



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS  
TEGUMENTARIOS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES  
*DE Cassiopea xamachana*

Tesis que presenta

**IRVING FERNÁNDEZ CERVANTES**

En opción al título de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (MATERIALES  
POLIMÉRICOS)**

Mérida, Yucatán Noviembre de 2018





*DEDICATORIA*

*A mi gran apoyo incondicional y mi compañero de vida Miguel Ángel*

*A mi Madre un  
gran ejemplo de  
valor*

*A mi Padre*

*A mi familia*

*A mi asesora y amigas Nayeli, Lorena  
Gracias por apoyarme en los momentos complejos de la vida*

*A la Universidad Modelo y compañeros de trabajo por su gran  
apoyo en la corta carrera científica que apenas comienzo.*

*A mi abuela Teresita, Sobrinos, Tíos, Primos, Cuñados, Suegra.*

*Al esfuerzo, verdad y justicia.*



## **Agradecimientos académicos**

Agradecimiento al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme desarrollar en sus instalaciones la mayoría de los experimentos contenidos en este documento.

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 762853.

Agradecimiento a los proyectos 1360 y 248378 por el apoyo financiero para la instalación del laboratorio de Biomateriales, Unidad de Materiales de CICY.

Profundamente agradezco a mi asesora la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por el gran apoyo, las enseñanzas, consejos del ámbito académico y de vida, ya que siempre procuró contribuir para mi superación profesional y personal.

Quiero agradecer a los miembros del comité tutorial, conformados por el Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez y por la Dra. Lorena Violeta León Deniz, por sus consejos y apoyo. Gracias por darle seguimiento a este camino que apenas comienza.

Agradezco de manera especial a la Universidad Modelo por su apoyo institucional para facilitar los tiempos requeridos para realizar este trabajo de investigación. En especial al Ing. David Palomo Torres coordinador del departamento de ingeniería biomédica y al M.C. Carlos Eliseo Sauri Quintal, director de la escuela de Ingeniería. Además, agradezco al Dr. Víctor Castaño Meneses por su gran ayuda, apoyo y guía en la interpretación de las caracterizaciones realizadas.

También agradezco a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, al M. en C. José Armando Muñoz Sánchez, a todo su equipo de trabajo de la Unidad de Bioquímica y biología molecular de plantas y a los Técnicos Wilberth Antonio Herrera Kao y Santiago Duarte Aranda por su apoyo técnico durante la realización en las pruebas de caracterización.



## **Agradecimientos a título personal**

No podía faltar mi agradecimiento a mis amigos (as), Mario, José Adrián, Ricardo, Alejandra, Marco, Lizbeth, Pati, Lorena, Nayeli, Cielo, Ariana, Noemí, Wilberth y a todos mis compañeros del laboratorio de Biomateriales. A todos mis alumnos de la carrera de Ingeniería Biomédica por su apoyo incondicional.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	9
LISTADO DE TABLAS .....	11
LISTADO DE FIGURAS .....	12
GLOSARIO .....	14
RESUMEN .....	17
INTRODUCCIÓN .....	19
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general .....	21
Objetivos específicos.....	21
HIPÓTESIS .....	22
Capítulo 1 ANTECEDENTES .....	23
1.1    Ingeniería tisular .....	23
1.2    Sistema tegumentario .....	25
1.3    Remodelación de la membrana cutánea .....	28
1.4    Andamios tegumentarios .....	30
1.5    Colágena .....	32
1.6    Polímeros colagénicos de origen marino.....	34
1.7 <i>Cassiopea xamachana</i> .....	35
1.8    Procesos de descelularización .....	39
Capítulo 2 SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	41
2.1    Muestreo dirigido. ....	41

2.2	Proceso de descelularización para la obtención de andamios. ....	42
2.3	Caracterización del andamio tegumentario .....	44
2.4	Caracterización biológica de andamios tegumentarios .....	46
2.5	Análisis estadístico .....	48
Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		49
3.1	Porcentaje de descelularización de andamios tegumentarios .....	49
3.2	Caracterización topográfica y estructural del andamio tegumentario .....	50
3.3	Caracterización fisicoquímica del andamio tegumentario.....	56
3.4	Caracterización mecánica del andamio tegumentario .....	68
3.5	Ensayos de proliferación celular del andamio tegumentario.....	73
CONCLUSIONES .....		76
PERSPECTIVAS .....		77
BIBLIOGRAFÍA .....		78
Capítulo 4 .....		87
ANEXOS .....		87
ANEXO A. Carta de Consentimiento informado.....		88
ANEXO B. Comprobación estadística del proceso de descelularización.....		90
ANEXO C. Comprobación estadística de la determinación de proliferación celular .....		94

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1. Porcentaje másico de los elementos presentes en las cenizas remanentes en los andamios. ND = No detectado. ....	64
Tabla 3.2. Tabla de modulo elástico de andamios .....	72
Tabla 4.1. Pruebas de Normalidad para ng/mL.....	91
Tabla 4.2. Análisis de Varianza de los nanogramos por mililitro de DNA presente en cada muestra Vs Tratamiento de descelularización.....	92
Tabla 4.3. Tabla de resultados del análisis de Tukey.....	94
Tabla 4.4. Análisis de Varianza de absorbancia del análisis de proliferación celular Vs los efectos principales de las fuentes de variación.....	95

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema de los componentes fundamentales para la ingeniería tisular. ....	25
Figura 1.2. Esquema representativo de las secciones de la piel humana. ....	28
Figura 1.3. Esquema representativo del proceso de reparación de heridas cutáneas .....	30
Figura 1.4. Estructura de triple hélice de la CLG.....	33
Figura 1.5. Ciclo de vida de <i>C. xamachana</i> .....	36
Figura 1.6. Esquema representativo de <i>C. xamachana</i> . ....	38
Figura 2.1. Laguna costera de Chelem y el sitio de estudio .....	41
Figura 2.2. Diagrama de procesamiento de andamios tegumentario. ....	43
Figura 2.3. Probetas de andamios tegumentarios .....	46
Figura 3.1. Gráfico de barras de la cuantificación de ADN .....	49
Figura 3.2. Secciones tisulares del andamio nativo. ....	51
Figura 3.3. Microscopías ópticas de andamios tegumentarios descelularizados .....	53
Figura 3.4 Micrografía SEM del tejido nativo de la medusa invertida. ....	55
Figura 3.5 Micrografía SEM del andamio de andamios descelularizados .....	55
Figura 3.6. Micrografía SEM de la membrana cutánea humana.....	55

Figura 3.7. Patrones electroforéticos de CLG.....	56
Figura 3.8. Espectros FTIR en intervalo de 4000 -600 $\text{cm}^{-1}$ .....	58
Figura 3.9. Espectros FTIR en intervalo de 4000 -2700 $\text{cm}^{-1}$ .....	59
Figura 3.10. Espectros FTIR en intervalo de 1800-850 $\text{cm}^{-1}$ .....	60
Figura 4.1 Gráfico de frecuencias para ng/mL.....	91
Figura 4.2. Residuales con respecto a la variable de respuesta rendimientos.....	93
Figura 4.6. Residuales con respecto a la variable de respuesta absorbancia.....	96
Figura 4.7. Efectos sobre la variable de absorbancia.....	98
Figura 4.8. Efectos de interacción entre los factores para a la variable de respuesta .....	99

## GLOSARIO

<b>AC</b>	Ausencia de canales radiales
<b>ACI</b>	Ausencia de canales interradales
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AM</b>	Ausencia de células mioepiteliales
<b>AZ</b>	Ausencia de zooxantelas
<b>C</b>	Canales radiales
<b>CEA</b>	Autoinjerto epitelial cultivado
<b>CI</b>	Canales interradales
<b>CLG</b>	Colágena
<b>CO</b>	Células en forma esferoidal
<b>DSC</b>	Calorimetría Diferencial de Barrido
<b>E</b>	Módulo elástico a tensión
<b>EEB</b>	Encefalopatía espongiiforme bovina
<b>EET</b>	Encefalopatía espongiiforme transmisible
<b>en</b>	Endodermo
<b>ex</b>	Exumbrela
<b>F</b>	Extensiones citoplasmáticas, a través de filipodias
<b>FDA</b>	Departamento de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>ff</b>	Fibras finas

<b>FT-IR</b>	Espectroscópica infrarroja por transformada de Fourier
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>IT</b>	Ingeniería tisular
<b>M</b>	Células epitelio-musculares o células mioepiteliales
<b>MEC</b>	Matriz extracelular.
<b>MR</b>	Módulo de ruptura
<b>mu</b>	Músculo de natación subumbral
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>Rcelulares</b>	Restos de material celular
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>TE</b>	Tejido epitelial
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>TGF-β</b>	Factor transformante de crecimiento tipo beta
<b>tf</b>	Fibras tangenciales gruesas
<b>Vf</b>	Fibras verticales gruesas
<b>Z</b>	Zooxantelas
<b>+Dcel</b>	Andamio descelularizado

**-Dcel**

Tejido de *C. xamachana* sin descelularizar

## RESUMEN

La interrupción de la membrana cutánea es considerada la tercera causa de mortandad en México, basados en datos del INEGI. Con el desarrollo de la tecnología, se han propuesto diversas estrategias para subsanar este problema, siendo una alternativa emplear organismos de origen marino, debido a que algunos elementos constitutivos y estructurales se asemejan a la piel humana. El presente trabajo se enfocó en generar andamios tegumentarios a partir de polímeros naturales, aprovechando la campana de *Cassiopea xamachana* utilizando procesos de descelularización. El andamio obtenido presentó un 70% de descelularización, lo cual se determinó a través de la cuantificación espectrofotométrica del ADN residual. Los resultados del análisis electroforético y de espectroscopia infrarroja, mostraron que el andamio se constituye principalmente de colágena tipo I. Además, utilizando las pruebas de calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría se demuestran las temperaturas de desnaturalización y degradación de este polímero. Mediante las micrografías ópticas y electrónicas se observó que los andamios sufren algunos cambios morfológicos o topográficos en comparación con el tejido nativo antes de realizar el proceso de descelularización. En cuanto a los ensayos de resistencia mecánica a tensión, el andamio presenta un modulo de elasticidad de 4.53 MPa, en comparación con el modulo observado en la piel humana (0.64 MPa). De manera conjunta, el análisis químico elemental mostró que el andamio carece de elementos toxicos para el ser humano. Finalmente, la viabilidad de la proliferación de fibroblastos humanos en los andamios fue de 20% superior al control positivo (medio de cultivo), sugiriendo ser biocompatible para su aplicación en ingeniería tisular de la membrana cutánea.

## ABSTRACT

Interruption of cutaneous membrane is considered the third cause of death in Mexico, based on INEGI data. In particular, few reserchs have been studied about the structure and composition of biopolymers obtained using marine organisms, because both its composition and structure resembles the architecture of human dermic tissue. In this context, the present study aims to generate scaffolds from *C. xamachana* with application in skin tissue engineering, using decellularization processes. Scaffold showed 70% decellularization, which was determined through the spectrophotometric quantification of the residual DNA. Results of electrophoretic and infrared spectroscopy analysis showed that scaffolds is mainly composed of Collagen type I. In addition, the denaturation and degradation temperatures of this polymer were determined by differential scanning calorimetry and thermogravimetry test. Also, optical and electronic micrographs of scaffolds undergo some morphological or topographic changes in comparison with the native tissue before decellularization process. Tensile mechanical tests of scaffolds showed an elastic modulus of 4.53 MPa in comparison with cutaneous membrane (0.64 MPa). Finally, the fibroblast viability onto scaffolds was 20% higher than positive control (culture medium), suggesting potential of the scaffolds for its application in tissue engineering of cutaneous membrane.

# INTRODUCCIÓN

La pérdida o interrupción de la integridad del sistema tegumentario, generada por cuestiones genéticas o por lesiones traumáticas de la membrana cutánea (comúnmente conocidas como heridas en la piel), son uno de los problemas de salud de alto coste para cualquier nación, y un desafío para los pacientes, profesionales de la salud y sistemas sanitarios [1–3]. En el último siglo, el incremento en el desarrollo de biomateriales de origen sintético y natural para su aplicación como promotores de reparación del tejido tegumentario ha sido notorio. Sin embargo, el reto actual es biomimetizar las propiedades físicas, químicas y biológicas del tejido receptor, por ejemplo: el arreglo estructural de la matriz extracelular (MEC), la interconectividad en cuanto a su porosidad, la composición química análoga a los constituyentes bioactivos presentes en la piel, la funcionalidad mecánica y estabilidad estructural, así como la biocompatibilidad y la vascularización, entre otras características [4,5].

En este sentido, una gran diversidad de biomateriales obtenidos a partir de polímeros degradables, tanto sintéticos como naturales han sido aprobados y estudiados con gran atención en el área de regeneración de la membrana cutánea, presentando propiedades mecánicas propias del tejido receptor, biocompatibilidad, proliferación y conducción celular, especialmente de la estirpe fibroblastoide [5–8]. El principal componente empleado en este tipo de aplicaciones es la CLG; uno de los biopolímeros primordiales en la constitución de la MEC, representando el 30% del componente proteico, siendo la proteína más abundante presente en mamíferos [9–12]. De acuerdo al potencial médico que representa la CLG, se han explorado diversos procesos y fuentes de obtención, dentro de las cuales destaca la hidrólisis química e hidrólisis enzimática utilizando organismos de origen terrestre como bovino, roedores, porcino, entre otros [6–10,12–16]. En organismos marinos, son varias las propuestas que se han validado sobre la estructura y composición de sus biopolímeros [17–28]. Algunos de reciente interés son los invertebrados, dentro de los cuales podemos encontrar la clase Asteroidea, Echinoidea, Scyphozoa, Cephalopoda y organismos del phylum Porífera, siendo los de la clase Scyphozoa los que más han llamado la atención por su abundancia y composición estructural [18–20,22–29]. Las medusas que pertenecen a esta clase, han sido empleadas para obtener polímeros colagénicos, un claro ejemplo es la empresa Jellagen Marine Biotechnology®, que hoy en día

comercializa una gran cantidad de biomateriales colagénicos de origen marino derivados de la especie *Rhizostoma pulmo* (aguamala, aguamar o acalefo azul) para distintas aplicaciones biomédicas [28,30]. Sin embargo, el aprovechamiento de la medusa invertida (*C. xamachana*) para la obtención de biopolímeros y/o andamios con aplicación en ingeniería de tejido tegumentario es nula, por lo tanto, determinar la viabilidad para su aplicación, es una posible alternativa interesante de evaluar.

Una parte medular para la generación de andamios que emulen las propiedades del tejido tegumentario, es su distribución estructural multicapa [4,5,9,13,31]. El avance de los diferentes procesos de obtención de andamios tegumentarios ha permitido desarrollar técnicas como la descelularización de órganos, que permite la conservación de la micro-arquitectura del tejido seleccionado [6,8,14–16,32].

En este trabajo, se propone generar un andamio aprovechando la micro-arquitectura de la MEC presente en *C. xamachana*, utilizando la técnica de descelularización para su obtención. Este andamio pretende asemejar las propiedades y distribución estructural del tejido tegumentario humano para su aplicación en patologías dérmicas. El andamio será caracterizado utilizando técnicas fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas, además de pruebas de proliferación celular para conocer sus propiedades de biocompatibilidad.

## **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

Obtener y caracterizar un andamio tegumentario obtenido a partir de la medusa invertida *C. xamachana*.

## **Objetivos específicos**

1. Obtener andamios tegumentarios a partir de la campana de *C. xamachana*, mediante descelularización con detergentes.
2. Determinar las propiedades del andamio tegumentario, como su morfología mediante microscopía (SEM y MO), composición utilizando técnicas espectroscópicas y electroforéticas (FTIR, EDS, SDS-PAGE), térmicas (TGA y DSC), así como sus propiedades mecánicas de resistencia a tensión.
3. Comprobar las propiedades de biocompatibilidad del andamio tegumentario mediante ensayos *in vitro* en presencia de fibroblastos humanos de acuerdo a la norma ISO 10993-5.

## **HIPÓTESIS**

La descelularización de la campana de la medusa invertida (*C. Xamachana*) permitirá la obtención de un andamio con potencial aplicación en la ingeniería del tejido tegumentario.

# Capítulo 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 Ingeniería tisular

El término “ingeniería tisular” (IT) fue definido por primera vez por Skalak y Fox en 1988 como la necesidad de conjuntar principios de ingeniería y biología en la generación y desarrollo de sustitutos funcionales que restauren, mantengan y/o mejoren la integridad de tejidos dañados por males genéticos, lesiones traumáticas, fallos bioquímicos y/o estructurales [35]. Posteriormente al trabajo de Skalak y Fox, esta disciplina fue acuñada y puesta en práctica por Langer y Vacanti como una nueva área de la biomedicina con su famoso trabajo en Science [36].

Se conoce de fuentes históricas que las primeras terapias basadas en tejidos fueron técnicas de injerto de la membrana cutánea, las cuales se describen con gran detalle en textos sánscritos de la india, datando del 3000 antes de Cristo. Subsecuente a estos hechos, en el año 1794 se realizó el primer injerto autólogo de membrana cutánea en Europa, a cargo de Bunger, Reverdin y Baronio. En 1881 Girder realizó el primer aloinjerto de la piel de cadáver a un paciente. Como continuación al trabajo de Girder, Webster propuso la refrigeración de la membrana cutánea obtenida de cadáveres para su preservación. Setenta años posteriores a estas investigaciones, y gracias a los trabajos desarrollados por Polge con respecto a la criopresevación celular a temperaturas bajo cero, en 1952 Billingham genera el primer proceso de crioconservación de piel, presentando una alternativa viable para la aplicación de aloinjertos de calidad en su época.

Con el desarrollo de la ingeniería de los materiales al término de la segunda guerra mundial, en 1962 Chardack desarrolló un material polimérico sintético denominado “*Esponja Ivalon*” procesada y pensada para su aplicación como "sustituto sintético de piel". Rheinwald y Green en 1975 desarrollaron la primera técnica estándar para el cultivo *in-vitro* de queratinocitos, hecho que utilizarían como base de su investigación la empresa Genzyme para generar su producto ® Epicel, el cual es básicamente epitelio autólogo cultivado con este tipo celular.

Posterior a este trabajo, en los años 80's se generó un auge en el desarrollo de prototipos en la ingeniería del tejido tegumentario que posteriormente, se convirtieron en productos aún hoy utilizados, tal es el caso de ® Apligraf y ® Dermagraf. El impacto social generado fue tal que, a partir de ese momento se tomó a este naciente campo como una nueva área de desarrollo de tecnologías e investigación de las ciencias biomédicas, el cual se ha vuelto de vital importancia para la mejora de la calidad de vida del ser humano en este siglo [13,37,38].

En general, la IT consiste básicamente en la generación de soportes o andamios a partir de biomateriales los cuales, son complementados por la adición de biomoléculas activas como los factores de crecimiento, entre otros. Dichos constructos deben proporcionar un soporte inicial para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, que garantice la síntesis de la MEC, la cual a su vez ofrecerá integridad estructural al tejido. Idealmente deben ser biocompatibles, biodegradables y bioactivos; con la finalidad de ser metabolizados por el organismo, una vez que hayan cumplido con su función [39]. A la triada formada por el andamio, las células sembradas y los demás factores añadidos al andamio para potenciar su comportamiento, se le da el nombre de constructo. Una vez que las células han sido sembradas en el andamio, éste es cultivado *in-vitro*, con la intención de promover en dicha triada la proliferación y crecimiento celular (Fig. 1.1).

En el área de IT, la concepción del andamio desempeña un papel crucial para promover un espacio idóneo en donde la célula pueda desempeñarse de manera adecuada como se mencionó anteriormente. Existe una gran diversidad de variables que pueden incitar a un diseño de andamio “ideal”, las cuales se establecen en función del comportamiento celular necesario para lograr una respuesta biológica fisiológica. Dentro de dichas variables se pueden mencionar:

1. La distribución y morfología macro y microestructural del andamio, así como su composición química, siendo diseñado con la finalidad de imitar la estructura del tejido por replazar.
2. Debe poseer propiedades mecánicas semejantes al sitio de implantación para soportar las cargas biomecánicas durante la regeneración del tejido a substituir.

3. No debe inducir algún tipo de respuesta adversa al organismo receptor y finalmente,
4. Su manufactura debe de ser controlada y estandarizada con la finalidad de que los lotes generados presenten las mismas propiedades entre sí [40-41].

Como se puede concluir de los puntos anteriores, cada tipo de tejido tiene requerimientos específicos que deben cumplirse para lograr su regeneración, tal es el caso del tejido de la membrana cutánea, el cual posee ciertas características mecánicas y morfológicas que le permiten llevar a cabo sus funciones. Obtener un andamio que permita la reparación de dicho tejido a partir del biomimetismo, constituye un reto actual.

