería de Tejidos

Como hemos mencionado, la colágena se puede producir en una gran variedad de sistemas que difieren en facilidad, reproducibilidad, relación costo-eficiencia y rendimiento. Hemos descrito una gama de sistemas de expresión de colágenas de origen humano en bacterias, levaduras y células de mamífero, insecto y vegetales como el tabaco y el maíz (recombinantes) y colágenas de origen bacteriano (colágena no animal), como materiales de uso potencial en biomedicina<sup>[29-32, 42]</sup>.

Los últimos tienen las ventajas que se pueden producir fácilmente con buenos rendimientos a través de *E. coli*, y no existe ningún requisito para la hidroxilación de prolina y pueden formar estructuras estables de triple hélice<sup>[23, 43]</sup>. Sin embargo, las colágenas no hidroxiladas en prolina estudiadas hasta la fecha, no se empaquetan en grandes agregados fibrilares como los que se forman por las principales colágenas intersticiales de animales, particularmente colágena de tipo I, que es la principal colágena utilizada en materiales biomédicos<sup>[23, 40]</sup>. Como consecuencia, las matrices tridimensionales fabricadas, como las esponjas de colágena recombinante, no son mecánica y estructuralmente tan estables como las de las colágenas de origen animal <sup>[44]</sup>. Empero, la introducción de tirosina y cisteína en la secuencia de colágenas bacterianas, permite formar entrecruzamientos selectivos a través de la oxidación y la formación de agregados más grandes de los cuales se pueden obtener geles y agregados solubles y pueden conformar esponjas más estables para Ingeniería de Tejidos<sup>[45]</sup>.

Las colágenas recombinantes de humano son una base eficiente para la formación de andamios útiles en la reparación ósea, en especial cuando se combina con una proteína morfogenética ósea recombinante en un tamaño y modo de presentación poroso, similar a una esponja. Cuando se presentan como una membrana, película o gel, pueden servir como base para la ingeniería de epitelios como piel, cartílago y ligamento periodontal, de acuerdo a los requisitos específicos de la aplicación elegida.

Durante la última década, en conjunto con el desarrollo de tecnologías para la producción a gran escala de colágenas recombinantes de humano, se ha hecho un progreso significativo en la evaluación de estas colágenas en la Ingeniería de Tejidos. Lo que ha traído como resultado, el diseño racional y a medida de proteínas similares a la colágena de humano para desarrollar biomateriales inteligentes, que mejoren la calidad de los tejidos producidos en el laboratorio.



Estudios como los realizados por Ito et al.<sup>[9]</sup> y Hu et al.<sup>[8]</sup>, aportaron conocimiento sobre los dominios relevantes de la estructura de la colágena recombinante de humano, para favorecer la formación de cartílago y piel, respectivamente. La generación de proteínas similares a la colágena, como el dominio D4 de colágena de humano II, ha permitido fabricar andamios con cualidades superiores para ingeniería de cartílago<sup>[9]</sup>. Simultáneamente, Dravida et al.<sup>[46]</sup>, crearon una lámina de 2 mm de colágena recombinante de humano entrecruzada para el desarrollo de tejido limbal/corneal de utilidad clínica en enfermedades de córnea. Mientras que Liu et al. y Griffith et al., han fabricado con éxito hidrogeles transparentes y sólidos como sustitutos de la córnea a partir de colágenas recombinantes de humano tipo III y tipo I, con diferentes procesos de reticulación, los cuales mostraron retención de claridad óptica, junto con la regeneración de las células de la córnea, los nervios y la película lagrimal, con potencial uso clínico<sup>[47, 48]</sup>. Por otra parte, Wang et al.<sup>[49]</sup> emplearon colágena recombinante de humano sintetizado en *E. coli* y combinado con hidroxiapatita/poli-ácido láctico para el desarrollo de hueso, el cual mostró algunas de las características del hueso natural tanto en el componente principal como en microestructura, resultando prometedor para ingeniería de tejido óseo. Pruebas in vitro con células pre-osteoblastos, demuestran una buena interacción célula-material sobre matrices preparadas con proteínas derivadas de colágena recombinante de humano de tipo I en presencia de Mg<sup>2+</sup>, abriendo la posibilidad de diseñar, a través de proceso de biomineralización, matrices híbridas avanzadas para la regeneración ósea<sup>[50]</sup>. Pulkkinen et al.<sup>[51]</sup>, reportan la funcionalidad y la biocompatibilidad de la colágena tipo II recombinante de humano para fabricación de cartílago. Asimismo, el grupo de Wu et al.<sup>[52]</sup>, reevaluaron el uso del colágena recombinante de humano e hidroxiapatita/poli-ácido láctico cargado con Proteína Morfogenética 2 (BMP-2) recombinante de humano, consiguiendo la mineralización y formación de hueso,