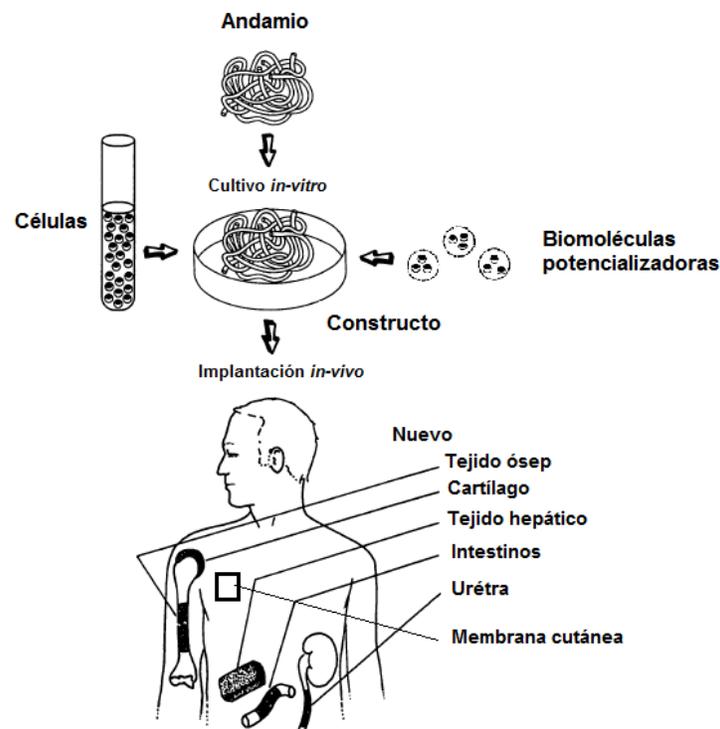


Figura 1.1 Esquema representativo de los componentes fundamentales para la ingeniería tisular. Basado en el reportado por Langer y Vacanti en 1993 [36].

## 1.2 Sistema tegumentario

Se denomina tegumento, sistema tegumentario o integumentario (del latín: *integumentum* = protección), a la organización estructural de tejido cutáneo responsable de proteger y separar la organización interna del medio ambiente externo; además de permitir interactuar entre sí, fungiendo en ocasiones como exoesqueleto (Fig. 1.2). Entre sus principales funciones se encuentran: la absorción de radiación solar (principalmente en la región del ultravioleta del espectro electromagnético) para la síntesis de vitamina D, el control del conjunto de fenómenos de autorregulación como la temperatura corporal, evitar la deshidratación, la vigilancia inmunológica, precepción sensorial, entre otras [3–5,13,31,41,42]. El sistema tegumentario representa el constituyente anatómico-estructural de mayor extensión y peso en los humanos recubriéndolo por completo, tanto externamente como en numerosas cavidades internas, teniendo un valor del 15% de su peso total. El tegumento se encuentra constituido por la membrana cutánea; comúnmente conocida como piel y por anexos o faneras cutáneas; los cuales son una serie de estructuras (vellosidad, glándulas sebáceas, sudoríparas, ecrinas y estructuras convexas queratinizadas, comúnmente conocidas como uñas) derivadas de los mismos esbozos embriológicos [5–7].

Para realizar sus funciones especializadas, la membrana cutánea debe cumplir algunos requerimientos básicos, como la semipermeabilidad, brindada por el epitelio. Además, necesita estar dotada de resistencia mecánica, proporcionada por un entramado de apoyo generado a partir de los componentes de la MEC segregada por los fibroblastos. Más aún, requiere una precisa y continua irrigación sanguínea para el transporte de sustancias, siendo la principal vía de acceso de las células inmunitarias de la piel. Finalmente se sabe que las fibras nerviosas son necesarias para transmitir información hacia el sistema nervioso central, además de distribuir señales en dirección opuesta, por ejemplo hacia las glándulas y músculos que se ubican en ella [9–12]. La piel está constituida por tejidos de origen embriológico y estructura tisular distintos, la sección superficial de la membrana cutánea se desarrolla a partir del ectodermo del embrión, propiciando el nacimiento de la capa denominada epidermis, seguida por la sección cuyo origen embriológico proviene del mesodermo, nombrada como dermis (cutis). Algunos autores mencionan que existe una tercera capa conocida como hipodermis o tejido subcutáneo [3,42,43]. La epidermis es la cubierta más externa de este órgano, constituido por seis estratos (córneo, lucido, granuloso, espinoso y germinativo o basal) y dos grupos celulares distintos

(células no dendríticas o queratinocitos y células dendríticas como los meloncitos y células de Langerhans), aunque también se encuentran los linfocitos que arriban a la epidermis para intervenir en las etapas iniciales de la respuesta inmunológica del organismo. Esta capa carece de irrigación sanguínea y de inervación propia. La diferenciación y especialización de la epidermis radica en sus corpúsculos, teniendo como fin principal generar una población superficial de células muertas de abundantes filamentos intermedios de queratina, dentro de los cuales se deposita cierta cantidad de lípidos para formar esta sección de la membrana cutánea, carente de CLG [3,42–44]. La dermis es la sección conjuntiva de la piel, esta capa se encuentra estructurada por dos estratos de tejido conjuntivo fibroso yuxtapuesto entre sí, pero sin límites específicos (al estrato superficial se le conoce como papilar y al más profundo como reticular). El estrato papilar se encuentra constituido por tejido conjuntivo laxo, integrado por haces finos y entrecruzados de fibras colagénicas (tipo I y tipo III) y elastina. Es conocido de esta manera debido a que genera una serie de elevaciones llamadas papilas conjuntivas que se introducen entre prolongaciones epiteliales de la epidermis, confiriéndole un aspecto irregular a la línea de unión entre epidermis y dermis. El estrato reticular es el más profundo y el de mayor grosor, integrado por una malla de tejido conjuntivo denso irregular. Esta sección, se encuentra extensamente vascularizada e inervada, siendo penetrada por capilares sanguíneos, a través de las papilas conjuntivas hasta el límite dérmico-epidérmico, liberando allí sustancias nutritivas necesarias para el metabolismo de las capas más profundas de la epidermis. Tanto en el estrato papilar como en el reticular, se presentan terminaciones nerviosas que captan sensaciones de dolor o diferentes intervalos de temperatura de tacto fino (a partir de los discos de Merkel y los corpúsculos de Meissner) y de tacto profundo, o de presión (censado por los corpúsculos de Vater Paccini). Finalmente, la hipodermis (constituida por tejido conjuntivo laxo), que sirve de unión flexible entre la membrana cutánea y los tejidos subyacentes. Contiene tejido adiposo en cantidades variables, además de abundantes vasos sanguíneos de calibre mayor que en la dermis. En ciertos casos es posible encontrar en esta capa las secciones más profundas de los folículos pilosos y de algunas glándulas sudoríparas, siendo su principal función la amortiguación térmica y mecánica [3,42,43]

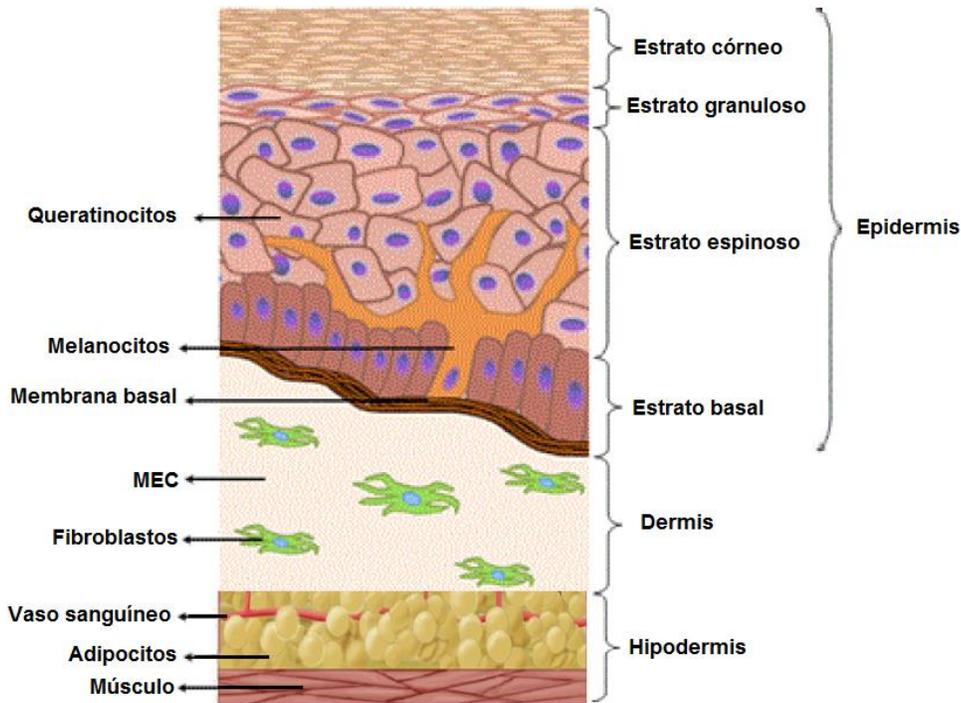


Figura 1.2. Esquema representativo de las secciones de la piel humana. Basado en el reportado por Long en 2015 [31].

### 1.3 Remodelación de la membrana cutánea

Al momento de existir lesiones traumáticas que comprometen la integridad de la membrana cutánea, se genera un proceso dinámico denominado cicatrización o remodelación (Fig. 1.3), que consta de cuatro fases interconectadas y dependientes de la activación y acción celular que estimulan el crecimiento y reparación del tejido. La primera fase conocida como coagulación, comienza a los 15 minutos posteriores a la interrupción de la membrana cutánea, su función es evitar la pérdida de fluido sanguíneo por medio de la formación de una masa conglomerada semisólida de sangre denominada coagulo. Esta fase se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular, la vasodilatación y el aumento de la salida de plasma sanguíneo. En este punto se produce la activación celular, así como la mediación y andamiaje para las células que promueven la siguiente fase y la regeneración de la membrana cutánea [45–47].

La segunda fase denominada inflamación presenta su inicio temporal hacia el minuto 16 y presenta una duración de seis a diez días, en un proceso inflamatorio fisiológico [47]. Se genera

como una respuesta protectora que intenta destruir o aislar agentes patógenos para el tejido, mediante la remoción de células afectadas. Cabe mencionar que sin la remoción de tejido celular dañado no es posible iniciar el proceso de generación de nuevo tejido mediante la activación de los queratinocitos y fibroblastos. Por otro lado, en esta fase se generan el factor transformante de crecimiento tipo beta (TGF- $\beta$ ) y factores derivados de plaquetas (PDGF), los cuales estimulan la quimiotaxis de monocitos, neutrófilos y fibroblastos, células clave para la generación de la fase que se describe a continuación.

La tercera fase conocida como proliferación, es la precursora de la maduración de la membrana cutánea, e inicia los primeros dos a tres días posteriores a la generación del trauma, teniendo una duración de 15 a 20 días. El objetivo de esta fase es generar una barrera protectora, con la finalidad de aumentar los procesos regenerativos y evitar el ingreso de agentes nocivos, cicatrizando por la activación de dos grandes procesos: la angiogénesis y migración de fibroblastos. Estas facilitan la formación de una MEC provisional, que proporciona un andamiaje para la migración celular y la síntesis de una MEC madura [43–45]. En la primera etapa de la fase de proliferación, la migración de los fibroblastos a la zona afectada induce la deposición de MEC fibrilar, la cual presenta fibronectina. Conforme transcurre el tiempo (específicamente a la primera semana), estas mismas células generan una cantidad considerable de CLG, glicosaminoglicanos y proteoglicanos en respuesta a los estímulos producidos por los factores de crecimiento de la fase inflamatoria. Es preciso destacar que en esta penúltima fase, la célula dominante es el fibroblasto, que al generar factores de crecimiento de queratinocitos y en conjunto con las endoteliales, proliferan y promueven la producción de factores de crecimiento autócrinos para mantener su función en el endotelio. Para la cuarta y última fase conocida como maduración, se llevan a cabo procesos que tienen por objetivo organizar la MEC presente en la membrana cutánea, y de esta manera recuperar las características bioquímicas y mecánicas del tejido que forma la cicatriz. Este fenómeno sucede debido a la contracción de la herida, generada por los miofibroblastos y la organización de los paquetes de CLG. Esta última inicia simultáneamente con la síntesis de MEC en la fase de proliferación y puede durar entre uno y dos años, dependiendo la extensión y características de la lesión, esperando que para el primer año, la membrana cutánea recupere un ochenta por ciento de la integridad mecánica previo al trauma [46]. Por lo anteriormente expuesto, se puede deducir que cuando el proceso

de remodelación de la membrana cutánea se ve interrumpido, ya sea por alguna causa interna o externa, se produce una falla en la cicatrización, dando como resultado un proceso de cicatrización parcial, nulo, o incluso tener como consecuencia un crecimiento desmedido del tejido cicatricial, denominado queloide [48]. Tal como se menciona anteriormente, para estos casos se han desarrollado biomateriales capaces de servir como andamios celulares que puede apoyar o incluso activar diferentes células para conducir o inducir una continúa remodelación de este tejido; a continuación, se describen con mayor precisión.

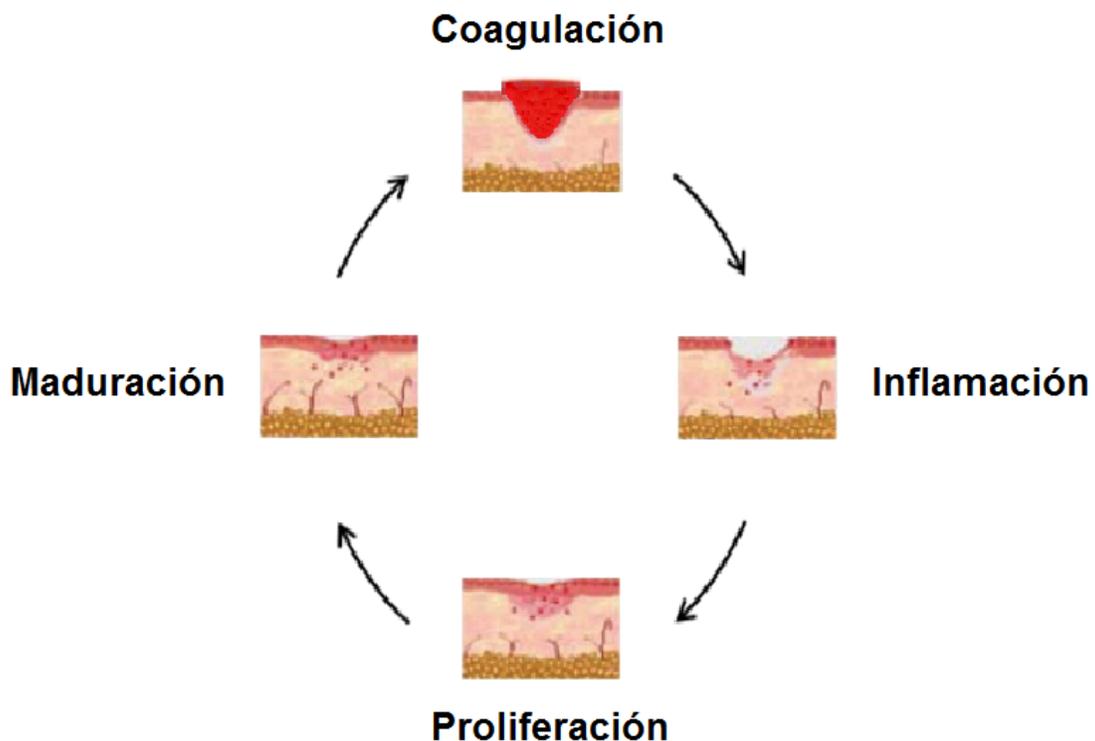


Figura 1.3. Esquema representativo del proceso de reparación de heridas cutáneas. Basado en el reportado por Pereira en 2013 [46].

#### 1.4 Andamios tegumentarios

En IT, un andamio se define como aquella estructura tridimensional obtenida a partir de

materiales biocompatibles, que proporcionan soporte estructural y entorno físico para las células, promoviendo su proliferación, crecimiento, migración y respuesta a señales específicas que les permitan un desarrollo progresivo [13,36–39]. La gran mayoría de los biomateriales utilizados para la generación de andamios con aplicación en ingeniería tisular, son de tipo polimérico, ya sea de origen sintético o natural [9–12, 14–18, 21–34, 40, 42]. Estas estructuras tienen por objetivo imitar a la MEC, por ejemplo, sus propiedades mecánicas en cuanto a su rigidez y elasticidad asociadas con las funciones tisulares, proporcionar activamente señales bioactivas a las células residentes para la regulación de sus actividades, actuar como un reservorio de factores de crecimiento y potenciar sus bioactividades, presentar una composición química viable para su aplicación, entre otras. Por lo tanto, debido a la complejidad de estos requisitos, el diseño y procesamiento de andamios en la mayoría de las ocasiones cumple parcialmente con su objetivo [1, 2, 9–12, 14–18, 21–34, 40, 42].

En cuanto al tejido tegumentario, a lo largo del tiempo se han planteado diversas estrategias para la síntesis y procesamiento de andamios, cuyas particularidades actualmente van desde proponer distintas geometrías utilizando tecnología de bioimpresión 3D [49,51], a obtener fibras con tamaño micro y nanométrico aprovechando la técnica de electrohilado [5]. Todos ellos con el objetivo de llegar a biomimetizar el tejido tegumentario [37,3,5,31,52], sin embargo estas herramientas dependen en su gran mayoría de factores como la calidad del diseño de la estructura a generar, además de factores técnicos. Es por esta razón que es vital buscar alternativas para generar dichas estructuras. Actualmente, han surgido diversas propuestas en aras de emular la macroestructura del tejido tegumentario, utilizando distintas técnicas de descelularización de MEC proveniente de piel humana para su aplicación como aloinjerto y de tejido tegumentario de origen animal como xenoinjerto, los cuales presentan en general una composición bioquímica similar a la membrana cutánea, ya que se encuentran compuestos principalmente de polímeros colagénicos [4,6,13–16,31]. A pesar de esto, la disposición de donación de órganos es escasa, aunado al control cada vez más estricto del uso de tejidos animales procedentes de ganado porcino y bovino, debido a las EEB y EET, convirtiéndose en potenciales vectores virales que podrían ser transmisibles a humano. Lo anterior, incrementa la complejidad de utilizar este tipo de fuentes animales para la obtención de andamios poliméricos a base de CLG. Aunado a esto, recientemente Widdowson y colaboradores [28], aprovechando

modelos *in vivo* realizaron pruebas histológicas comparando los efectos de andamios de CLG obtenidos de diferentes especies, en función de la inflamación, necrosis, fibrosis y neovascularización causada por éstos, concluyendo que andamios provenientes de organismos de la clase Scyphozoa; específicamente de la especie *R. pulmo*, son prometedores para aplicaciones médicas, presentando propiedades al menos similares que la CLG bovina.

## 1.5 Colágena

La CLG (Fig. 1.4) es uno de los polímeros que se encuentran en mayor presencia y distribución en la MEC de tejidos animales, tanto vertebrados como invertebrados [17,18,42,52]. Siendo constituida por un conjunto de tres cadenas  $\alpha$ -polipeptídicas (1000 aminoácidos por cadena), agrupadas en una estructura entrelazada de tipo helicoidal. Cabe resaltar que esta estructura es la responsable de la rigidez y la resistencia de las fibras presentes en este biopolímero [10,12,53]. La glicina (Gli) constituye una tercera parte de los aminoácidos presentes en cada cadena, característica única entre todas las proteínas de los organismos. La repetición de 333 tripletes Gli-X-Y, conforman la estructura de cada una de las cadenas. En posición X se encuentra (en la mayoría de los casos) la prolina y en posición Y, se encuentran la hidroxiprolina o la hidroxilisina, dos aminoácidos que no son abundantes en la constitución de otro tipo de proteínas (Fig. 1.4). Existen al menos 31 tipos de CLG fibrilares conocidas hasta el momento, cuyo origen se encuentra en función de la estructura de las cadenas polipeptídicas o cadenas alfa presentes en su estructura. Ejemplos de éstos incluyen la CLG tipo I [ $\alpha 1$  (I)<sub>2</sub>  $\alpha 2$  (I)], siendo el principal componente de huesos, piel, tendones, ligamentos, córnea y órganos internos, cuyo porcentaje representa el 90% de la CLG corporal; la CLG tipo II [ $\alpha 1$  (II)<sub>3</sub>] que comprende la composición fibrilar del cartílago, disco intervertebral, notocorda y humor vítreo del ojo; la CLG tipo III [ $\alpha 1$  (III)<sub>3</sub>], que compone las fibrillas secundarias presentes en piel, vasos sanguíneos y órganos internos; CLG tipo V, fibrilinas compuestas por [ $\alpha 1$  (V)<sub>2</sub>  $\alpha 2$  (V) y  $\alpha 1$  (V)  $\alpha 2$  (V)  $\alpha 3$  (V)], que comprende tejidos similares a los que se componen de CLG tipo I, entre otros [12-28].