que tiempo más tarde sería evaluado con células troncales mesenquimales modificadas genéticamente para la expresión de BMP-2 de humano, evidenciando un incremento en la formación de hueso<sup>[53]</sup>. Posteriormente, Zhu et al.<sup>[54]</sup>, incursionaron en la ingeniería de tejido vascular empleando colágena recombinante de humano en *E. coli* combinada con quitosano en andamios tubulares, consiguiendo demostrar su biocompatibilidad y potencial uso en regeneración vascular.

Recientemente, Zhang et al. fabricaron andamios de péptidos de colágena recombinante de humano por medio de liofilización y estudiaron el efecto del tamaño de poro en el cultivo de células endoteliales de cordón umbilical de humano. Este estudio demostró lo importante de la porosidad de los materiales en la viabilidad celular<sup>[55]</sup>.

La colágena tipo I obtenida de *Pichia* ha sido utilizada para obtener membranas para regeneración de tejidos. Asimismo, la colágena tipo II se utilizó para recubrir telas de Dacron® (DuPont, Unión Europea) para reducir la trombogénesis<sup>[56]</sup>. En otro estudio, se produjeron andamios porosos que liberaban Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), para generar sustitutos de tejido gingival<sup>[57]</sup>.

Estas colágenas han sido utilizadas también en estudios de generación de cartílago y hueso in vitro e in vivo, como andamios cargados de condrocitos en conejos e incluso en porcinos<sup>[49, 51, 52]</sup>. En todos los estudios, se obtuvieron resultados favorables de formación de tejido, pero sólo en la última publicación mencionada, se observaron propiedades mecánicas similares al tejido natural. Muhonen et al., obtuvieron hidrogeles de ésta colágena tipo II y los utilizaron como nichos para la condrogénesis de células madre mesenquimales. Este estudio sirvió para demostrar que el proceso de formación de cartílago, se presenta de manera retardada y reafirma la necesidad de seguir explorando el uso de estos materiales<sup>[58]</sup>.

La colágena recombinante tipo VII, ha sido investigada como una alternativa de terapia para úlceras de la epidermis, pero también ha presentado efectividad en el tratamiento de la Epidermólisis Bullosa Distrófica (EBS), por medio de la aplicación de geles tópicos o por inyección intravenosa. En el caso de las úlceras diabéticas, se observó una recuperación más rápida que la obtenida al utilizar geles de colágena de origen bovino o cadavérico. Incluso, hubo angiogénesis en etapas tempranas de la aplicación y menor inflamación<sup>[54, 55]</sup>. Woodley et al., demostraron que al administrar colágena por medio intravenoso, éste era atraído e incorporado a la interfaz epidermis-dermis logrando su restauración<sup>[59]</sup>.

Uno de los mayores éxitos reportados de la colágena tipo VII, es su uso en el remplazo y regeneración de córneas. El grupo conformado por laboratorios de Canadá, Suecia, EUA, Japón e India, demostraron que la colágena tipo I tiene un índice de refracción de 1.35 y una transparencia similar a la de la córnea humana [60]. Asimismo, al utilizar colágena tipo III, encontraron que posee las mismas propiedades ópticas y mejores propiedades mecánicas que la colágena tipo I, lo cual atribuyeron al menor diámetro de las fibrillas<sup>[47]</sup>. En un estudio paralelo, encontraron que éstos hidrogeles eran capaces de mantener una proliferación de células endoteliales y neurales in vitro<sup>[61]</sup>. También, se comparó su desempeño in vivo en donde obtuvieron una mejor regeneración que la obtenida con un aloinjerto de cerdo y una incidencia de infecciones diez veces menor<sup>[62]</sup>. Recientemente, en un seguimiento los autores observaron que las corneas implantadas no presentaron rechazo y los pacientes no habían necesitado terapia de inmunosupresión. Por lo que estos hidrogeles de colágena presentan una excelente opción al trasplante de corneas<sup>[63]</sup>. En resumen, el avance científico y tecnológico en la obtención de colágenas recombinantes de humano, así como en su aplicación para Ingeniería de Tejidos, ha permitido explotar su potencial terapéutico clínico y ofrece grandes retos y oportunidades para este sector en amplio crecimiento.