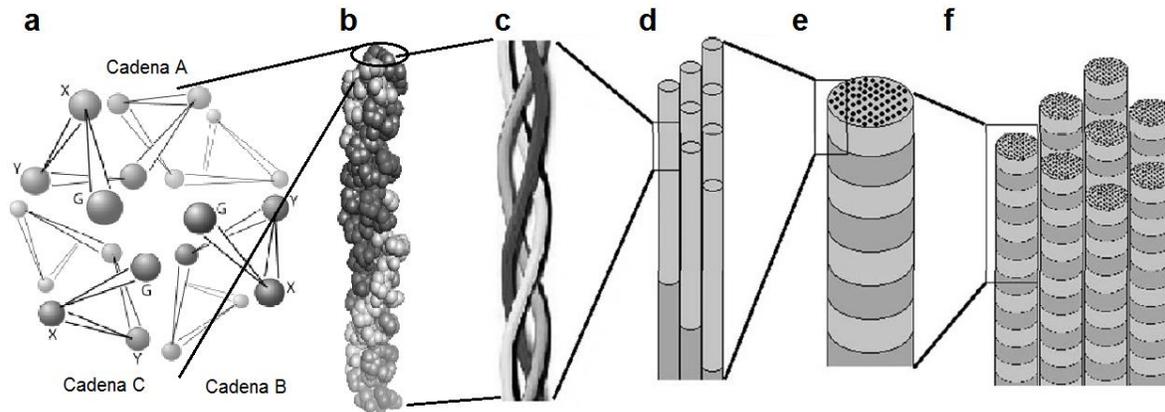


Figura 1.4. Estructura de triple hélice de la CLG: a) vista a lo largo del eje molecular (solo carbono), que muestra las rutas de las cadenas polipeptídicas individuales y las ubicaciones de los residuos en los tríos Gly-X-Y (G = Gly), b) vista desde un lado (molécula inclinada hacia el lector en la parte superior, representación llena de espacio), mostrando el giro helicoidal a la derecha, c) esquematización de un segmento de triple hélice de cadena  $\alpha$  de CLG, d) moléculas de tropocolágeno ensambladas. e) fibrilla de CLG que varía de 10 a 300 nm de diámetro y f) fibrillas de CLG agregadas que forman una fibra de CLG con un diámetro que varía desde 0.5 a 3  $\mu\text{m}$ , mostrando el patrón repetitivo intrafibrilar con dimensiones de 364 nm (secciones en color gris claro y oxford). Basado en el reportado por Bareil en 2010 [54].

Las características estructurales y de composición han posicionado a la CLG como uno de los biopolímeros de mayor auge e importancia en la IT de la membrana cutánea [5,9,54], debido a que es un polímero biodegradable, biocompatible y mejora la proliferación celular y la reparación de heridas [3,43,55], según el departamento de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés US Food and Drug Administration). Sin embargo, a pesar de la existencia de biomateriales colagénicos utilizados como andamios para la reparación y regeneración de este tejido, dichos andamios aún se encuentran lejos de poder ser viables económicamente para la mayoría de los pacientes.

Una alternativa para la generación de andamios de CLG es aprovechar organismos de origen marino, como la clase *Scyphozoa* a la cual pertenece *C. xamachana* [24, 26, 28–34], debido a que en nuestro país se encuentra en gran presencia, particularmente en la península de Yucatán

según un estudio propuesto por Lara y colaboradores [34], en donde se describe la repartición y profusión oficial del organismo en la laguna costera de Chelem. Por esta razón, utilizar técnicas de procesamiento y síntesis accesibles de biomateriales a base de polímeros colagénicos de origen marino [17–27,56] con aplicación en ingeniería tisular, es importante para la generación de andamios que impactarían de manera positiva a la salud humana.

## **1.6 Polímeros colagénicos de origen marino**

La diversidad biológica, química y de materiales del ambiente marino es un recurso extraordinario para el descubrimiento de nuevas aplicaciones para la extracción y generación de biomateriales (biopolímeros, bioadhesivos, etc.). Los avances tecnológicos recientes en la química de materiales bioinspirados, ensayos biológicos y biomiméticos, han generado un auge notable en la bioprospección y evaluación a nivel preclínico y clínico de varios tipos de biomateriales [17–24,24–27,56], prueba de ello es el establecimiento de empresas como Jellagen Marine Biotechnology® [28,30]. Con respecto a la obtención de polímeros colagénicos de origen marino, Song y colaboradores. [56] en 2006 obtuvieron andamios de CLG, aprovechando la mesoglea de la medusa *Stomolophus nomurai meleagris*, utilizando la técnica de extracción por maceración y precipitaciones ácidas. La CLG obtenida es biocompatible en ensayos *in vitro* con diversas estirpes celulares (fibroblastos humanos, células endoteliales, etc.).

Derivado de estas investigaciones, se ha incrementado el desarrollo de metodologías alternativas, aprovechando diversas fuentes de biopolímeros, tales como de origen marino [17–24,24–27,56]. Así mismo, se han propuesto nuevas alternativas que buscan mejorar las propiedades mecánicas y de degradación de los andamios obtenidos con polímeros de origen marino [20,25]. De esta manera, se ha logrado la generación de materiales compuestos, con una matriz polimérica de CLG y cargas de alginato de sodio [20], andamios con mayor estabilidad estructural y química utilizando técnicas de entrecruzamiento con luz ultravioleta [25] con aplicación en la regeneración de tejido tegumentario, entre otras [3–5,13,31,41,42]. De manera conjunta, para mejorar el proceso de regeneración del tejido tegumentario, se ha propuesto utilizar sobre los andamios células troncales mesenquimales, debido al potencial que tiene esta

línea celular en los procesos de reparación y regeneración dérmica [27]. A pesar del gran auge en la investigación para la generación de biomateriales de tipo colagénicos en la búsqueda de su aplicación en ingeniería tisular utilizando organismos de origen marino, son nulos los trabajos que aprovechen a la medusa invertida *C. xamachana*. Además, es preciso constatar que el procesamiento de los andamios aprovechando a *C.xamachana* como materia prima en el desarrollo de esta investigación, se basa en la descelularización de tejidos, con la finalidad de preservar el microarreglo estructural y la composición polimérica de la MEC de la especie [32]. Más aún, el proceso de descelularización en medusas es aún una técnica no utilizada en el aprovechamiento de la micro-arquitectura presente en la MEC de estos organismos, la cual pretende mimetizar la topografía y arquitectura de la piel humana.

## 1.7 *Cassiopea xamachana*

La especie *C. xamachana* es un organismo perteneciente al phylum Cnidaria, al subphylum Medusozoa clasificado en la clase Scyphozoa, familia *Cassiopidae*. Presentan a lo largo de su vida un tipo de reproducción con alternancia de generaciones o ciclo metagenético, es decir en general, poseen una fase con tipo de reproducción sexual en la etapa medusa, características por su movimiento por medio de hidropulsión y una fase con reproducción asexual en la etapa pólipo (sésil), aunque particularmente exhiben otro tipo de fases como la efíra, planula, escifostoma, entre otras (Fig. 1.5). El ciclo comienza con la reproducción sexual (Fig. 1.5, ciclo 1) cuando las medusas adultas liberan sus gametos en la columna de agua. Allí, los óvulos fertilizados con esperma se convierten en ciliados larvales de vida libre llamados planulas. Una vez que las larvas que nadan identifican un sustrato adecuado, se asienta y se desarrolla en un escifostoma. La etapa final se produce una vez que en esta fase ha adquirido a sus simbiontes denominados symbiodiniums, los cuales son algas, lo que desencadena la metamorfosis conocida como estrobilación y consecuentemente la formación de la fase efíra. Las efíras se liberan en la columna de agua creando una medusa de vida libre. En el componente asexual (Fig. 1.5, ciclo 2), el escifostoma desarrolla un brote que se libera al medio ambiente en forma de larva (Gemación). Se asienta y se transforma en un nuevo escifostoma y el ciclo se perpetúa. Paralelamente, a medida que se libera la efíra (Fig. 1.5, ciclo 3), puede regenerarse en un

escicistoma recién formado (líneas punteadas) e ingresar a la parte asexual del ciclo.

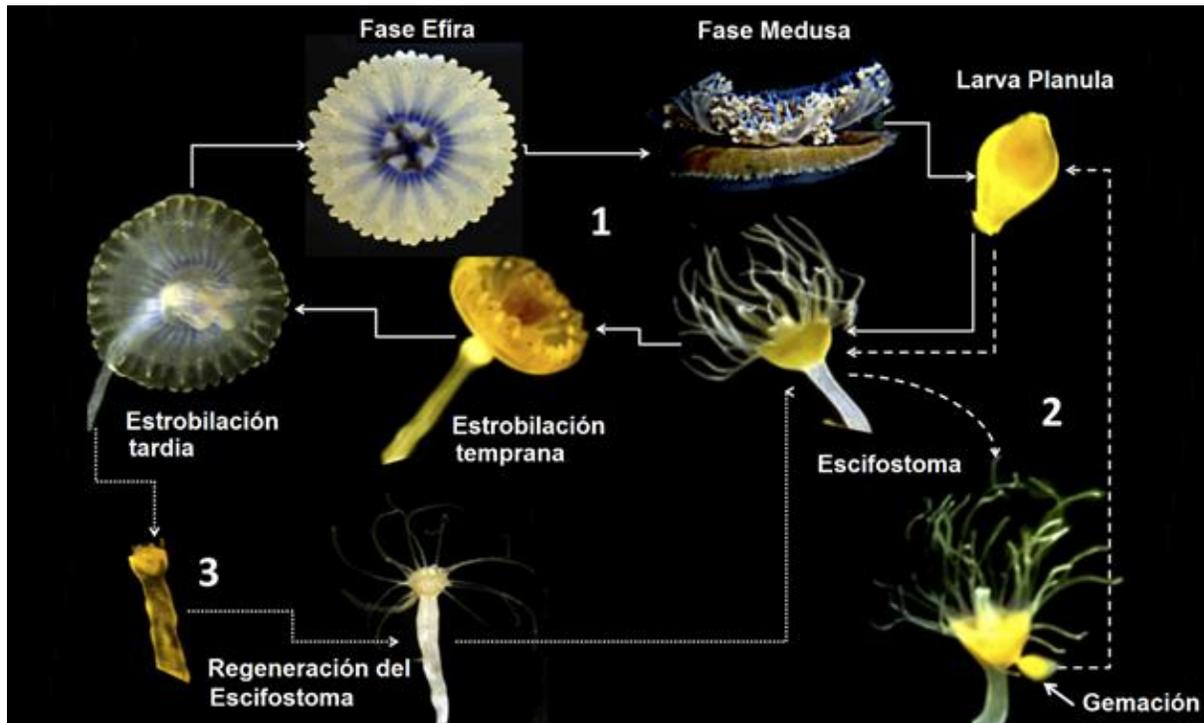


Figura 1.5. Ciclo de vida de *C. xamachana*. Basado en el reportado por Cabrales en 2017 [57].

*C. xamachana* es un organismo dipoblástico, lo que quiere decir que su blástula tiene la condición de poseer solo dos hojas embrionarias, ectodermo y endodermo. Presentan un nivel de construcción tisular, sin órganos, contando con una estructura anatómica constituida principalmente por tres secciones; la epidermis, de origen ectodérmico, estructurada por MEC, células epiteliomusculares y células indiferenciadas capaces de formar cualquier otro tipo celular; la gastrodermis, un epitelio de origen endodérmico que tapiza la cavidad gastrovascular con canales radiales que funcionan principalmente como transporte para las células nutritivo-musculares. Finalmente, la mesoglea, es una capa viscoelástica intermedia situada entre la epidermis y la gastrodermis, cuya función es la formación de un esqueleto hidrostático [33,34,58,59], brindando un soporte especial a este tipo de organismos [Fig. 1.6 a)].

Es preciso destacar que los organismos pertenecientes a este grupo se caracterizan por tener una mesoglea de dimensiones considerables, en comparación con otras clases. El arreglo

microestructural, se encuentra constituido por una red fibrosa en donde destaca su organización y dirección de crecimiento de distintos nexos fibrilares en eje oral-aboral, siendo las principales las presentes en el endodermo (en), la exumbrella (ex), las fibras finas (ff), el músculo de natación subumbral (mu), las fibras tangenciales gruesas (tf) y las fibras verticales gruesas (vf). Presentando en la imagen las escalas de longitud características. [Fig. 1.6 b].

Finalmente, la literatura indica que este organismo presenta una distribución abundante en zonas de manglar de los trópicos, así como de áreas de arrecifes y en algunas zonas costeras de profundidad media [33,34,58]. Sus poblaciones son amplias, las cuales se albergan en nuestro país en el Caribe Mexicano y Golfo de México principalmente, siendo un organismo interesante para su estudio y aplicación para la generación de biomateriales.

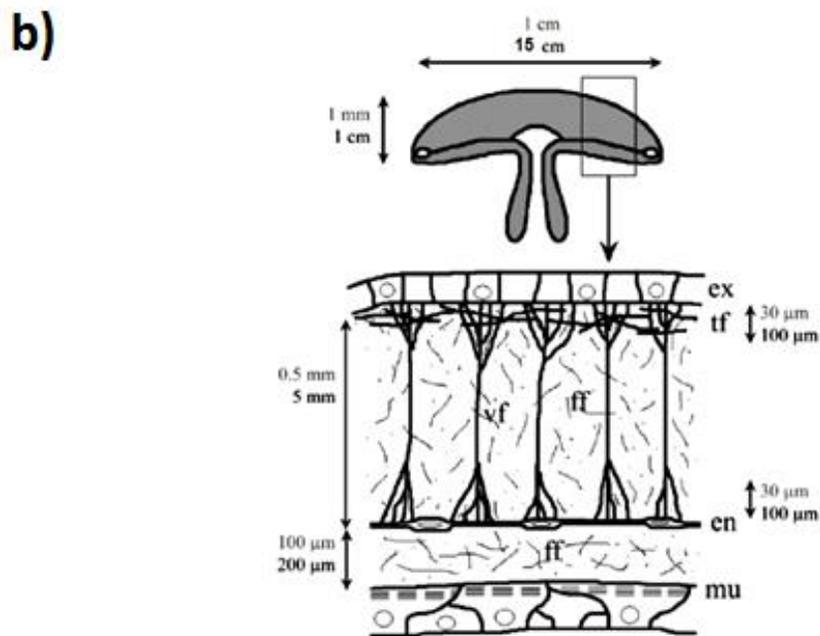
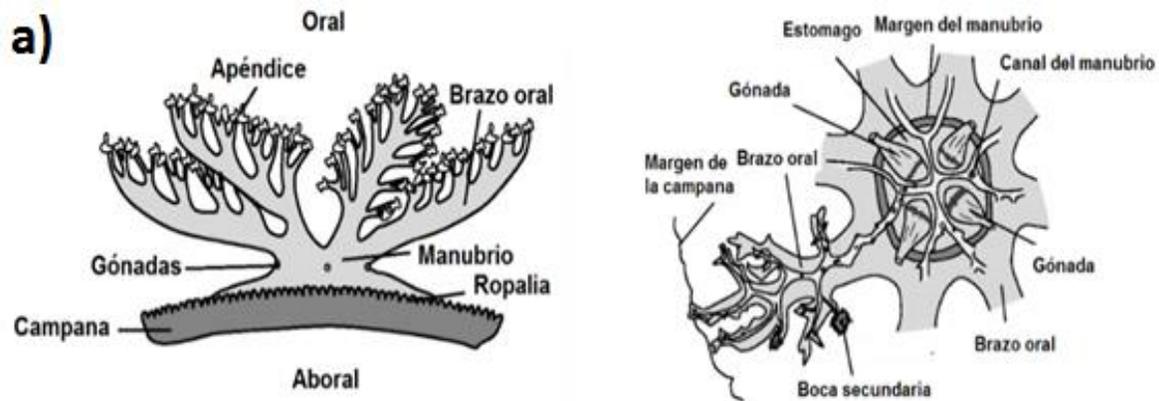


Figura 1.6. Esquema representativo de *C. xamachana*. a) las estructuras principales de *C. xamachana*. Las características más destacadas para este estudio son la campana y sus subsecciones (Epidermis, mesoglea y gastrodermis). Basado en el esquema propuesto por Hamlet en 2011 [59]. b) Vista esquemática de la organización de red fibrosa de la mesoglea de *C. xamachana*. El diagrama nos muestra los tamaños reales de las diversas estructuras. (Flechas verticales) Dirección del eje oral-aboral. Escalas de longitud características y red de arquitectura de fibrosa mesogleal para medusas adultas (sólidos) y medusas juveniles (sombreadas). Endoderm (en); exumbrella (ex); fibras finas (ff); músculo de natación subumbral (mu); fibras tangenciales gruesas (tf); fibras verticales gruesas (vf). Figura adaptada de Gambini y colaboradores [60].

## 1.8 Procesos de descelularización

El proceso de descelularización, como una herramienta para la generación de constructos de andamiaje dentro de diferentes áreas de la ingeniería tisular, nace del aprovechamiento de la MEC presente en los propios tejidos de origen humano o animal, en donde eliminando por medio de ciertos detergentes y compuestos químicos el material celular potencialmente inmunogénico, se obtiene un andamio biocompatible para el crecimiento celular y vascular del huésped, donde la complejidad del conjunto de moléculas y proteínas que los conforman son muy similares a las del tejido pensado para su aplicación. El desarrollo de apósitos de bioingeniería de diferentes capas de la membrana cutánea cobró atención en 1981 cuando Connor y colaboradores [61] demostraron el primer caso de éxito de un autoinjerto epitelial cultivado (CEA), siendo un nuevo enfoque para obtener injertos epidérmicos para la época, los cuales se han utilizado en la reparación de quemaduras graves hasta el día de hoy. En dicho trabajo se cultivaron células epidérmicas en la membrana cutánea autóloga de dos pacientes para su posterior inserción y reparación de quemaduras. A partir de esta investigación, se han reportado distintas metodologías y tipos de técnicas de descelularización [32,62–64], dentro de las que destacan: a) Decelularización por temperatura, colocando tejidos por debajo de 0 °C, de forma que las células sufran apoptosis y rompimiento estructural debido a la formación de los cristales de hielo intracelulares que fragmentan la membrana celular. b) Decelularización mecánica, generar un reactor con agitación, de manera que se fuerza la irrigación con el líquido descelularizante alrededor del tejido, en donde por medio de mecanismos de difusión, provoque lisis celular, facilitando la exposición química y eliminación de material celular; c) Perfusión, que consiste en introducir de manera lenta, pero continúa el detergente en el tejido a través del lecho vascular, facilitando la exposición química y la eliminación de material celular. Todas ellas, siendo aprovechadas utilizando distintas disoluciones con agentes químicos que interactúan con las células y eliminan los residuos celulares fuera del órgano, dentro de los cuales podemos mencionar: Enzimas de tipo nucleasas, detergentes aniónicos, catiónicos y no iónicos por su versatilidad y propiedades.

Los detergentes para este tipo de aplicaciones, se encuentran formados por moléculas anfipáticas que rompen las interacciones hidrofóbicas de la membrana celular al intercalarse

dentro de la bicapa fosfolipídica y de este modo poder solubilizar lípidos y proteínas. Funcionan como un disolvente bifásico, en donde la sección hidrofóbica de una molécula de detergente es atraída hacia las cadenas hidrocarbúricas, para posteriormente mezclarse con facilidad; finalmente la parte hidrofílica es atraída fuertemente hacia el agua. Los detergentes aniónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS), contienen un grupo cargado; los detergentes no iónicos como el Tritón X-100, carecen de grupos cargados. A concentraciones bajas (< 10% v/v), los detergentes se disuelven en agua como moléculas aisladas, en donde sí la concentración comienza a aumentar, las moléculas empiezan a formar pequeños conglomerados esféricos micelares, en los cuales las partes hidrofílicas de las moléculas se orientan hacia el exterior y las partes hidrofóbicas se agrupan en el centro, teniendo un efecto negativo en el proceso de descelularización.

## Capítulo 2

### SECCIÓN EXPERIMENTAL

La metodología utilizada en la elaboración de este trabajo se resume en esta sección con los siguientes tópicos:

#### 2.1 Muestreo dirigido.

La laguna de Chelem es una laguna poco profunda (1,4 m de profundidad promedio), mide 14,7 km de largo por 1,8 km de ancho máximo, con una superficie total de 15 km<sup>2</sup>, ubicada en la costa norte del estado de Yucatán en el Golfo de México (Fig. 2.1). Está conectada al mar por una abertura artificial de 225 m de ancho que sirve como acceso al Puerto de Yucalpeten.

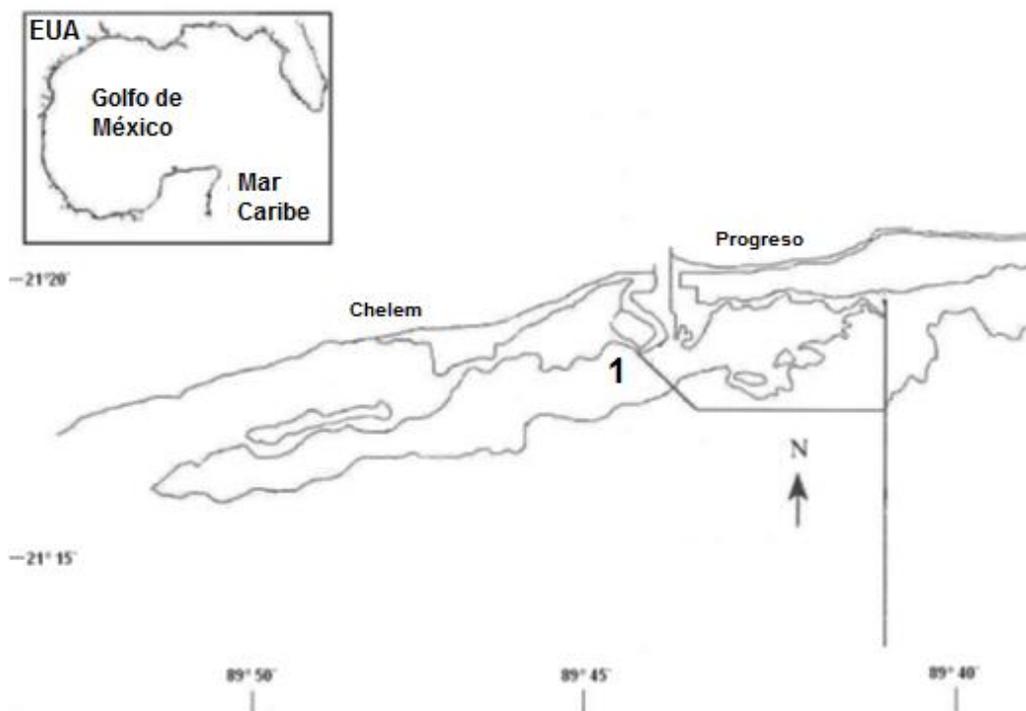


Figura 2.1. Laguna costera de Chelem y el sitio de estudio (señalado con el número 1), modificado a partir de [65].

Los organismos de la especie *C. xamachana* se colectaron en los meses de diciembre de 2017 a abril de 2018, utilizando una técnica de captura de tipo aleatorio, seleccionando aquellos que presentaran un peso aproximado de 150-200 g y 15-20 cm de diámetro radial. Se realizaron 16 lotes durante los meses de captura, constando de 7 organismos por lote, esto con la finalidad de estandarizar la técnica de procesamiento y obtener las muestras para su posterior análisis fisicoquímico y biológico. Para el desarrollo y estandarización de la técnica, se capturaron un total de 112 organismos utilizando el permiso de colecta registrado ante la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SGPA/DGVS/011043/17.

En la misma zona de colecta cada espécimen es seccionado, separando la campana (estructura de la zona aboral) de la ropalia, manibrio, brazos orales y apéndices (estructuras pertenecientes a la zona oral). Esto con la finalidad de recopilar sólo la campana, estructura que será utilizada para la generación de los andamios tegumentarios. El traslado se realiza con agua marina filtrada utilizando una malla de algodón, con una concentración salina de 45.6 ups (unidades prácticas de salinidad) y un pH de 5.2 en recipientes herméticamente sellados a temperatura interna de entre 25° a 35°. Estos parámetros fisicoquímicos son importantes, debido a que *C. xamachana* necesita de salinidad marina hiperalina y un pH ligeramente ácido para sobrevivir [66].

## **2.2 Proceso de descelularización para la obtención de andamios.**

Una vez colectados los organismos, se procedió a realizar el proceso de descelularización (Fig. 2.2), mediante el uso de soluciones iónicas a base de sales y un detergente no iónico, tomando como base la metodología propuesta por Takami, Benítez y colaboradores [6,14]. Cada lote realizado consistió de seis organismos, de los cuales la estructura de la sección aboral denominada campana fue inmolada con agua corriente, posteriormente sometidas a procesos de congelación-descongelación a -20 °C en una solución 1M de cloruro de sodio (NaCl) durante 24 horas, esto con la finalidad de provocar lisis celular. Las campanas son procesadas utilizando un primer tratamiento con detergente Triton X-100, a una concentración del 0.5% (v/v) en una solución 1M de NaCl con agitación continua durante 30 min, seguido de un segundo tratamiento con una solución de NaCl 1M por un lapso de tiempo similar. Posteriormente, se

realizó un último tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno (3% v/v) por 10 min, seguido de un enjuague abundante con agua destilada. Finalmente se colocó la estructura en etanol con cambios graduales de concentración (10-100% v/v, con 20% v/v de diferencia entre cada uno) por una hora de exposición entre cada intervalo, para conseguir su deshidratación. Para su resguardo, se realizaron lavados abundantes con esta solución etílica y se resguardan a  $-4^{\circ}\text{C}$ . El peso húmedo final del andamio descelularizado fue de  $58 \pm 7$  g ( $75 \pm 8$  g peso inicial).

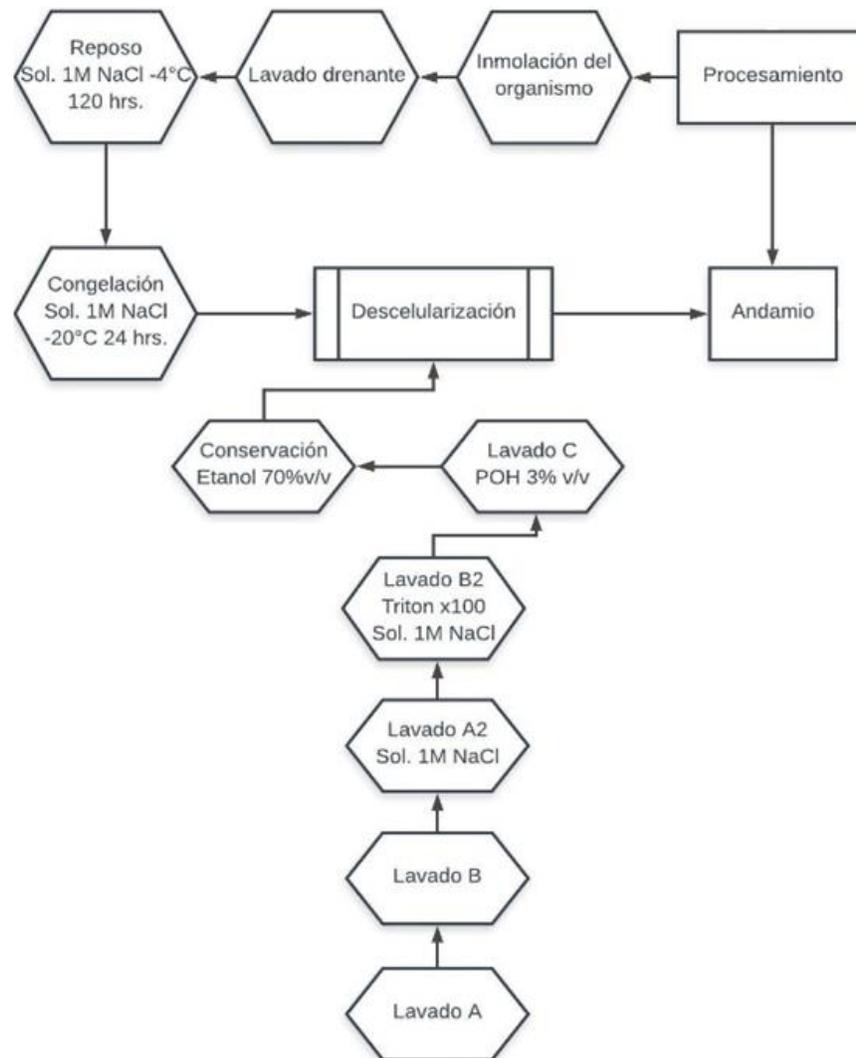


Figura 2.2. Diagrama de procesamiento de andamios tegumentario.

*Generación de andamios:* Una vez ejecutado el proceso de descelularización, se realizaron

cortes cilíndricos en la sección de los canales anastomados de la campana [34], con un diámetro de 5 mm para obtener los discos utilizados en la caracterización fisicoquímica y en las pruebas de proliferación celular. Además, para conocer la estabilidad fisicoquímica de los andamios se realizaron procesos de secado a 60 °C por 24 horas.

*Determinación del contenido de ADN:* Para determinar el porcentaje de descelularización logrado en las membranas, se cuantificó el contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) total aislado a partir de la MEC presente en las membranas sin realizar procesos de secado, utilizando el método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) propuesto por Doyle, J.J. y Doyle, J.L. en 1987 [64,67]. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del ADN total con etanol e hidróxido de sodio respectivamente, a partir de la fase orgánica. Para conocer la concentración del ADN total se tomaron alícuotas del precipitado y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) para determinar los ng/mL presentes de ADN en los tratamientos. Estas mediciones se realizaron en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

### **2.3 Caracterización del andamio tegumentario**

La caracterización de los andamios tegumentarios se encuentra dividida en cinco etapas fundamentales, las cuales se detallan a continuación:

*Caracterización topográfica y estructural del andamio:* La microestructura y la ausencia visual de células en los andamios descelularizados fue determinada mediante microscopía óptica de campo claro en un microscopio invertido (Olympus), realizando tinciones con cristal violeta (0.5%) de la MEC obtenida, así como por medio de microscopía SEM, con un equipo marca Jeol modelo 6360 LV de bajo vacío. Para observar la constitución celular del andamio pre y post tratamiento de descelularización, se procesaron las muestras utilizando secado a punto

crítico de CO<sub>2</sub> utilizando la metodología siguiente: Antes del secado, se fijan las muestras con una solución de glutaraldehído al 0.5%, para su posterior conservación en etanol al 70% v/v. Posteriormente se colocan las muestras en etanol al 100% dentro de unas cápsulas de poliestireno. El secado a punto crítico se consigue llevando las muestras a 7.38 MPa de presión. Además, se realizó un recubrimiento de oro al andamio para favorecer la conductividad superficial, utilizando un equipo Denton Vacuum modelo Desk II.

*Caracterización fisicoquímica del andamio:* Para determinar la composición del andamio, así como el tipo de CLG presente en el mismo, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Para ello, alícuotas de 25 µg de proteína total se resolvieron en geles al 7.5% de poliacrilamida, con un control de CLG de piel porcina. La corrida electroforética se realizó a 80 mV en una cámara electroforética Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, EE. UU.), a voltaje constante durante 1 h. Finalmente los polímeros peptídicos fueron evidenciados mediante tinción con azul de Comassie al 4% como se ha reportado previamente [7,16]. En cuanto a la determinación de las propiedades térmicas del andamio, se utilizó Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) con el software y el equipo DSC 8500 Perkin Elmer con condiciones de rampa de calentamiento 5 °C/min, en un intervalo de 0 a 180 °C. Este análisis térmico se realizó con el fin de conocer las temperaturas de transición del material debido que, al tratarse de polímeros proteicos, estos estados de transición nos indicaran la temperatura de desnaturalización de las proteínas que conforman el andamio, principalmente CLG. Para determinar las temperaturas a las que los polipéptidos colagénicos presentes en el andamio pierde masa, se utilizó la técnica de análisis termogravimétrico (TGA), con un equipo marca Perkin Elmer, con condiciones de un barrido en un intervalo: 30 a 600 °C, con una rampa de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno tomando como base investigaciones previas [8,16]. Esta propiedad se encuentra ligada con las propiedades de biodegradabilidad que pueden presentar diferentes tipos de andamios, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* [12,13]. Finalmente, como apoyo a la información extraída de las técnicas de SDS-PAGE y el análisis térmico DSC y TGA, se analizó el andamio por medio de la técnica espectroscópica infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) con un equipo marca Nicolet 8700 (Thermo Scientific Inc, USA) utilizando un promedio de 100 barridos, una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, en absorbancia, una velocidad óptica de 0.4747, en ATR/ZnSe, en un intervalo de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. Esto con el objetivo de determinar los principales modos vibracionales de los grupos funcionales fundamentales presentes en los aminoácidos que constituyen al andamio, tomando como base la metodología propuesta por Del Prado y colaboradores [8].

*Caracterización mecánica de resistencia tensión del andamio:* Las probetas para determinar la resistencia a tensión, tanto secas a temperatura ambiente como en horno (60 °C) por 24 horas, son seccionadas con dimensiones de 60 mm x 11.4 mm x 0.6 mm utilizando una sierra radial Craftsman de acuerdo L. Sang y cols. [68], con una serie de cada tratamiento de cinco probetas (Fig. 2.3). Los ensayos se realizaron con ayuda de la máquina de pruebas universales Shimadzu modelo AGS-X y una celda de carga de 1 kN. De igual manera, se realizaron los cálculos del esfuerzo máximo a tensión ( $\sigma_{max}$ ) y el módulo elástico a tensión (E) y de acuerdo a la norma ASTM D638-02<sup>a</sup>.

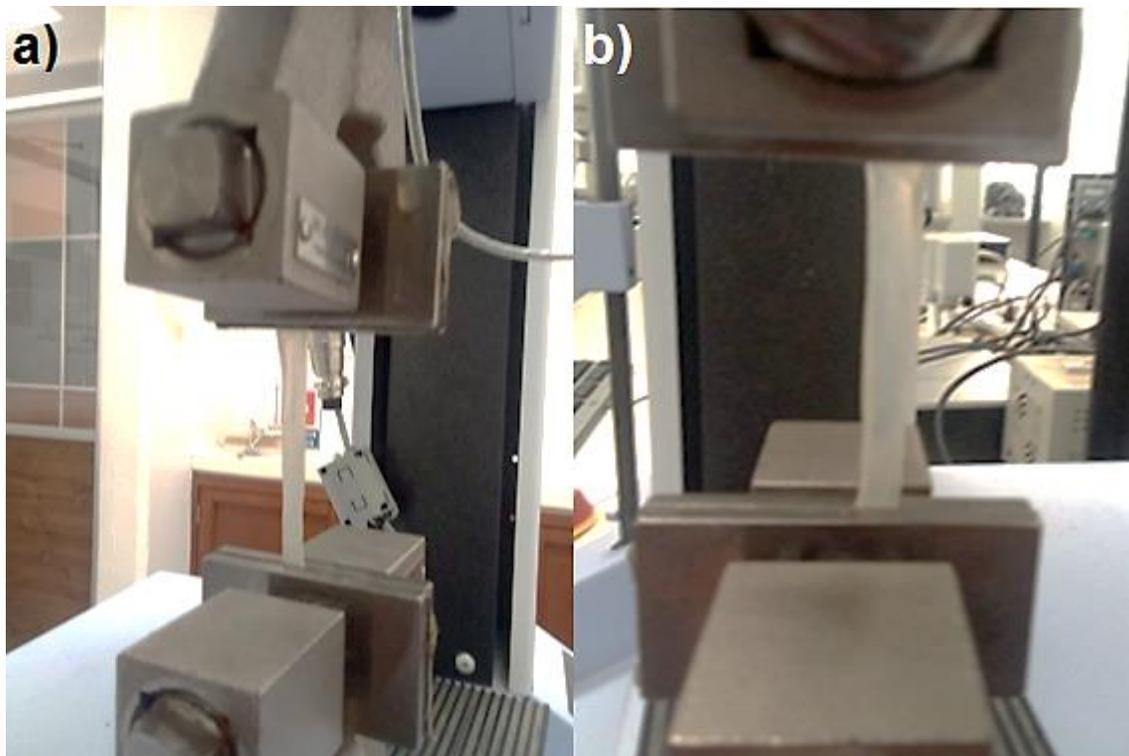


Figura 2.3. Probetas de andamios tegumentarios: a) vista lateral, b) vista frontal.

## 2.4 Caracterización biológica de andamios tegumentarios

*Cultivo de fibroblastos humanos.* Como modelo experimental se utilizaron fibroblastos derivados de piel humana. Las muestras fueron obtenidas de pacientes sanos que acudieron al servicio de dermatología del Centro Dermatológico de Yucatán y que accedieron a participar libremente en el protocolo y firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo A). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de superficie (BD Falcon™), como medio de cultivo se utilizó DMEM alto en glucosa (CAISSON D5796) suplementado con antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina G, 100 g/mL de estreptomina -CAISSON A5955) y suero bovino fetal (SBF) (CAISSON F9665) al 10%. Los medios de cultivo fueron renovados cada tercer día. Una vez alcanzado el 80% de confluencia celular, se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1.5 mL de una solución de tripsina 0.25% a 37 °C durante 3 min para disgregar las células, inhibiendo las uniones focales de integrinas en la superficie de los frascos de cultivo. Cuando las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1.5 mL de medio de cultivo DMEM. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener el botón celular. El botón obtenido se resuspendió en 7 mL de medio DMEM y las células se utilizaron para los ensayos de proliferación y adhesión.

*Determinación de la proliferación celular.* La proliferación celular fue determinada en placas de 96 pozos a los cero, tres y siete días de cultivo (t0, t3 y t7 respectivamente) con una densidad celular de  $5 \times 10^3$  células/mL. El seguimiento de la proliferación celular se realizó utilizando el reactivo Alamar Blue™ (AB). El seguimiento de la proliferación se basa en la detección de la reducción mitocondrial de la resazurina (compuesto nitrogenado con tonalidad azul) a resorufina (compuesto rojizo). Esta reacción de óxido-reducción sólo tiene lugar en las células viables. Para los ensayos con los andamios se realizó un seguimiento de la absorbancia a 570-600 nm con el equipo Cytation 3, Marca BioTeK. Como control positivo se utilizaron fibroblastos con medio (C+), al control negativo se le agregó una solución con SDS en PBS al 10% v/v (C-). Finalmente se colocó una muestra sin descelularización como control de la prueba (Tejido nativo).

*Determinación de la adhesión celular.* Para analizar la capacidad de los andamios obtenidos para promover la adhesión celular, muestras de los andamios cultivados con fibroblastos a los 0, 3 y 7 días de cultivo, fueron fijados en glutaraldehído al 4% y procesadas utilizando secado a punto crítico de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) con un equipo Samdri modelo 795 para obtener los datos de microscopía SEM.

## **2.5 Análisis estadístico**

Cada una de las pruebas de esta investigación, se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. La diferencia estadística se evaluó mediante: ANOVA de una vía con prueba de Tukey para la determinación de la cantidad de ADN presente en las muestras.

En cuanto al ensayo de biocompatibilidad se realizó un análisis estadístico factorial general con la finalidad de comparar la significancia de viabilidad celular (medida por la absorbancia) en función de dos factores, el tiempo de proliferación y los tratamientos realizados. Los niveles de la variable “tratamientos” son el C+, C-, el andamio tegumentario (+Dcel) y el tejido nativo de la medusa invertida (-Dcel). Se considera estadísticamente significativo cuando  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Minitab V16.1

## Capítulo 3

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Porcentaje de descelularización de andamios tegumentarios

En la figura 3.1 se muestra el gráfico de barras de los ng/mL de ADN presente en cada muestra, en donde en general se observa una evidente diferencia en la media entre +Dcel y -Dcel. La comprobación estadística de los resultados, muestra con un 95% de confianza que +Dcel se encuentra descelularizado en un 70%, en comparación con -Dcel, por lo que la diferencia observada es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Anexo B). Este hallazgo es congruente con la literatura, dado que se estima que el porcentaje de descelularización mínimo permitido para aprovechar este tipo de andamios en aplicaciones de IT debe ser de entre un 70% a un 80% [32,64].

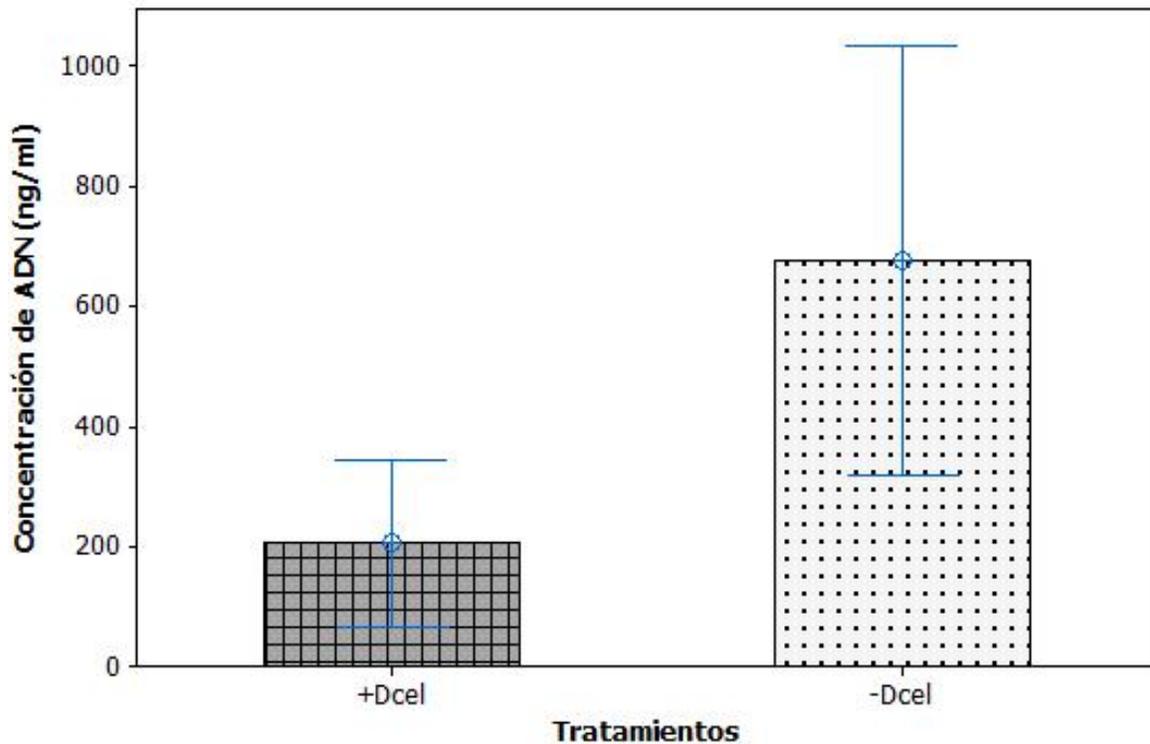


Figura 3.1. Gráfico de barras de la cuantificación de ADN presente por muestra. Las barras corresponden a la desviación estándar de 3 muestras  $p < 0.05$ .

### **3.2 Caracterización topográfica y estructural del andamio tegumentario**

A través del análisis topográfico de los andamios tegumentarios obtenidos, se pueden apreciar los efectos de la descelularización sobre la estructura de la campana de la medusa invertida.

En la figura 3.2 es posible observar las micrografías ópticas obtenidas de –Dcel a diferentes acercamientos. En el primer caso, [Fig. 3.2 a)] se aprecia la composición tisular y celular, en donde los canales radiales (C) e interradales (CI) son claros [34,58]. Al realizar un acercamiento mayor, [Fig. 3.2 b)] es posible percibir estructuras ovoides, las cuales probablemente correspondan a organismos unicelulares fotosintéticos simbioses denominados zooxantelas (Z) encontrados dentro de la mesoglea, debajo del epitelio sub-umbral de la campana [69]. Además, es evidente la presencia de pliegues de tejido epitelial (T) bien organizado [Fig. 11 b, c y d)].