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

En los últimos 20 años se han desarrollado sistemas bacterianos y eucariotas para la producción de colágenas recombinantes de humano a nivel industrial. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de producción, todavía son escasas las empresas que ofrecen estos materiales en condiciones adecuadas, de costo y cantidad, para potenciar su uso en investigación y medicina. Por lo tanto, uno de los retos consiste en lograr obtener rendimientos más altos y el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan su procesamiento.

Por otro lado, estas colágenas recombinantes representan una opción muy atractiva al ser comparadas con las de origen animal, ya que presentan una mejor biocompatibilidad y menor rechazo al ser idénticos al de origen humano y ponen fin a los riesgos latentes por el uso de colágenas de origen animal. Adicionalmente, estas colágenas recombinantes eliminan la necesidad de utilizar modificaciones químicas para unir de manera covalente señales bioactivas o entrecruzamientos químicos, las cuales, pueden ocasionar la desnaturalización de la proteína o introducir residuos tóxicos. En este contexto, el desafío consiste en obtener materiales que permitan desarrollar andamios con una estructura jerárquica que mimetice la complejidad de la matriz extracelular natural. Es posible que la generación de estas micro y nanoestructuras pueda ser lograda por medio del uso de una combinación de técnicas como electrohilado, micro o nanomoldeo, microlitografía o autoensamblado. Por lo tanto, conforme la Ingeniería de Tejidos vaya avanzando y empleando andamios más complejos, las colágenas recombinantes prometen ser una buena opción para satisfacer los requerimientos biológicos, médicos y comerciales.

En conclusión, debido al avance significativo en el desarrollo y uso de colágenas recombinantes de humano en uso de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, es necesario continuar la investigación de laboratorio y clínica, para poder aprovechar al máximo su potencial como una herramienta en la biomedicina.