De acuerdo a Gambini y colaboradores, y Brusca y colaboradores [58,60] se trata de estructuras epitelio-musculares o mioepiteliales (M), encargadas de la constitución del soporte tisular en los organismos pertenecientes al phylum Cnidaria.

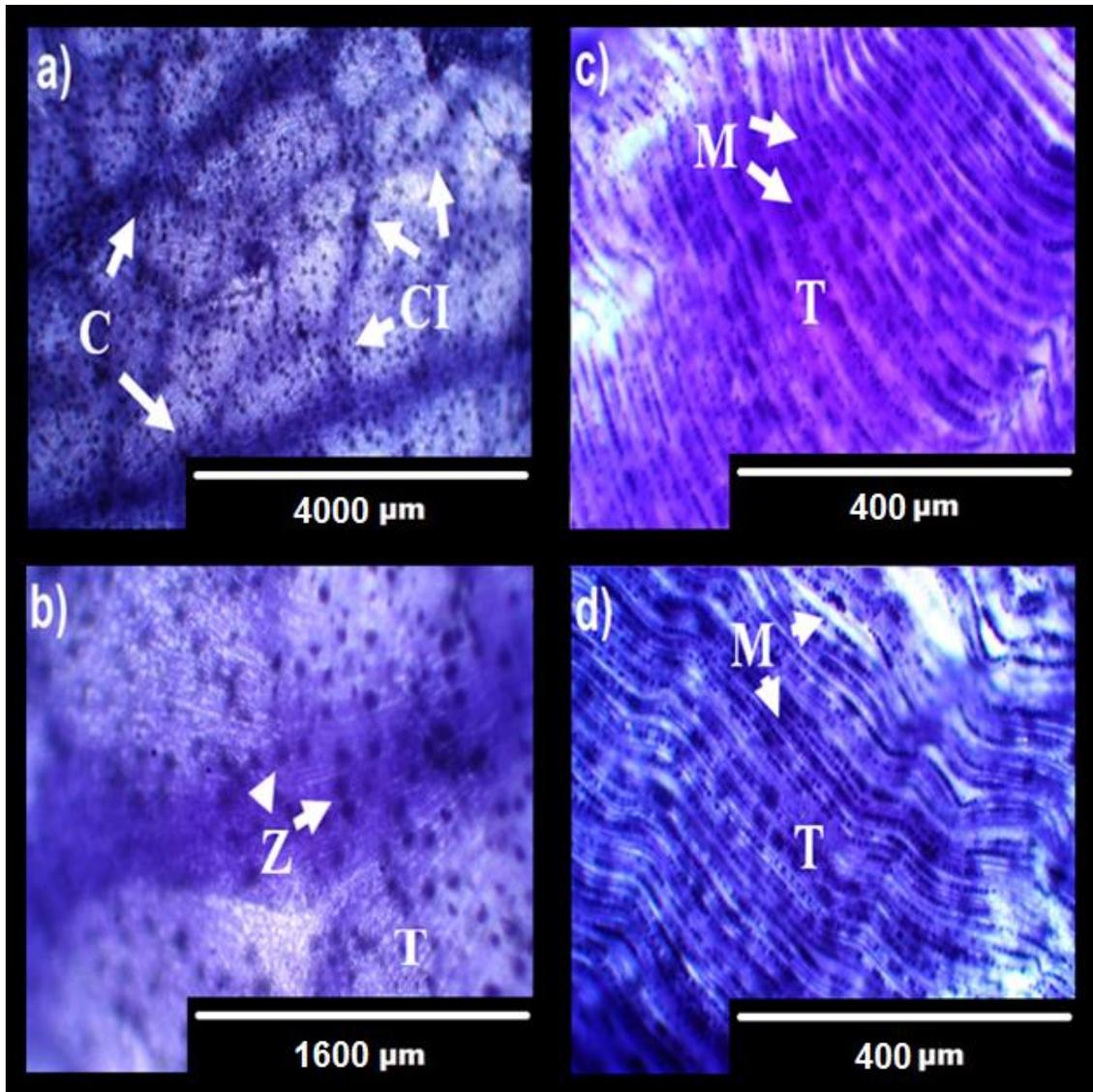


Figura 3.2. Secciones tisulares del andamio nativo (sin descelularizar). La micrografía: a) muestra las secciones tisulares y celulares de la campana denominados canales radiales (C), canales interradales (CI). b), se muestran los simbiontes denominados zooxantelas (Z), c y d) las células mioepiteliales (ME), además de las secciones del tejido epitelial (T), resaltado con tinción de cristal violeta, escala de: a) 4 mm, b) 1.6 mm y c-d) 0.4 mm.

En la figura 3.3 se muestran las micrografías ópticas obtenidas de +Dcel. En todas ellas se vislumbra la ausencia de organismos simbioses Z y particularmente en las micrografías representadas en las figuras c-d, es evidente la carencia de células M en todo el tejido T, en comparación con -Dcel.

El desvanecimiento de las estructuras tisulares de la MEC original, denominadas C y CI fue evidente en +Dcel [Fig. 3.3 a-b) en comparación con el andamio nativo (-Dcel). De manera conjunta, las micrografías 3.3 c-d, muestran la ausencia de las células M, así como de los pliegues que se observaban anteriormente en el T, en comparación con la figura 3.2 c-d. Esto puede ser atribuido a que la descelularización promueve que el material orgánico (desechos y nutrientes) proveniente de las células que viaja por los pliegues del T y los C Y CI se eliminen, como consecuencia del fenómeno de difusión [32].

Con estos resultados es posible confirmar la eficiencia del método de descelularización de manera visual. En general, el proceso de descelularización de la campana disminuye la presencia de células, pero reservando la estructura de la MEC, lo cual se puede apreciar al comparar el andamio descelularizado (+Dcel) con el andamio nativo (-Dcel).

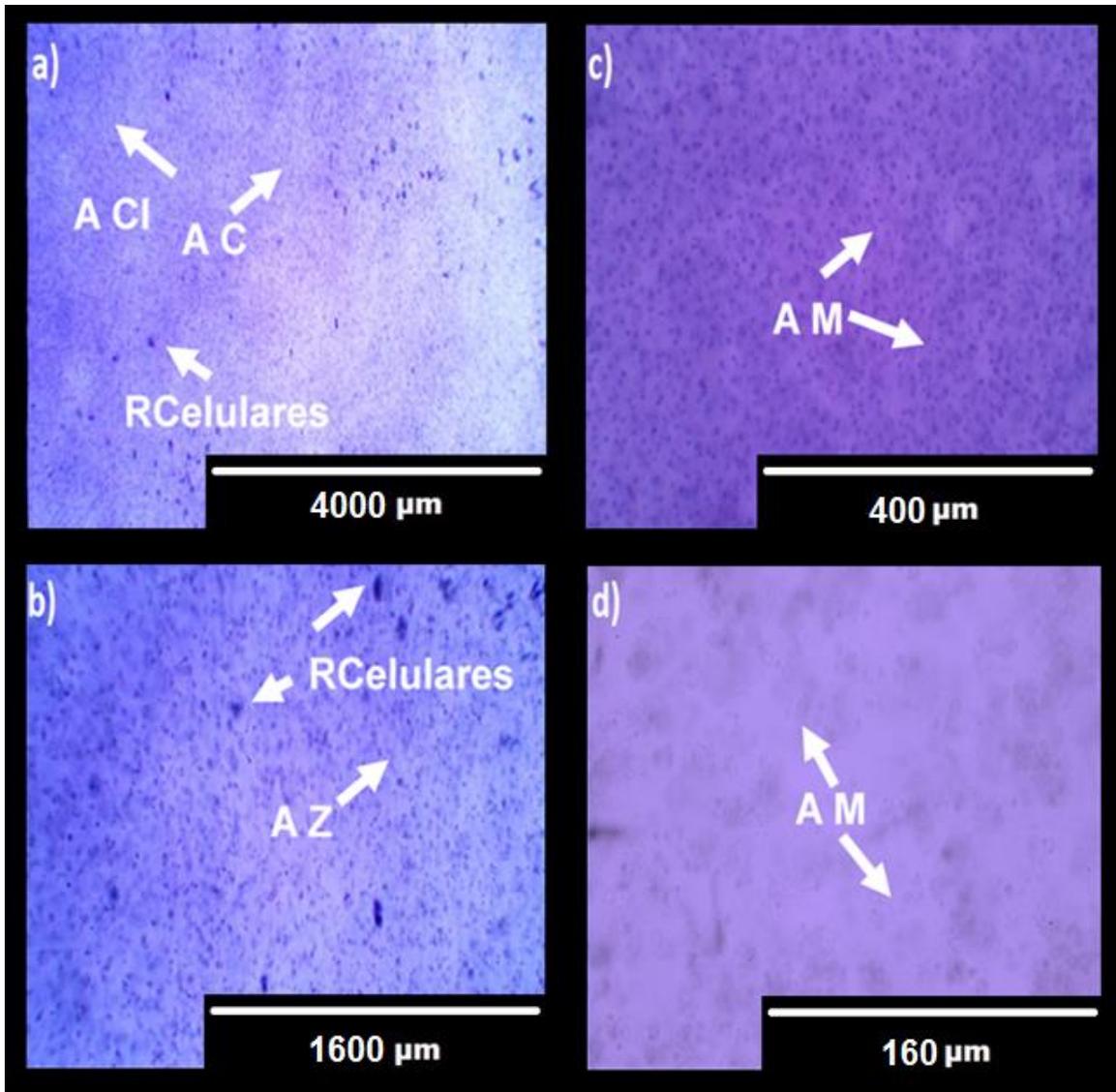


Figura 3.3. Microscopías ópticas de andamios tegumentarios descelularizados. Se observa en la micrografía: a) ausencia de canales radiales (AC), canales interradales (ACI), b) de zooxantelas (AZ), c-d) de células mioepiteliales (AM) y restos de material celular (Rcellulares), resaltado de la tinción con cristal violeta, escala de: a) 4 mm, b) 1.6 mm, c) 0.4 mm y d) 0.16 mm.

En la figura 3.4 a)-b) se aprecia la microestructura de -Dcel con una morfología con una topología estriada. Al comparar el tejido nativo con +Dcel [Fig. 3.5 a)-b)], es posible observar que la topología es distinta, mostrando una microestructura con pliegues y ordenamiento aleatorio de tipo escamoso, además de que no se aprecian cúmulos en su superficie. Mas aún, al realizar un acercamiento a la estructura del andamio [Fig 3.5 c)], es posible apreciar la ausencia de entes celulares, definiéndose la constitución microfibrilar con ordenamiento anisotrópico que constituyen el andamio, esta morfología es típica de membranas poliméricas polipeptídicas obtenidas a travez de la descelularización de la MEC presente en el organismo seleccionado para generar los andamios según la literatura [9,10,53,70].

Debido a lo anterior, es posible mencionar que el proceso de descelularización preserva la arquitectura con ligeros cambios en la microestructura de la MEC de la medusa invertida. Finalmente, el andamio obtenido, tanto en su estado nativo (-Dcel) como después del proceso de descelularización (+Dcel), muestran semejanzas estructurales, al menos a nivel microscópico (SEM) con la estructura para la MEC de piel humana [Fig. 3.6 a-c)], reportada por Hossler en 2014 [70].

Cabe señalar que Hossler, en su trabajo no da especificaciones puntuales del método de obtención de las micrografías SEM, además de ello, la escala de las micrografías del tejido tegumentario humano reportado (Fig. 3.6), en comparación con el andamio obtenido en este trabajo son diferentes (Fig. 3.4 y 3.5), sin embargo, es posible apreciar una similitud entre el andamio y la piel humana, al menos como una aproximación cualitativa.

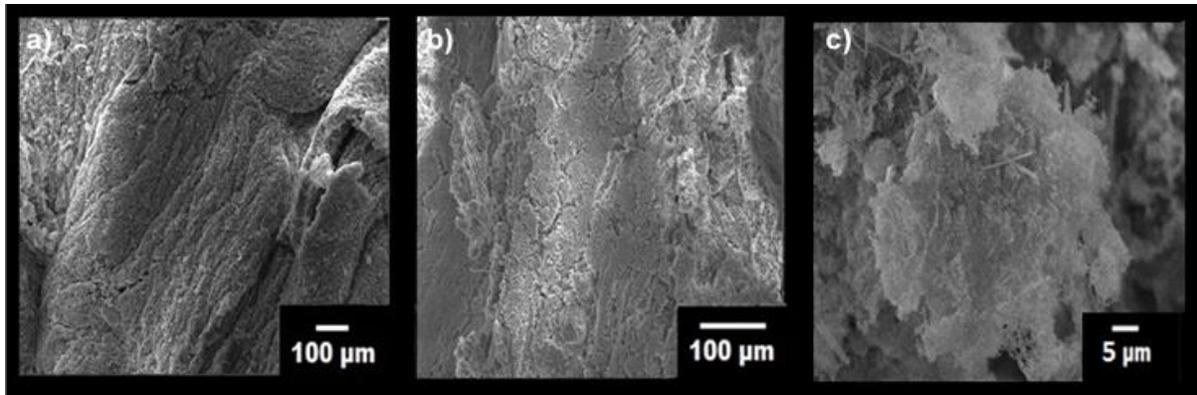


Figura 3.4 Micrografía electrónica del tejido nativo de la medusa invertida (-Dcel). Escala de: a-b) 100 μm y c) 5 μm.

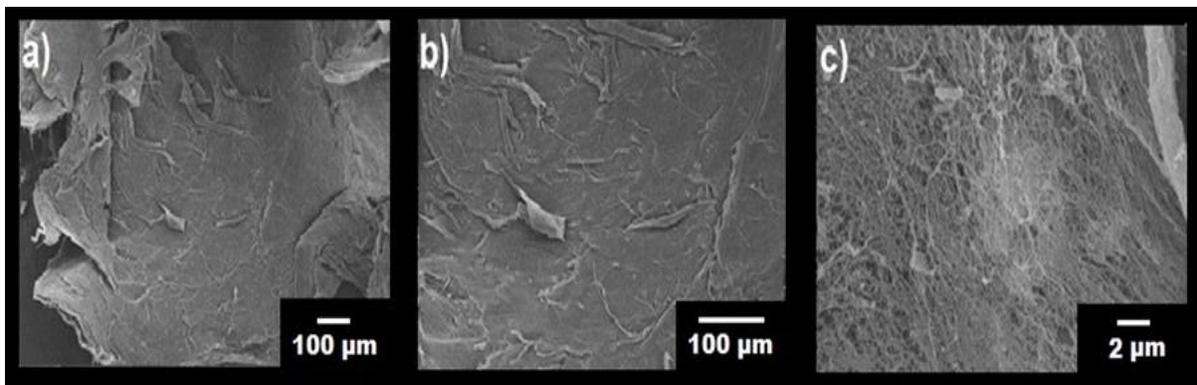


Figura 3.5 Micrografía electrónica del andamio descelularizado (+Dcel). Escala de: a-b) 100 μm y c) 2 μm.

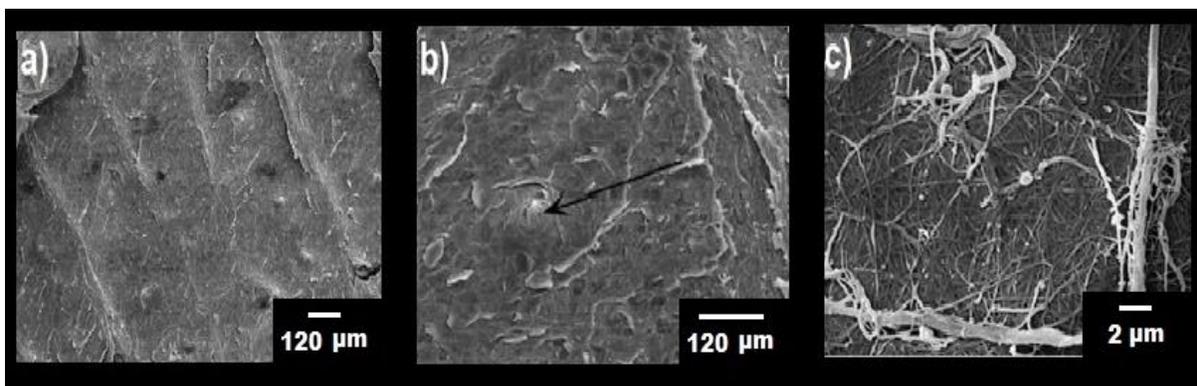


Figura 3.6. Micrografía electrónica de la sección epitelial de la membrana cutánea humana. Tomados de [70].

### 3.3 Caracterización fisicoquímica del andamio tegumentario

En cuanto a la composición química del andamio, en la figura 3.7 c) y d) se puede observar el patrón electroforético del polímero polipeptídico presente en -Dcel y +Dcel, los cuales al compararlos con el control positivo de CLG-I (colágena porcina) presente en la figura 3.7 b), se observa una gran similitud en la separación de sus bandas. En los tres patrones electroforéticos se presentan los principales constituyentes de la CLG-I: las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , dímeros y trímeros ( $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente), de acuerdo con lo reportado previamente [22]. Con base a lo anterior, es evidente que *C. xamachana* presenta en su mayoría una composición de CLG-I, manteniéndose al momento de realizar el proceso de descelularización para obtener los andamios.

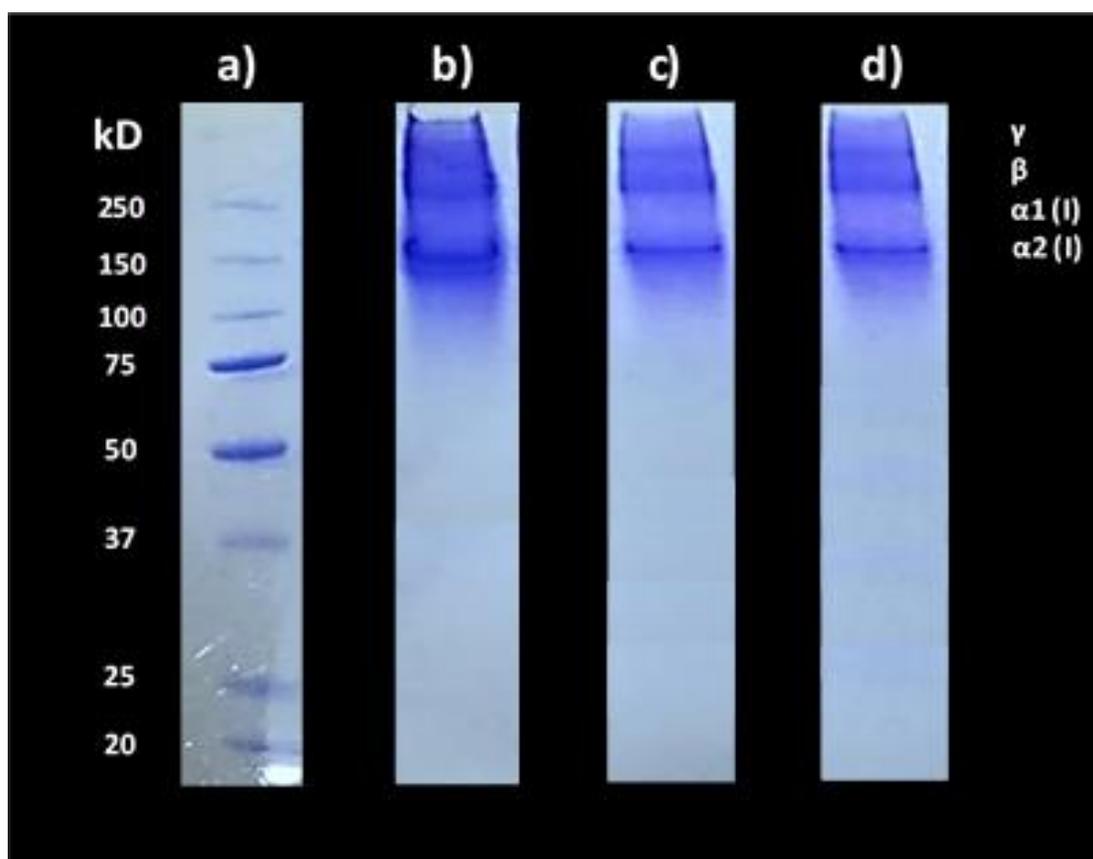


Figura 3.7. Patrones electroforéticos de CLG. a) marcador de peso molecular, b) control de CLG-I (colágena atelopeptídica porcina, donada por Aspid S.A. de C.V.), c) andamios sin descelularizar (-Dcel) y d) andamio descelularizado (+Dcel).