## REFERENCIAS

- [1] Langer R, Vacanti JP: **Tissue engineering**. *Science* 1993, 260:920-926. doi:10.1126/science.8493529
- [2] Stile RA, Burghardt WR, Healy KE: **Synthesis and Characterization of Injectable Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels That Support Tissue Formation in Vitro**. *Macromolecules* 1999, 32:7370-7379. doi:10.1021/ma990130w
- [3] Loh QL, Choong C: **Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size**. *Tissue Eng Part B Rev* 2013, 19:485-502. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0437
- [4] Xu C, Huang Y, Wu J, Tang L, Hong Y: **Triggerable Degradation of Polyurethanes for Tissue Engineering Applications**. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015, 7:20377-20388. doi:10.1021/acsami.5b06242
- [5] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, Gepstein L, Levenberg S: **Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells**. *Circ Res* 2007, 100:263-272. doi:10.1161/01.RES.0000257776.05673.ff
- [6] Chen QZ, Bismarck A, Hansen U, Junaid S, Tran MQ, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR: **Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue**. *Biomaterials* 2008, 29:47-57. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.010
- [7] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: **Matrix elasticity directs stem cell lineage specification**. *Cell* 2006, 126:677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- [8] Hu K, Cui F, Lv Q, Ma J, Feng Q, Xu L, Fan D: **Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility**. *J Biomed Mater Res A* 2008, 84:483-490. doi:10.1002/jbm.a.31440
- [9] Ito H, Stepkowski A, Alabyeva T, Fertala A: **Testing the utility of rationally engineered recombinant collagen-like proteins for applications in tissue engineering**. *J Biomed Mater Res A* 2006, 76:551-560. doi:10.1002/jbm.a.30551
- [10] Ramshaw JA: **Biomedical applications of collagens**. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016, 104:665-675. doi:10.1002/jbm.b.33541
- [11] Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olgner B, Garrone R, Theisen M: **Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants**. *FEBS Lett* 2000, 469:132-136. doi:10.1016/S0014-5793(00)01259-X
- [12] Neubauer A, Soini J, Bollok M, Zenker M, Sandqvist J, Myllyharju J, Neubauer P: **Fermentation process for tetrameric human collagen prolyl 4-hydroxylase in Escherichia coli: improvement by gene optimisation of the PDI/beta subunit and repeated addition of the inducer anhydrotetracycline**. *J Biotechnol* 2007, 128:308-321. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.10.017
- [13] Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, Spiro R, Polarek JW: **The application of recombinant human collagen in tissue engineering**. *BioDrugs* 2004, 18:103-119. doi:10.2165/00063030-200418020-00004
- [14] Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R: **Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain**. *J Biol Chem* 2006, 281:3494-3504. doi:10.1074/jbc.M509333200
- [15] Shoulders MD, Raines RT: **Collagen structure and stability**. *Annu Rev Biochem* 2009, 78:929-958. doi:10.1146/annurev-biochem.77.032207.120833
- [16] Ramshaw JAM, Peng YY, Glattauer V, Werkmeister JA: **Collagens as biomaterials**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008, 20:3-8. doi:10.1007/s10856-008-3415-4
- [17] van Wachem PB, van Luyn MJ, Olde Damink LH, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P: **Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen**. *J Biomed Mater Res* 1994, 28:353-363. doi:10.1002/jbm.820280310
- [18] Neubauer A, Neubauer P, Myllyharju J: **High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in Escherichia coli**. *Matrix Biol* 2005, 24:59-68. doi:10.1016/j.matbio.2004.11.004
- [19] Han B, Hall FL, Nimni ME: **Refolding of a recombinant collagen-targeted TGF-beta2 fusion protein expressed in Escherichia coli**. *Protein Expr Purif* 1997, 11:169-178. doi:10.1006/prep.1997.0784
- [20] Xue WJ, Fan DD, Shang L, Zhu CH, Ma XX, Yu YY: **Production of biomass and recombinant human-like collagen in Escherichia coli processes with different CO2 pulses**. *Biotechnol Lett* 2009, 31:221-226. doi:10.1007/s10529-008-9852-9
- [21] Lukomski S, Nakashima K, Abdi I, Cipriano VJ, Shelvin BJ, Graviss EA, Musser JM: **Identification and Characterization of a Second Extracellular Collagen-Like Protein Made by Group A Streptococcus: Control of Production at the Level of Translation**. *Infection and Immunity* 2001, 69:1729-1738. doi:10.1128/iai.69.3.1729-1738.2001
- [22] Pakkanen O, Hämäläinen E-R, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Assembly of Stable Human Type I and III Collagen Molecules from Hydroxylated Recombinant Chains in the Yeast Pichia pastoris: EFFECT OF AN ENGINEERED C-TERMINAL OLIGOMERIZATION DOMAIN FOLDON**. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278:32478-32483. doi:10.1074/jbc.M304405200
- [23] Mohs A, Silva T, Yoshida T, Amin R, Lukomski S, Inouye M, Brodsky B: **Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline**. *J Biol Chem* 2007, 282:29757-29765. doi:10.1074/jbc.M703991200
- [24] Vaughn PR, Galanis M, Richards KM, Tebb TA, Ramshaw JA, Werkmeister JA: **Production of recombinant hydroxylated human type III collagen fragment in Saccharomyces cerevisiae**. *DNA Cell Biol* 1998, 17:511-518. doi:10.1089/dna.1998.17.511
- [25] Xu C, Yu Z, Inouye M, Brodsky B, Mirochnitchenko O: **Expanding the family of collagen proteins: recombinant bacterial collagens of varying composition form triple-helices of similar stability**. *Biomacromolecules* 2010, 11:348-356. doi:10.1021/bm900894b
- [26] Ruggiero F, Koch M: **Making recombinant extracellular matrix proteins**. *Methods* 2008, 45:75-85. doi:10.1016/j.ymeth.2008.01.003
- [27] Toman PD, Chisholm G, McMullin H, Giere LM, Olsen DR, Kovach RJ, Leigh SD, Fong BE, Chang R, Daniels GA, et al: **Production of Recombinant Human Type I Procollagen Trimers Using a Four-gene Expression System in the Yeast Saccharomyces cerevisiae**. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275:23303-23309. doi:10.1074/jbc.M002284200

- [28] Olsen DR, Leigh SD, Chang R, McMullin H, Ong W, Tai E, Chisholm G, Birk DE, Berg RA, Hitzeman RA, Toman PD: **Production of human type I collagen in yeast reveals unexpected new insights into the molecular assembly of collagen trimers.** *J Biol Chem* 2001, 276:24038-24043. doi:10.1074/jbc.M101613200
- [29] Baez J, Olsen D, Polarek JW: **Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, 69:245-252. doi:10.1007/s00253-005-0180-x
- [30] Myllyharju J: **Recombinant collagen trimers from insect cells and yeast.** *Methods Mol Biol* 2009, 522:51-62. doi:10.1007/978-1-59745-413-1\_3
- [31] Stein H, Wilensky M, Tsafrir Y, Rosenthal M, Amir R, Avraham T, Ofir K, Dgany O, Yayon A, Shoseyov O: **Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco.** *Biomacromolecules* 2009, 10:2640-2645. doi:10.1021/bm900571b
- [32] Rutschmann C, Baumann S, Cabalzar J, Luther KB, Hennen T: **Recombinant expression of hydroxylated human collagen in Escherichia coli.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, 98:4445-4455. doi:10.1007/s00253-013-5447-z
- [33] Li L, Fan D, Ma X, Deng J, He J: **High-level secretory expression and purification of unhydroxylated human collagen alpha1(III) chain in Pichia pastoris GS115.** *Biotechnol Appl Biochem* 2015, 62:467-475. doi:10.1002/bab.1297
- [34] Xu J, Wang LN, Zhu CH, Fan DD, Ma XX, Mi Y, Xing JY: **Co-expression of recombinant human prolyl with human collagen alpha1 (III) chains in two yeast systems.** *Lett Appl Microbiol* 2015, 61:259-266. doi:10.1111/lam.12447
- [35] Kubisch HM, Hernandez-Ledezma JJ, Larson MA, Sikes JD, Roberts RM: **Expression of two transgenes in in vitro matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection.** *J Reprod Fertil* 1995, 104:133-139. doi:10.1530/jrf.0.1040133
- [36] Yoshizumi A, Yu Z, Silva T, Thiagarajan G, Ramshaw JA, Inouye M, Brodsky B: **Self-association of streptococcus pyogenes collagen-like constructs into higher order structures.** *Protein Sci* 2009, 18:1241-1251. doi:10.1002/pro.134
- [37] Houdebine LM: **Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009, 32:107-121. doi:10.1016/j.cimid.2007.11.005
- [38] John DC, Watson R, Kind AJ, Scott AR, Kadler KE, Bulleid NJ: **Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk.** *Nat Biotechnol* 1999, 17:385-389. doi:10.1038/7945
- [39] Houdebine LM: **The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals.** *Reprod Nutr Dev* 1995, 35:609-617. doi:10.1051/rnd:19950601
- [40] Perret S, Merle C, Bernocco S, Berland P, Garrone R, Hulmes DJ, Theisen M, Ruggiero F: **Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation.** *J Biol Chem* 2001, 276:43693-43698. doi:10.1074/jbc.M105507200
- [41] Perret S, Eble JA, Siljander PR, Merle C, Farndale RW, Theisen M, Ruggiero F: **Prolyl hydroxylation of collagen type I is required for efficient binding to integrin alpha 1 beta 1 and platelet glycoprotein VI but not to alpha 2 beta 1.** *J Biol Chem* 2003, 278:29873-29879. doi:10.1074/jbc.M304073200
- [42] Zhang C, Baez J, Pappu KM, Glatz CE: **Purification and characterization of a transgenic corn grain-derived recombinant collagen type I alpha 1.** *Biotechnol Prog* 2009, 25:1660-1668. doi:10.1002/btpr.257
- [43] Peng YY, Howell L, Stoichevska V, Werkmeister JA, Dumsday GJ, Ramshaw JA: **Towards scalable production of a collagen-like protein from Streptococcus pyogenes for biomedical applications.** *Microb Cell Fact* 2012, 11:146. doi:10.1186/1475-2859-11-146
- [44] Peng YY, Yoshizumi A, Danon SJ, Glatzauer V, Prokopenko O, Mirochnitchenko O, Yu ZX, Inouye M, Werkmeister JA, Brodsky B, Ramshaw JA: **A Streptococcus pyogenes derived collagen-like protein as a non-cytotoxic and non-immunogenic cross-linkable biomaterial.** *Biomaterials* 2010, 31:2755-2761. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.12.040
- [45] Stoichevska V, An B, Peng YY, Yigit S, Vashi AV, Kaplan DL, Werkmeister JA, Dumsday GJ, Ramshaw JA: **Formation of multimers of bacterial collagens through introduction of specific sites for oxidative crosslinking.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2016, 104:2369-2376. doi:10.1002/jbm.a.35772
- [46] Dravida S, Gaddipati S, Griffith M, Merrett K, Lakshmi Madhira S, Sangwan VS, Vemuganti GK: **A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation.** *J Tissue Eng Regen Med* 2008, 2:263-271. doi:10.1002/term.91
- [47] Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, Scaiano JC, Watsky MA, Shinozaki N, Lagali N, et al: **Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes.** *Biomaterials* 2008, 29:1147-1158. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.011
- [48] Islam MM, Griffith M, Merrett K: **Fabrication of a human recombinant collagen-based corneal substitute using carbodiimide chemistry.** *Methods Mol Biol* 2013, 1014:157-164. doi:10.1007/978-1-62703-432-6\_10
- [49] Wang Y, Cui FZ, Hu K, Zhu XD, Fan DD: **Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen.** *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 2008, 86b:29-35. doi:10.1002/jbm.b.30984
- [50] Ramirez-Rodriguez GB, Delgado-Lopez JM, Iafisco M, Montesi M, Sandri M, Sprio S, Tampieri A: **Biomimetic mineralization of recombinant collagen type I derived protein to obtain hybrid matrices for bone regeneration.** *J Struct Biol* 2016. doi:10.1016/j.jsb.2016.06.025
- [51] Pulkkinen HJ, Tiitu V, Valonen P, Jurvelin JS, Lammi MJ, Kiviranta I: **Engineering of cartilage in recombinant human type II collagen gel in nude mouse model in vivo.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, 18:1077-1087. doi:10.1016/j.joca.2010.05.004
- [52] Wu B, Zheng QX, Guo XD, Wu YC, Wang Y, Cui FZ: **Preparation and ectopic osteogenesis in vivo of scaffold based on mineralized recombinant human-like collagen loaded with synthetic BMP-2-derived peptide.** *Biomedical Materials* 2008, 3. doi:10.1088/1748-6041/3/4/044111
- [53] Hao W, Dong JL, Jiang M, Wu JW, Cui FZ, Zhou DS: **Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold.** *International Orthopaedics* 2010, 34:1341-1349. doi:10.1007/s00264-009-0946-3
- [54] Zhu C, Fan D, Duan Z, Xue W, Shang L, Chen F, Luo Y: **Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering.** *J Biomed Mater Res A* 2009, 89:829-840. doi:10.1002/jbm.a.32256