En la figura 3.8 a) y b) se distinguen los espectros infrarrojos de  $-D_{cel}$  y  $+D_{cel}$  para distintos tipos de secado ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y secado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en un intervalo de  $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ . Es posible notar que para todas las muestras se observan las cuatro bandas de absorción típicas de la CLG. La banda de la amida A se observa a  $3278\text{ cm}^{-1}$ , asociada comúnmente con las vibraciones de estiramiento asimétrico del enlace N-H ( $\nu_{NH}$ ), la amida B se encuentra aproximadamente a  $3058\text{ cm}^{-1}$ , ligada al estiramiento simétrico del enlace N-H ( $\nu_{NH}$ ). La banda amida I representa las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo en los péptidos ( $\nu_{C=O}$ ) con algunos estiramientos mínimos de los enlaces C-N y movimientos de flexión del grupo N-H, encontrándose a  $1633\text{ cm}^{-1}$  según lo reportado en la literatura [8]. La banda perteneciente a la amida II se observa a  $1547\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a las vibraciones de deformación del grupo N-H ( $\delta_{NH}$ ) y estiramiento del grupo C-N ( $\nu_{CN}$ ) [8,16,71–78]. Finalmente, la amida III, representando a los modos vibraciones de deformación del grupo N-H ( $\delta_{NH}$ ) y estiramiento del grupo C-N ( $\nu_{CN}$ ) fuera de plano a los  $1232\text{ cm}^{-1}$  [72]. Analizando con más detalle los espectros IR, específicamente en la zona de  $4000$  - $2700\text{ cm}^{-1}$  [Fig.3.9 a) y b)], es posible asociar la primera banda con el estiramiento asimétrico del grupo O-H-O a  $3368\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{As}O-H-O$ ), la segunda a la amida A, la tercera al estiramiento simétrico del grupo O-H-O a  $3190\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_S O-H-O$ ), la cuarta perteneciente a la amida B, la quinta al estiramiento asimétrico del grupo funcional  $CH_3$  ( $\nu_{As} CH_3$ ) a  $2960\text{ cm}^{-1}$ , la sexta banda se refiere al estiramiento asimétrico del grupo funcional  $CH_2$  ( $\nu_{As} CH_2$ ) a  $2919\text{ cm}^{-1}$ , la séptima al estiramiento simétrico del grupo funcional  $CH_3$  ( $\nu_S CH_3$ ) a  $2871\text{ cm}^{-1}$  y la octava al estiramiento asimétrico del grupo funcional  $CH_2$  ( $\nu_S CH_2$ ) a  $2850\text{ cm}^{-1}$ , siendo las bandas del grupo O-H-O relacionado a agua fisisorbida y química que aún se encuentra presente en la muestra [71,72,75]. La figura 3.10 a-b) representa la zona del espectro correspondiente al intervalo de los  $1800$  a  $850\text{ cm}^{-1}$ , para ambos tratamientos de secado se observa la primera y segunda banda corresponden a la amida I y II, la tercera banda representa el movimiento vibracional de tipo tijera del grupo  $CH_2$  ( $\delta_{Scissors} CH_2$ ) a  $1456\text{ cm}^{-1}$ , la cuarta banda se refiere al movimiento de estiramiento del carbonilo (C=O) del grupo funcional  $COO^-$  de la CLG tipo I ( $\nu_{COO^-}, C=O$ ) a  $1398\text{ cm}^{-1}$ , la quinta banda pertenece al estiramiento simétrico del grupo funcional  $CH_3$  ( $\nu_S CH_3$ ) a  $1379\text{ cm}^{-1}$ , la sexta banda se refiere al movimiento “wagging” del grupo funcional  $CH_2$  ( $W_{wagging} CH_2$ ) a  $1340\text{ cm}^{-1}$  [71–73], la antepenúltima banda pertenece a la amida III y finalmente las dos últimas bandas pertenecen al movimiento vibracional de estiramiento simétrico del complejo  $CH_2-O-CH_2$  ( $\delta_S CH_2-O-CH_2$ )

176 y 1027  $\text{cm}^{-1}$  [71].

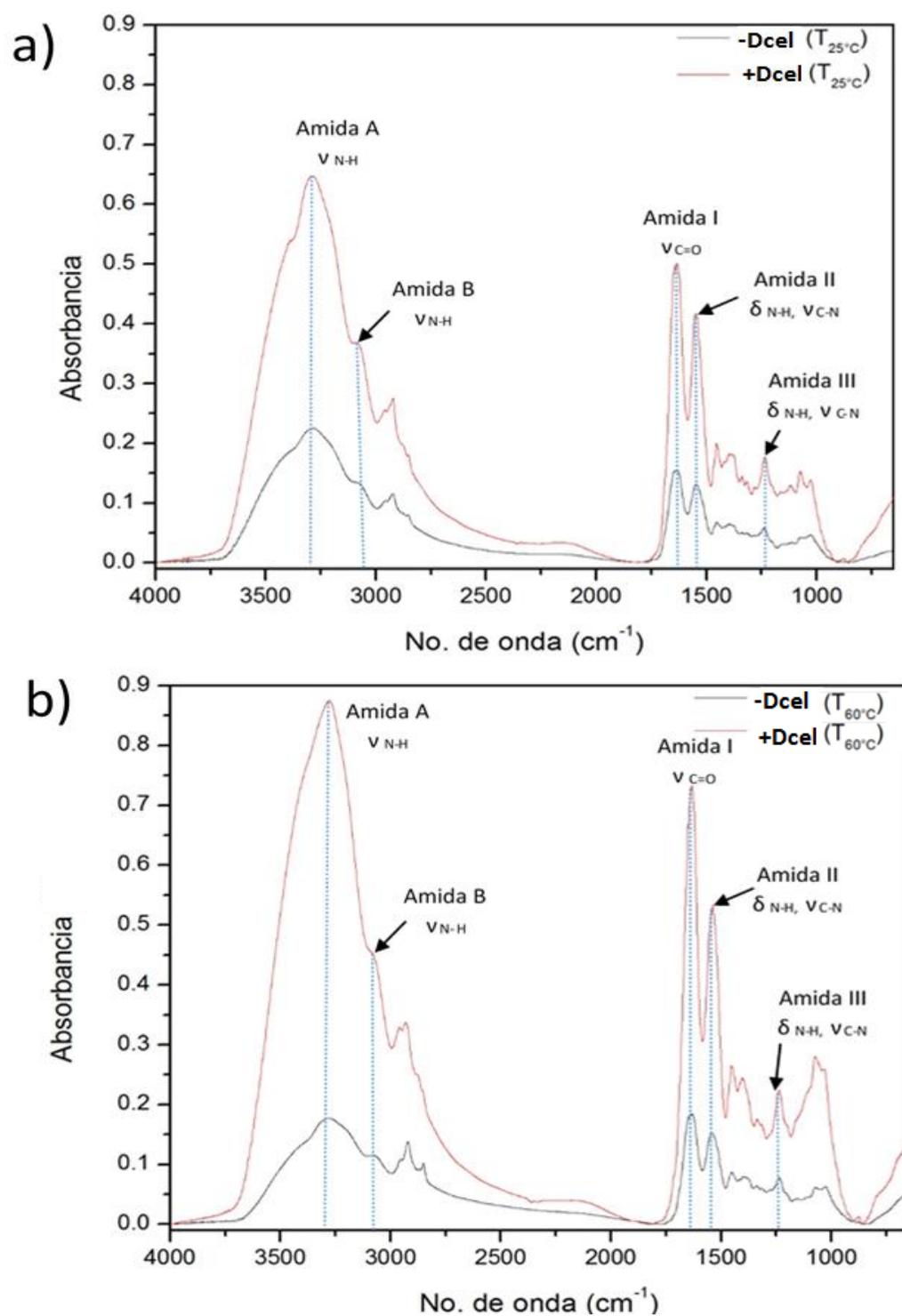


Figura 3.8. Espectros FTIR de la MEC presente en *C. xamachana* (-Dcel color negro) y Andamio (+Dcel color rojo) con tratamiento de secado a: a) 25 °C y b) secado a 60 °C en intervalo de 4000 -600  $\text{cm}^{-1}$ .

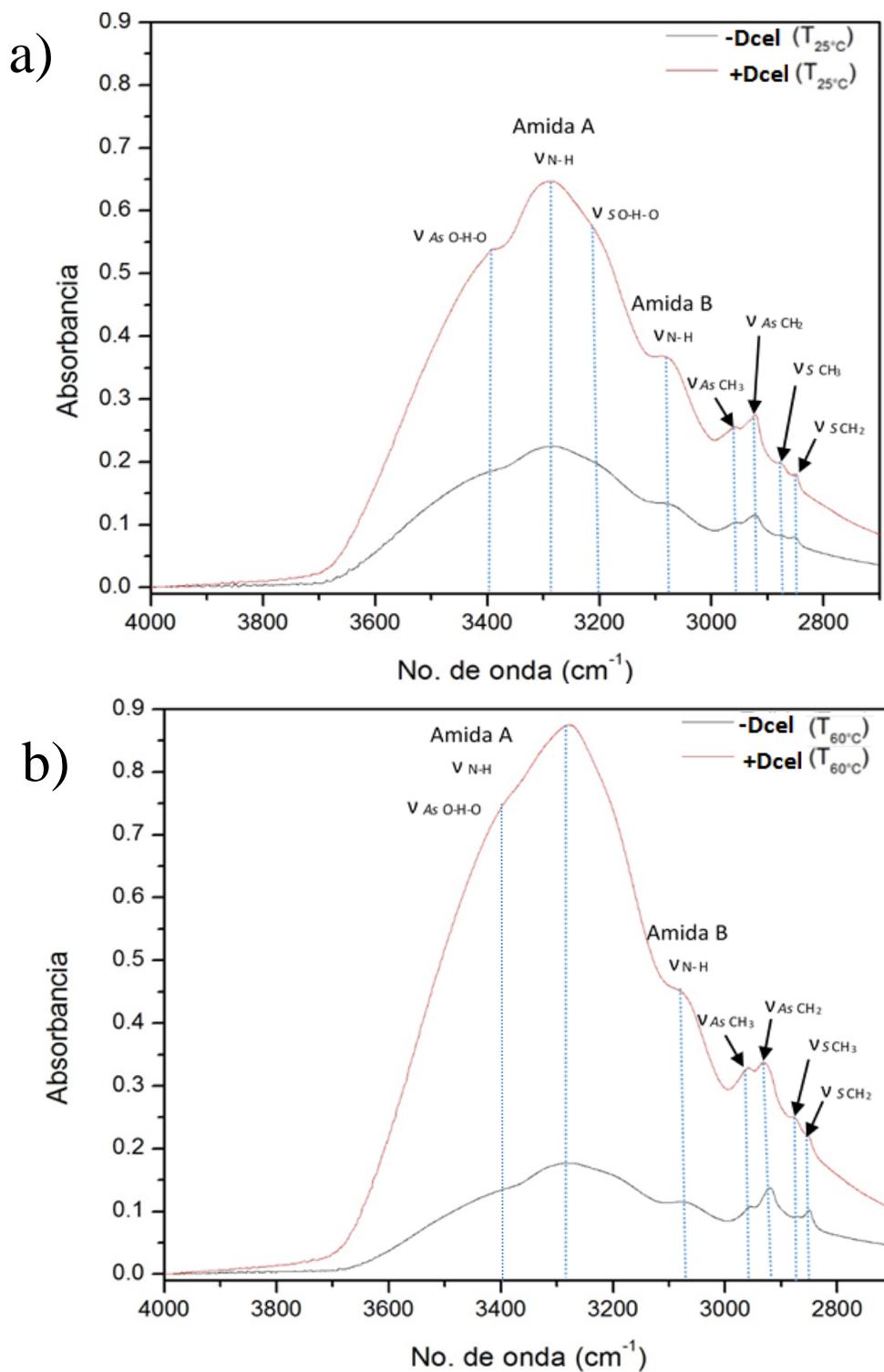


Figura 3.9. Espectros FTIR de la MEC presente en *C. xamachana* (-Dcel color negro) y Andamio (+Dcel color rojo) con tratamiento de secado a: a) 25 °C y b) secado a 60 °C en intervalo de 4000 -2700 cm<sup>-1</sup>.

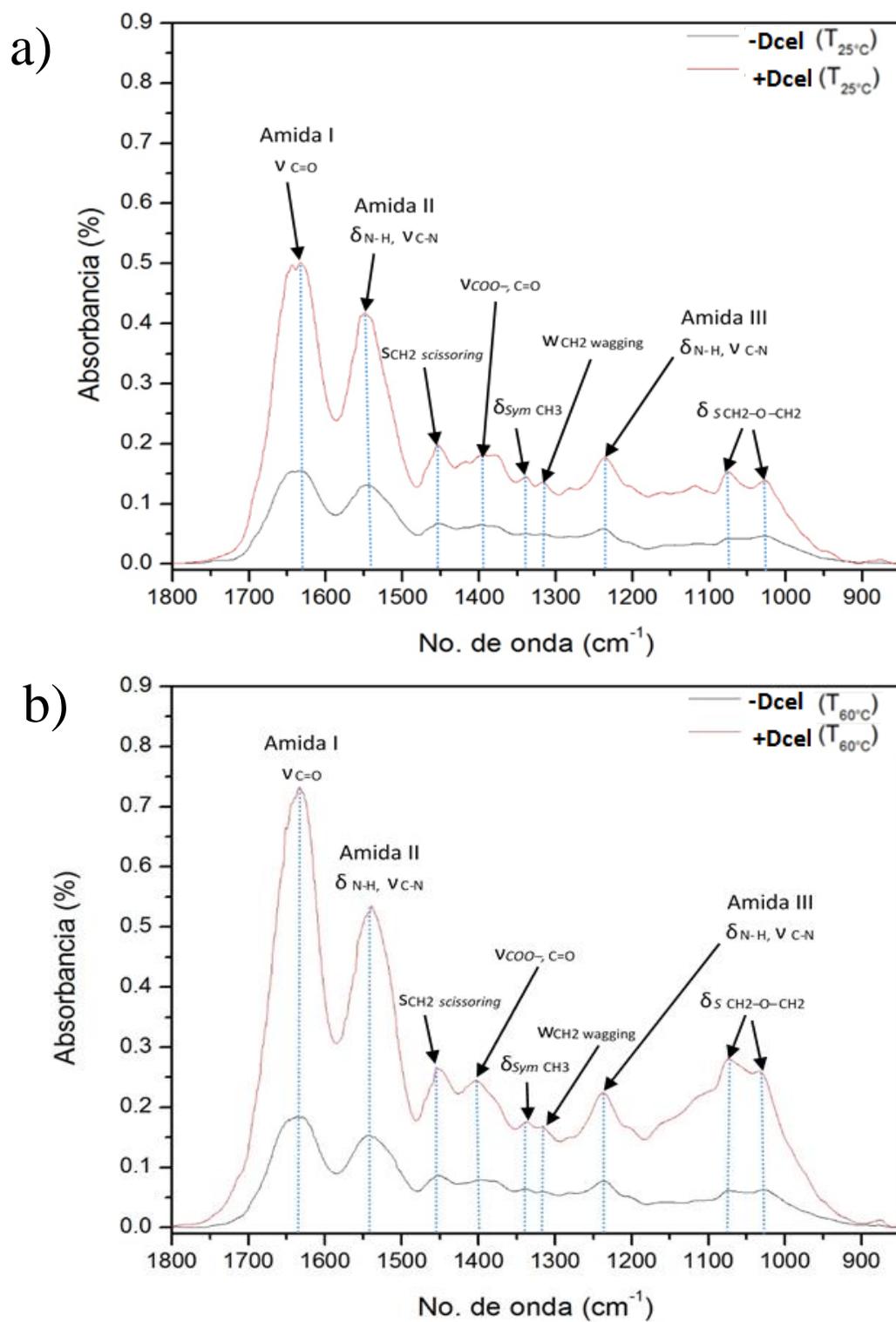


Figura 3.10. Espectros FTIR de la MEC presente en *C. xamachana* (-Dcel color negro) y Andamio (+Dcel color rojo) con tratamiento de secado a: a) 25 °C y b) secado a 60 °C en intervalo de 1800-850  $\text{cm}^{-1}$ .

En la figura 3.11 a-b) se muestra el análisis TGA, que proporciona información sobre el comportamiento térmico de -Dcel y +Dcel con los mismos tratamientos de secado. En general, la principal pérdida de peso se presenta en cuatro intervalos de temperatura diferentes dados por zona A (<150 °C), zona B (150-250 °C), zona C (250-500 °C) y zona D (>500 °C). En general, el proceso de degradación térmica de la CLG-I, según lo reportado en la literatura [83,84] representa una pérdida de masa en el tratamiento de secado a temperatura ambiente [Fig. 21 a)] del 15%. En cuanto al tratamiento de secado a temperatura de 60 °C, la pérdida de masa es mayor [Fig. 3.11 b)] representando un 50%.

La zona A corresponde a la pérdida del agua fisisorbida, que representa una pérdida de masa que representa entre un 1.1 - 3.8%, que ocurre en el intervalo de los 58.3-61.08 °C para todos los casos, esto es consistente con la literatura, la cual dicta que organismos pertenecientes al sub-phylum Medusozoa presentan en su estructura agua marina [58]. En la zona B, correspondiente a la pérdida de peso de moléculas orgánicas de bajo peso molecular según la literatura [85], para +Dcel con ambos tratamientos de secado, la pérdida de un 10%, ocurriendo alrededor de los 91.4-127.4 °C, solamente la muestra -Dcel con tratamiento de secado a 60 °C [Fig. 3.11 b)] presenta una pérdida de masa correspondiente a un 20% a una temperatura de 174.5 °C. Estas pérdidas se especula que puedan deberse a: la desnaturalización de la CLG-I, el agua quimisorbida por ambos materiales y para el caso de -Dcel exista la posibilidad de que se deba al abundante material celular presente en el tejido.

A partir de esta zona fenómenos similares ocurren con -Dcel y +Dcel. La siguiente pérdida, que se produce en el intervalo de temperaturas de la zona C en el termograma de todas las muestras, se observa entre los 250 y 350 °C, relacionadas con la degradación de la CLG, según la literatura [83]. Sin embargo, existe una gran diferencia en la pérdida de peso, correspondiente a -Dcel de un 9.08%, comparándolo con la media de +Dcel con un valor del 32.15% [Fig. 3.11 a-b)]. Las diferencias en la pérdida de masa podrían deberse al colapso de la composición estructural de la red fibrosa presente en la mesoglea y en los andamios [60] que presenta antes de realizar el procesamiento de descélularización, en donde destaca su organización. Acentuando que debido a este ordenamiento, la combustión produce una caída de masa menor en comparación con los andamios procesados, los cuales pierden esta organización estructural

al momento de llevar a cabo la descelularización de la MEC [32,63,64]. En común las cuatro muestras presentan una siguiente pérdida de peso en un intervalo de temperaturas entre los 383.9-390.7 °C con evidentes similitudes en pérdida de peso del 16.46% aproximadamente, la cual es atribuida principalmente a fenómenos de combustión, de acuerdo a la literatura [83,84]. Finalmente, todos los andamios presentan una degradación máxima en la zona D en un intervalo de temperatura de 584.92-693.18 °C, representando en +Dcel porcentajes de degradación mayores al 70% y en -Dcel con secado a 25 °C, una pérdida del 30%, mientras que con un secado a 60 °C, presenta una pérdida del 80%, esto puede ser debido a que a esta temperatura suceda un fenómeno de entrecruzamiento, según lo reportado en la literatura [86].

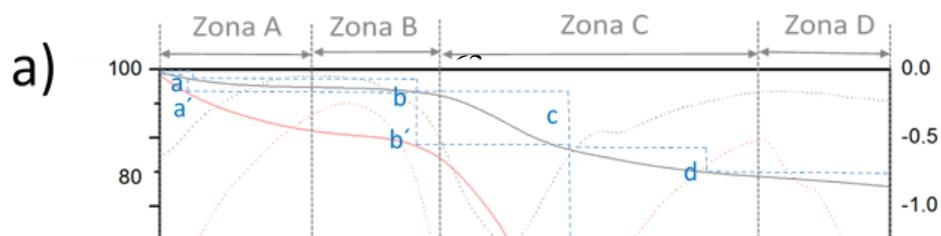


Figura 3.11. Termogr ma TGA de CLG de C. xamachana y andamio. Tratamiento de secado en: a) temperatura ambiente y b) secado a 60  C) respectivamente. La línea marcada de color negro corresponde a la pérdida de peso y la línea color azul es la primera derivada ( $\Delta$ Peso / $\Delta$ Temperatura). Los picos marcados con líneas punteadas representan la temperatura a la que sucede el fenómeno de % de pérdida de peso.

Para corroborar la composición química del material remanente en ambos casos (-Dcel y +Dcel), se realizó un análisis químico elemental (EDX) de las cenizas. En la tabla 3.1 se pueden observar la cuantificación de elementos (en porcentaje masa) presentes en las cenizas resultantes del análisis TGA -Dcel y +Dcel respectivamente. En general para ambos, es evidente el contenido de carbono con un porcentaje en peso de un 65-75%, el cual no logró una descomposición total debido a que la literatura dicta que su proceso de termodegradación inicia a los 630 °C con un máximo a los 800 °C [87]. El segundo elemento de mayor concentración común en ambos casos es el oxígeno, encontrándose entre unos 9-17% en peso, atribuyéndolo a la posible humedad que adsorbe el carbono, sales binarias u óxidos metálicos remanentes posteriores a la calcinación. Elementos como el sodio, magnesio, cloro, potasio, calcio y en el caso -Dcel azufre, son comunes de encontrar en el agua marina, presentes como iones mono y diatómicos disueltos [58]. En cuanto a +Dcel, presenta un porcentaje de silicio de un 2.53.

Tabla 3.1. Porcentaje másico de los elementos presentes en las cenizas remanentes en los andamios. ND = No detectado.

Elemento	Símbolo	-Dcel Peso (%)	+Dcel Peso (%)
Carbono	C	67.64 $\pm$ 5.8	75.44 $\pm$ 6.3
Oxígeno	O	9.06 $\pm$ 0.37	17.82 $\pm$ 0.53
Sodio	Na	6.39 $\pm$ 0.25	1.945 $\pm$ 0.24
Magnesio	Mg	1.97 $\pm$ 0.76	0.12 $\pm$ 0.02
Silicio	Si	ND	2.53 $\pm$ 3.57
Cloro	Cl	13.06 $\pm$ 3.74	1.725 $\pm$ 0.61
Potasio	K	0.6 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.014
Calcio	Ca	0.68 $\pm$ 0.12	0.3 $\pm$ 0.08
Azufre	S	0.59 $\pm$ 0.38	ND

En la figura 3.12 y 3.13 a-d), se muestra las micrográficas SEM tanto de las cenizas remanentes de -Dcel y +Dcel respectivamente. En general, en ambos casos es posible observar estructuras polimórficas, cuya microestructura cristalina de tipo cubico es más evidente en las cenizas de -Dcel [Fig. 3.12 a-d)] en comparación con +Dcel, prevaleciendo un crecimiento anisotrópico [Fig. 3.13 a-d)].

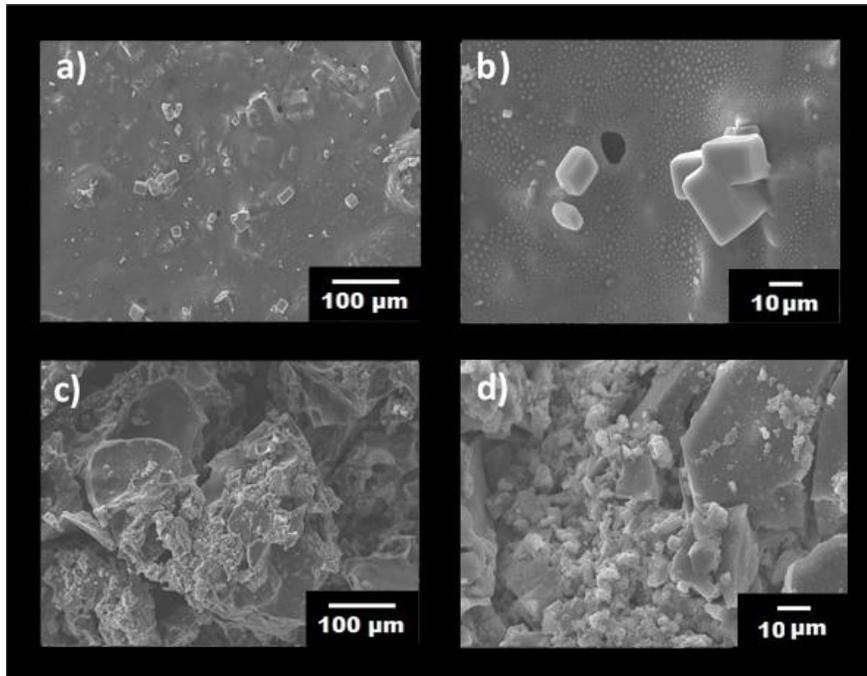


Figura 3.12. Microtopografía de las cenizas residuales del tejido de *C. xamachana* por SEM. Se muestra la escala de: a, c) 100  $\mu\text{m}$  y b, d) 10  $\mu\text{m}$  para diferentes zonas.

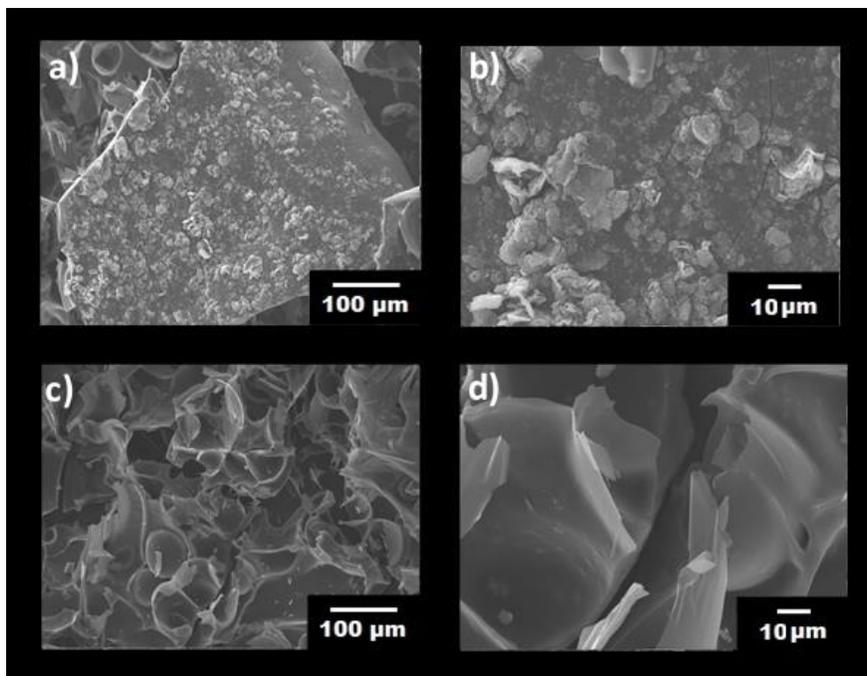


Figura 3.13. Microtopografía de las cenizas residuales del andamio descelularizado (+Dcel) por SEM.

En las figuras 3.14 y 3.15 se puede observar el mapeo químico realizado a ambos remanentes de ceniza, en los cuales se demuestra que la composición principal de los cristales es de sodio, cloro, magnesio, potasio y calcio. Además, es evidente que sobre toda la estructura carbonizada se encuentra depositado oxígeno. Algo interesante de resaltar es que el silicio se presenta en +Dcel y no en -Dcel, mientras que el azufre solo se encuentra en -Dcel.

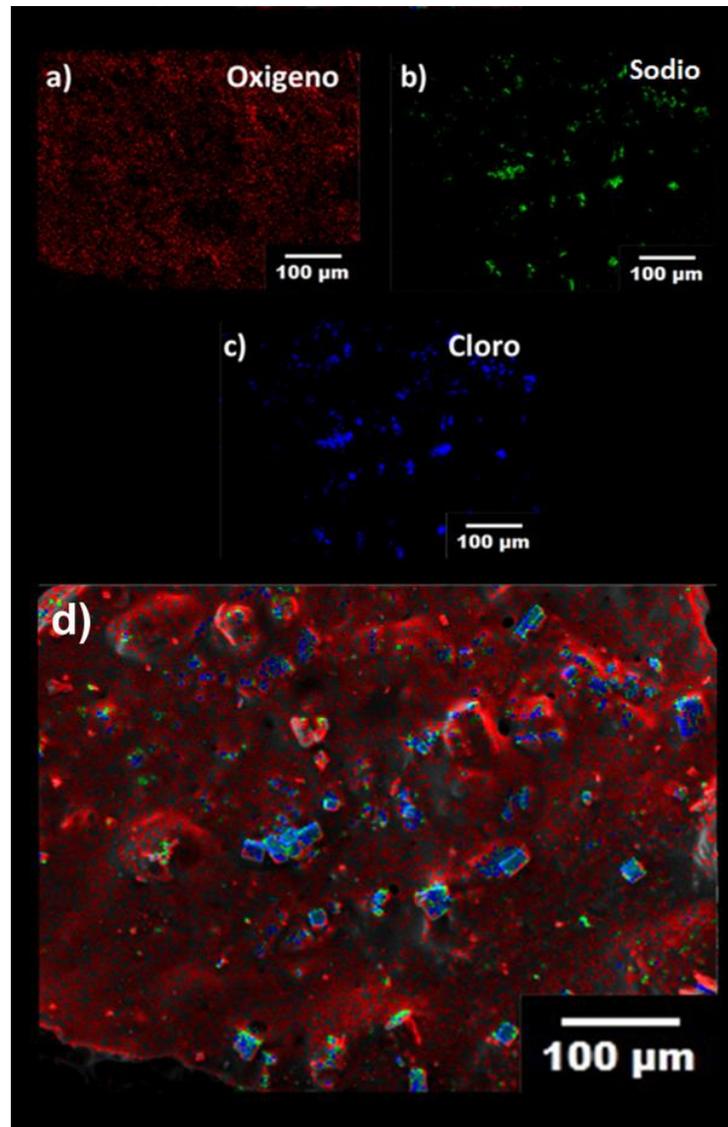


Figura 3.14. Mapeo químico (EDX) de las cenizas residuales del tejido de *C. xamachana* por SEM. Se visualiza con tonalidad: a) rojiza al oxígeno, b) verde al sodio, c) azul al cloro y d) compendio de elementos, con escala de 100 µm.

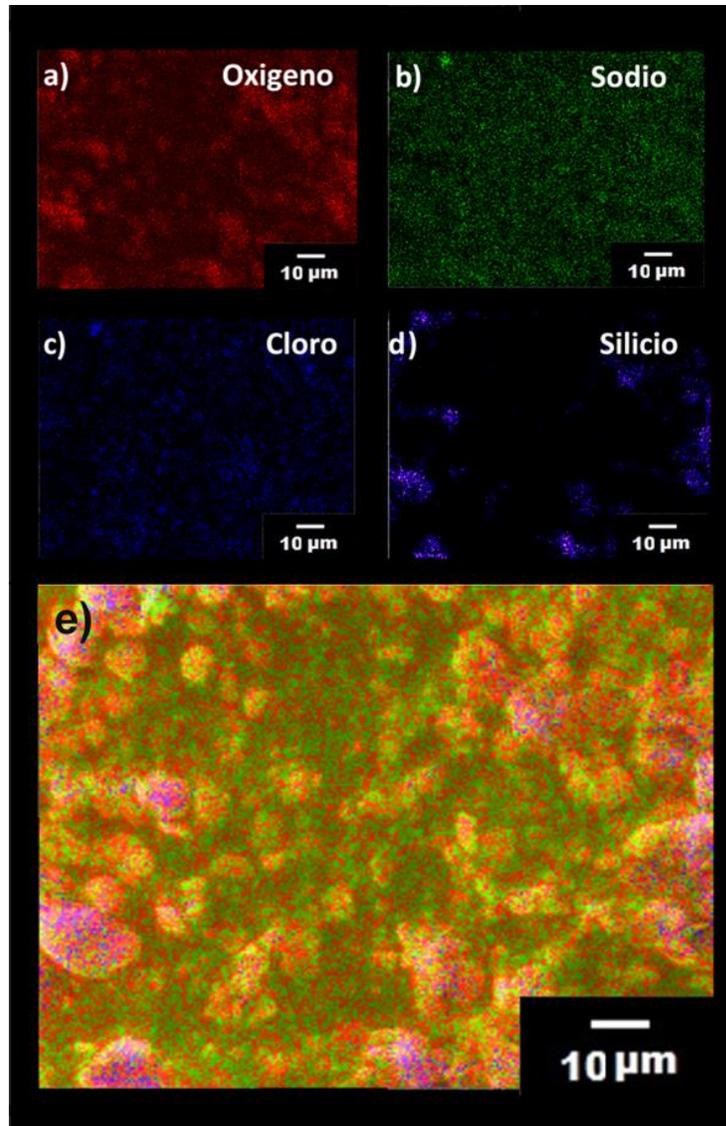


Figura 3.15. Mapeo químico (EDX) de las cenizas residuales del tejido del andamio descelularizado (+Dcel) por SEM. Se visualiza con tonalidad: a) rojiza al oxígeno, b) verde al sodio, c) azul al cloro, d) morado al silicio y d) compendio de elementos, con escala de 100 µm.

En la figura 3.16 se muestran los análisis DSC para -Dcel y +Dcel con un tratamiento de secado de 60 °C por 24 h. En general, se presenta un pico principal en el intervalo de 40 a 190 °C. La temperatura correspondiente es posiblemente debido al cambio estructural de la CLG presente en la MEC del organismo, teniendo un máximo a una temperatura de 123.63 °C, mientras que la correspondiente para el andamio es de 92 °C, ambas asignadas, de acuerdo a la literatura como la posible temperatura de desnaturalización correspondiente a CLG-I, similar al

comportamiento de CLG de otros organismos marinos [8, 89–91]. Mas aún, existe una evidente diferencia en ambas temperaturas, lo cual se puede atribuir al procesamiento de los andamios tomando como base lo reportado en 2011 por Samoullitan y colaboradores, en donde ellos determinaron que los detergentes descelularizantes tienen un efecto negativo en la temperatura de desnaturalización de las proteínas presentes en la MEC de tejidos [91]. Sin embargo, esta temperatura también puede ser debida a proceso de eliminación de agua químisorbida por la muestra, por lo que es necesario realizar futuros estudios para validar estos resultados.

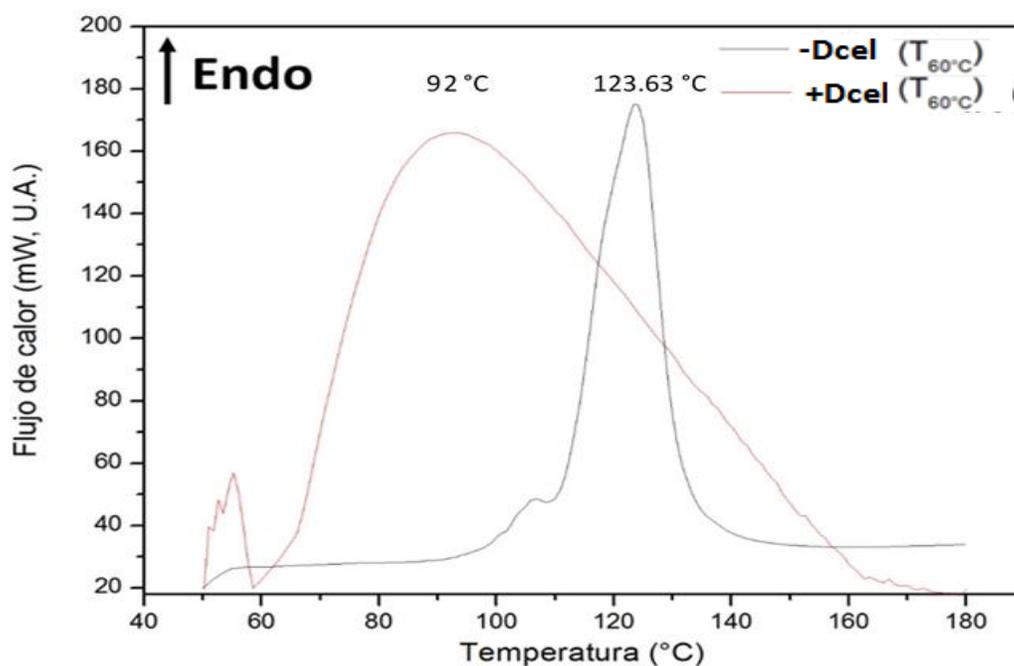


Figura 3.16. Termograma DSC de CLG de *C. xamachana*. a) Medusa sin tratamiento (M), b) andamio lote 1 (A1), c) andamio lote 2 (A2) y andamio lote 3 (A3) respectivamente.

### 3.4 Caracterización mecánica del andamio tegumentario

Las Figuras 3.17 a) y 3.18 a) muestran el gráfico esfuerzo-deformación de +Dcel con diferentes

tratamientos de secado: 25 °C y 60 °C por 24 horas respectivamente y la sección b) representa el cálculo del módulo elástico en la zona correspondiente. En la figura 3.17-a, se observa un gráfico similar al de materiales estructurados con fibras de CLG, obtenido a partir del protocolo de prueba de tracción reportado en la literatura [92]. La zona I que se encuentra en un intervalo de deformación de 0 a 1.25 mm/mm, representa la región basal presente cuando la magnitud de la resistencia a la tracción es relativamente pequeña, en esta zona sucede un fenómeno que permite a las fibras de CLG entrelazadas que se encuentran relajadas, aliniarse como se muestra en la figura. En la siguiente región (II) que representa la zona elástica en un intervalo de 1.25 a 1.82 mm/mm, las fibras de CLG comienzan a estirarse, teniendo una relación directamente proporcional entre el esfuerzo sometido y la deformación causada a las fibras presentes en el andamio. La zona plástica (intervalo 1.82 a 3.65 mm/mm de deformación, III), es la zona de plasticidad del andamio, donde tiende a absorber gran cantidad de energía debido a su tenacidad, además en esta zona comienzan a suceder algunas microfracturas que posteriormente provocarán la falla mecánica del andamio. Posteriormente en la región IV, se presenta un fenómeno de endurecimiento por deformación, causado principalmente por las deformaciones plásticas predecesoras a nivel macroscópico, teniendo el efecto de incrementar la densidad de dislocaciones del andamio. A medida que éste se satura con nuevas dislocaciones, se crea una resistencia a la formación de nuevas dislocaciones y a su movimiento [92]. Finalmente, posterior a este fenómeno sucede la fractura del andamio a un valor de deformación y esfuerzo máximo de 3.87 mm/mm y 6.44 MPa. La sección b) de la misma figura, muestra la zona elástica donde se calcula el módulo de elasticidad a tensión, se incluyen todos los valores hasta que el ajuste de la curva de línea tenga un valor R mínimo de 0.993. El valor de la pendiente en la ecuación para el andamio arroja un valor de 4.53 MPa. La literatura dicta que la piel humana, presenta un valor de modulo elástico cercano a los 0.64 MPa [93], por lo tanto el andamio secado a 25 °C presenta propiedades mecánicas siete veces mayores a la de la piel humana. Además, el andamio puede resistir dos veces mayor deformación que la piel humana, comparando su máximo de deformación y esfuerzo con respecto al reportado por Griffin y colaboradores de 1.6 mm/mm y 0.7 MPa. Algo importante a destacar es que en el trabajo mencionado anteriormente no se aclara la zona de origen del tejido analizado, además de factores extrínsecos como la edad, factores que puede causar variaciones en las propiedades mecánicas de la membrana cutánea, debido a la anisotropía que presenta la piel humana [70].

En cuanto al andamio que fue sometido a secado con temperatura controlada de 60 °C a 24 horas [Fig. 3.18 a-b)] muestra una tendencia directamente proporcional entre el esfuerzo y la deformación, siendo prácticamente un andamio mayormente elástico, debido a que la deformación presenta una relación lineal con el esfuerzo aplicado, tolerando hasta un 60% de deformación, sin embargo, su módulo de elasticidad disminuye drásticamente, teniendo un valor de 0.015 MPa, siendo cincuenta veces menor al valor del módulo de la piel humana. Por tal motivo, realizar secados a temperaturas superiores a la del ambiente por tiempos prolongados, provoca una disminución del módulo de elasticidad, favoreciendo su comportamiento elástico. Finalmente comparando ambos procesos de secado, utilizar 25 °C confiere al andamio de mayor estabilidad mecánica a esfuerzos de tensión. La comparación entre ambos módulos se puede observar en la tabla 3.2. Algo importante de resaltar es que las pruebas de resistencia mecánica a tensión de -Dcel no se realizaron, debido a inconvenientes técnicos que dificultaban la sujeción del tejido nativo en la mordaza, por lo que se pretenden realizar mayores estudios con las adecuaciones pertinentes.

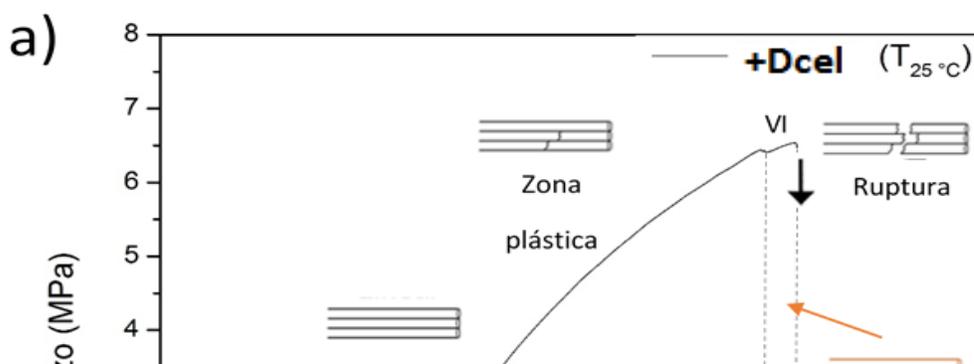


Figura 3.17. Diagrama esfuerzo-deformación del andamio tegumentario secado a 25°C. a) Gráfico general y b) cálculo del módulo elástico.

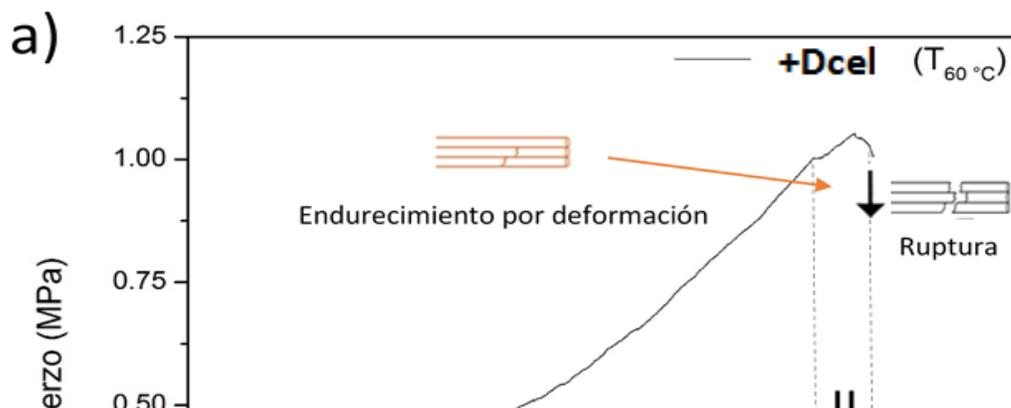


Figura 3.18. Diagrama esfuerzo deformación del andamio tegumentario secado a 60°C durante 24 h. a) Gráfico general y b) cálculo del módulo elástico.