- [55] Zhang J, Zhou A, Deng A, Yang Y, Gao L, Zhong Z, Yang S: **Pore architecture and cell viability on freeze dried 3D recombinant human collagen-peptide (RHC)-chitosan scaffolds.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, 49:174-182. doi:10.1016/j.msec.2014.12.076
- [56] Olsen D, Yang C, Bodo M, Chang R, Leigh S, Baez J, Carmichael D, Perala M, Hamalainen ER, Jarvinen M, Polarek J: **Recombinant collagen and gelatin for drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2003, 55:1547-1567. doi:10.1016/j.addr.2003.08.008
- [57] Yamada K, Yamaura J, Katoh M, Hata K-i, Okuda K, Yoshie H: **Fabrication of Cultured Oral Gingiva by Tissue Engineering Techniques Without Materials of Animal Origin.** *Journal of Periodontology* 2006, 77:672-677. doi:10.1902/jop.2006.050223
- [58] Muhonen V, Narcisi R, Nystedt J, Korhonen M, van Osch GJ, Kiviranta I: **Recombinant human type II collagen hydrogel provides a xeno-free 3D micro-environment for chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** *J Tissue Eng Regen Med* 2015. doi:10.1002/term.1983
- [59] Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, Uitto J, Keene D, Chen M: **Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa.** *J Invest Dermatol* 2013, 133:1910-1913. doi:10.1038/jid.2013.10
- [60] Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR, Dravida S, Lagali N, Shinozaki N, Watsky MA, Munger R, Kato Y, Li F, et al: **Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:3887-3894. doi:10.1167/iovs.07-1348
- [61] Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S: **Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration.** *Biotechnol Adv* 2014, 32:449-461. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.010
- [62] Lagali N, Griffith M, Fagerholm P, Merrett K, Huynh M, Munger R: **Innervation of tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes: a comparative in vivo confocal microscopy study.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:3895-3902. doi:10.1167/iovs.07-1354
- [63] Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, Merrett K, Jackson WB, Polarek JW, Suuronen EJ, Liu Y, Brunette I, Griffith M: **Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold.** *Biomaterials* 2014, 35:2420-2427. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.079