Tabla 3.2. Tabla de modulo elástico de andamios

Tratamiento de secado (°C/24h)	Esfuerzo máximo a tensión ( $\sigma_{max}$ ) en MPa	Módulo elástico a tensión (E) en MPa
25	$1.01 \pm 0.05$	$0.015 \pm 0.027$
60	$6.58 \pm 0.3$	$4.53 \pm 0.48$

### 3.5 Ensayos de proliferación celular del andamio tegumentario

Los andamios obtenidos por el proceso de descelularización promueven la proliferación de fibroblastos humanos. En la figura 3.19 se presenta el gráfico de la cinética de proliferación (en absorbancia) de las células cultivadas sobre +Dcel, en comparación con el control positivo (C+), negativo (C-) y con -Dcel aplicando el ensayo Alamar-Blue (AB), que puede utilizarse para determinar la tasa de proliferación celular. Analizando los resultados, se puede enunciar que C+ muestra una tendencia de crecimiento de proliferación normal al compararlo con C-, el cual no presenta una tendencia de proliferación, resultado esperado para ambos casos. Una tendencia similar de proliferación celular se observa al comparar +Dcel con C+, llegando a su máximo a los siete días de ensayo, situación que es muy favorable y evidencia el potencial del andamio tegumentario para su aplicación en ingeniería tisular de la membrana cutánea. Finalmente, en cuanto a -Dcel, presenta una baja proliferación, teniendo un máximo a los tres días de ensayo ( $p < 0.05$ ), consultar Anexo C.

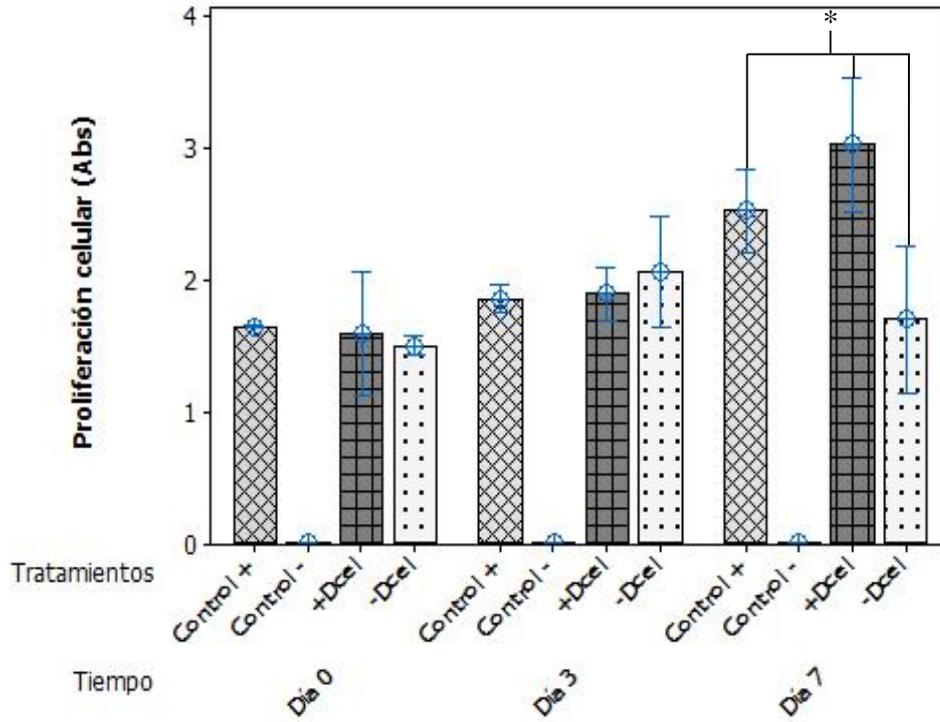


Figura 3.19. Grafico de seguimiento de proliferación celular utilizando fibroblastos humanos.

La morfología de fibroblastos cultivados en el andamio tegumentario fue examinada por SEM. Las imágenes se tomaron a los 7 días de cultivo. Los fibroblastos presentan una completa extensión sobre la superficie de +Dcel y las células colonizaron la estructura [Fig. 3.20 a-b]. Además, las células presentaron extensiones citoplasmáticas, a través de filipodias (F), para vincularse con la matriz; este resultado sugiere que los fibroblastos presentan una alta afinidad con los andamios tegumentarios. La afinidad que mostraron los fibroblastos por el andamio obtenido mediante descelularización, sugiere la potencial aplicación del mismo en ingeniería tisular de la membrana cutánea.

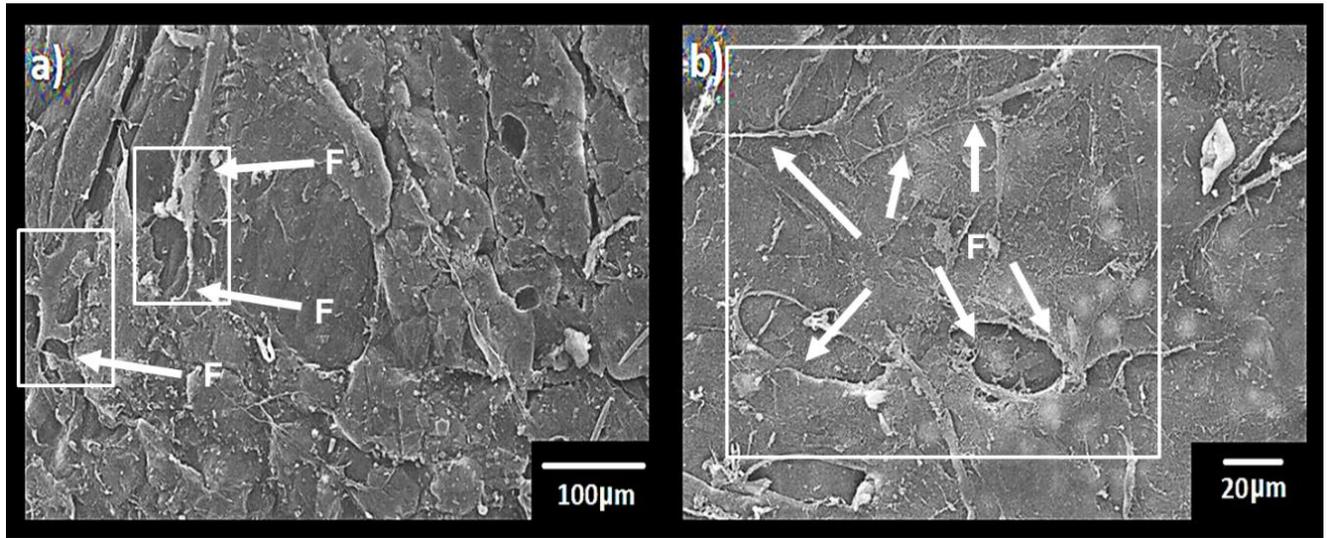


Figura 3.20. Micrografías SEM que muestran la morfología de los fibroblastos cultivados en andamios de CLG a 7 días.

## CONCLUSIONES

La descelularización de la campana de la medusa invertida (*C. Xamachana*) permitirá la obtención de un andamio con potencial aplicación en la ingeniería del tejido tegumentario.

Los andamios obtenidos muestran una ausencia de organismos simbioses y células en todo el tejido, lo cual se observó utilizando microscopía óptica. Este resultado concuerda, con la concentración de ADN remanente después del proceso de descelularización (ng/mL) en comparación con el tejido nativo, presentando un porcentaje de descelularización general del 70%.

La topográfica y distribución estructural de los andamios obtenida por microscopía electrónica de barrido, muestran similitud cualitativa con la membrana cutánea humana. Además de ello, y de acuerdo al patrón electroforético, se demostró que tanto los andamios descelularizados y nativos, se encuentran constituidos principalmente de CLG-I, cuyas bandas de vibración pertenecientes a los grupos funcionales principales y estructura secundaria se señalan con claridad a partir de los análisis de espectroscopia infrarroja. Más aún se confirma este hecho al obtener las temperaturas típicas de degradación, así como la desnaturalización de la CLG utilizando los termogramas TGA y DSC.

La resistencia mecánica del andamio resultó ser mayor a la de la de la membrana cutánea humana, teniendo un módulo de elasticidad de 4.53 MPa y 0.64 MPa respectivamente.

Finalmente, los ensayos de viabilidad celular indican que el andamio generado promueve la proliferación celular de fibroblastos humanos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible concluir que la descelularización de la campana de la medusa invertida (*C. Xamachana*) permitió generar andamios con potencial aplicación en la ingeniería del tejido tegumentario, debido a que su estructura, composición y biocompatibilidad son adecuados para tejidos dérmicos.

## PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, los andamios tegumentarios de *C. xamachana* pueden ser útiles como prototipos para el estudio de varias características de interés dentro de la ingeniería tisular y particularmente la ingeniería de tejido dérmico. De manera conjunta, se está realizando el análisis histológico para corroborar la ausencia de células en el andamio mediante tinciones con tricrómica de masón con la finalidad de evidenciar la contribución de la CLG-I y CLG-III a la estructura del andamio.

Además, respecto a la caracterización mecánica del andamio se pretenden realizar pruebas adicionales para corroborar los resultados obtenidos en esta investigación, así como determinar las propiedades mecánicas del tejido nativo de *C. xamachana*.

A mediano plazo, se pretende además explotar las propiedades de biocompatibilidad de estos andamios para su aplicación en modelo animales para la validación de la biocompatibilidad *in vivo*, con la finalidad de potencializar su uso a casos clínicos en la región sureste.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] L.E. Moctezuma-Paz, I. Páez-Franco, S. Jiménez-González, K.D. Miguel-Jaimes, G. Foncerrada-Ortega, A.Y. Sánchez-Flores, N.A. González-Contreras, N.X. Albores-de la Riva, V. Nuñez-Luna, Epidemiología de las quemaduras en México, *Rev. Espec. Méd.-Quirúrgicas*. 20 (2015). <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=47345916013> (accessed February 4, 2018).
- [2] T.M. Honnegowda, E.G. Padmanabha Udupa, P. Rao, P. Kumar, R. Singh, Superficial Burn Wound Healing with Intermittent Negative Pressure Wound Therapy Under Limited Access and Conventional Dressings, *World J. Plast. Surg.* 5 (2016) 265–273.
- [3] Y. Yousuf, S. Amini-Nik, M.G. Jeschke, 2 - Overall perspective on the clinical importance of skin models, in: *Skin Tissue Models*, Academic Press, Boston, 2018: pp. 39–54. doi:10.1016/B978-0-12-810545-0.00002-4.
- [4] J.F. Burke, I.V. Yannas, W.C. Quinby, C.C. Bondoc, W.K. Jung, Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury, *Ann. Surg.* 194 (1981) 413–428.
- [5] A.A. Chaudhari, K. Vig, D.R. Baganizi, R. Sahu, S. Dixit, V. Dennis, S.R. Singh, S.R. Pillai, Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17121974.
- [6] G. Benítez-Arvizu, G. Gutierrez-Iglesias, M. Cerbón-Cervantes, N. Rodríguez-Fuentes, J. Tapia-Ramirez, L. Alcántara-Quintana, Skin regeneration after scalp trauma through autologous transplant of acellular dermis: a mexican case study, *Int. J. Recent Sci. Res. IJRSR*. 7 (2016) 8789–8793.
- [7] S. Sharif, J. Ai, M. Azami, J. Verdi, M.A. Atlasi, S. Shirian, A. Samadikuchaksaraei, Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* (2017). doi:10.1002/jbm.b.33966.
- [8] M.L. Del Prado Audelo, K.K. Gómez Lizárraga, D.M. Giraldo Gómez David Mauricio, H. Martínez Hernández, N. Rodríguez Fuentes, A.E. Castell Rodríguez, E. B. Montufar, M.C. Piña Barba, Development of collagen-EDC scaffolds for skin tissue engineering: physicochemical and biological characterization, *IJOER Eng. J.* 2 (2016) 73–83.

- [9] W. Friess, Collagen--biomaterial for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 45 (1998) 113–136.
- [10] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, Collagens--structure, function, and biosynthesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1531–1546.
- [11] L. Pauling, R.B. Corey, H.R. Branson, The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 37 (1951) 205–211.
- [12] M. Schmidt, R. Dornelles, R. Mello RO, E. Kubota, M. Mazutti, A. Kempka, I. Demiate, Collagen extraction process., *Int. Food Res. J.* 23 (2016) 913–922.
- [13] W.H. Eaglstein, V. Falanga, Tissue engineering and the development of Apligraf a human skin equivalent, *Adv. Wound Care J. Prev. Heal.* 11 (1998) 1–8.
- [14] Y. Takami, R. Yamaguchi, Y. Matsuda, Method of Preparing Isolated Cell-Free Skin, Cell-Free Dermal Matrix, Method of Producing the Same and Composite Cultured Skin with The Use of the Cell-Free Dermal Matrix, US20070269791 A1, 2007. <http://www.google.com/patents/US20070269791> (accessed February 4, 2018).
- [15] N. Rodríguez-Fuentes, A.G. Rodríguez-Hernández, J. Enríquez-Jiménez, L.E. Alcántara-Quintana, L. Fuentes-Mera, M.C. Piña-Barba, A. Zepeda-Rodríguez, J.R. Ambrosio, Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434 (2013) 676–680. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.007.
- [16] K. Gómez-Lizárraga, C. Piña-Barba, N. Rodríguez-Fuentes, Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino, *Soc. Mex. Cienc. Tecnol. Superf. Mater.* 24 (2011) 137–140.
- [17] H. Ehrlich, *Biological Materials of Marine Origin: Vertebrates*, Springer, 2014.
- [18] H. Ehrlich, *Biological Materials of Marine Origin: Invertebrates*, Springer Netherlands, 2012.
- [19] N.R.C. (US) C. on M.B.B.A. of M.N. Products, COMMITTEE ON MARINE BIOTECHNOLOGY: BIOMEDICAL APPLICATIONS OF MARINE NATURAL PRODUCTS, National Academies Press (US), 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220513/> (accessed February 4, 2018).
- [20] W. Pustlauk, B. Paul, M. Gelinsky, A. Bernhardt, Jellyfish collagen and alginate:

- Combined marine materials for superior chondrogenesis of hMSC, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 64 (2016) 190–198. doi:10.1016/j.msec.2016.03.081.
- [21] Z. Hu, P. Yang, C. Zhou, S. Li, P. Hong, Marine Collagen Peptides from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and Wound Healing Evaluation, *Mar. Drugs*. 15 (2017). doi:10.3390/md15040102.
- [22] *Marine Glycobiology: Principles and Applications*, CRC Press. (2016). <https://www.crcpress.com/Marine-Glycobiology-Principles-and-Applications/Kim/p/book/9781498709613> (accessed February 4, 2018).
- [23] C. Ferrario, L. Leggio, R. Leone, C. Di Benedetto, L. Guidetti, V. Coccè, M. Ascagni, F. Bonasoro, C.A.M. La Porta, M.D. Candia Carnevali, M. Sugni, Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues, *Mar. Environ. Res.* 128 (2017) 46–57. doi:10.1016/j.marenvres.2016.03.007.
- [24] A. Leone, R.M. Lecci, M. Durante, F. Meli, S. Piraino, The Bright Side of Gelatinous Blooms: Nutraceutical Value and Antioxidant Properties of Three Mediterranean Jellyfish (Scyphozoa), *Mar. Drugs*. 13 (2015) 4654–4681. doi:10.3390/md13084654.
- [25] Y. Zhuang, H. Hou, X. Zhao, Z. Zhang, B. Li, Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation, *J. Food Sci.* 74 (2009) H183–188. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01236.x.
- [26] N.M.H. Khong, F.M. Yusoff, B. Jamilah, M. Basri, I. Maznah, K.W. Chan, N. Armania, J. Nishikawa, Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes, *Food Chem.* 251 (2018) 41–50. doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.083.
- [27] W. Pustlauk, B. Paul, S. Brueggemeier, M. Gelinsky, A. Bernhardt, Modulation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in jellyfish collagen scaffolds by cell density and culture medium, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 1710–1722. doi:10.1002/term.2065.
- [28] J.P. Widdowson, A.J. Picton, V. Vince, C.J. Wright, A. Mearns-Spragg, In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106 (2018) 1524–1533. doi:10.1002/jbm.b.33959.
- [29] R. Deutzmann, S. Fowler, X. Zhang, K. Boone, S. Dexter, R.P. Boot-Handford, R. Rachel,

- M.P. Sarras, Molecular, biochemical and functional analysis of a novel and developmentally important fibrillar collagen (Hcol-I) in hydra, *Dev. Camb. Engl.* 127 (2000) 4669–4680.
- [30] ©Jellagen., Manufacturers of Next Generation Non Mammalian Jellyfish Collagen for Tissue Engineering Research, Cell Culture and Biochemistry, Jellagen. (n.d.). <https://www.jellagen.co.uk/> (accessed September 8, 2018).
- [31] W.L. Ng, W.Y. Yeong, M.W. Naing, Cellular Approaches to Tissue-Engineering of Skin: A Review, *J. Tissue Sci. Eng.* 6 (2015) 1–9. doi:10.4172/2157-7552.1000150.
- [32] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials.* 32 (2011) 3233–3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- [33] R. Payne Bigelow, On the anatomy and development of *Cassiopea xamachana.*, Tesis de grado Académico (Publicada), Johns Hopkins University, 1892. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/66748#page/7/mode/1up>.
- [34] J. Lara Rodríguez, Distribución y abundancia de la medusa invertida del manglar (*Cassiopea xamachana*) en la laguna costera de Chelem, Yucatán, Tesis de grado académico (no publicada), Universidad Autónoma de Yucatán, 2017.
- [35] R. Skalak, C.F. Fox, Tissue engineering, *R M Neren Ann Biomed Eng.* 19 (1988).
- [36] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science.* 260 (1993) 920–926.
- [37] F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush, Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2 (2011) 403–430. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- [38] J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, Chapter 1 - The History and Scope of Tissue Engineering, in: *Princ. Tissue Eng. Fourth Ed.*, Academic Press, Boston, 2014: pp. 3–8. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X.
- [39] M.E. Furth, A. Atala, Chapter 6 - Tissue Engineering: Future Perspectives, in: R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), *Princ. Tissue Eng. Fourth Ed.*, Academic Press, Boston, 2014: pp. 83–123. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00006-9.
- [40] R.M. Nerem, S.C. Schutte, Chapter 2 - The Challenge of Imitating Nature, in: *Princ. Tissue Eng. Fourth Ed.*, Academic Press, Boston, 2014: pp. 9–24. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00002-1.

- [41] H.B. Hedegaard, R.L. Johnson, M.F. Ballesteros, Proposed ICD-10-CM Surveillance Case Definitions for Injury Hospitalizations and Emergency Department Visits, *Natl. Health Stat. Rep.* (2017) 1–8.
- [42] J. Fenner, R.A.F. Clark, Chapter 1 - Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin, in: M.Z. Albanna, J.H.H. Iv (Eds.), *Skin Tissue Eng. Regen. Med.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 1–17. doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00001-2.
- [43] S. Sanon, D.A. Hart, E.E. Tredget, Chapter 2 - Molecular and Cellular Biology of Wound Healing and Skin Regeneration, in: M.Z. Albanna, J.H.H. Iv (Eds.), *Skin Tissue Eng. Regen. Med.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 19–47. doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00002-4.
- [44] G. Navarrete Franco, Histología de la piel, *Rev. Fac. Med.* 46 (2009). <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rfm/article/view/12737> (accessed September 8, 2018).
- [45] P.A. Than, C.R. Davis, G.C. Gurtner, Chapter 4 - Clinical Management of Wound Healing and Hypertrophic Scarring, in: M.Z. Albanna, J.H.H. Iv (Eds.), *Skin Tissue Eng. Regen. Med.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 61–81. doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00004-8.
- [46] R.F. Pereira, P.J. Bártolo, Traditional Therapies for Skin Wound Healing, *Adv. Wound Care.* 5 (2016) 208–229. doi:10.1089/wound.2013.0506.
- [47] M. Ashrafi, A. Hague, M. Baguneid, T. Alonso-Rasgado, A. Bayat, 9 - Wound healing and cutaneous scarring models of the human skin, in: *Skin Tissue Models*, Academic Press, Boston, 2018: pp. 201–221. doi:10.1016/B978-0-12-810545-0.00009-7.
- [48] C. Guarín-Corredor, P. Quiroga-Santamaría, N.S. Landinez-Parra, Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas, *Rev. Fac. Med.* 61 (2013) 441–448.
- [49] Z. Wu, X. Su, Y. Xu, B. Kong, W. Sun, S. Mi, Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24474. doi:10.1038/srep24474.
- [50] I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, E. Bernotienė, Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects, *Cytotechnology.* 68

- (2016) 355–369. doi:10.1007/s10616-015-9895-4.
- [51] K. Binder, A. Skardal, Chapter 20 - Human Skin Bioprinting: Trajectory and Advances, in: M.Z. Albanna, J.H.H. Iv (Eds.), *Skin Tissue Eng. Regen. Med.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 401–420. doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00020-6.
- [52] M.Q. Yousif, S.A. Qasem, Chapter 3 - Tissue Processing and Staining for Histological Analyses, in: M.Z. Albanna, J.H.H. Iv (Eds.), *Skin Tissue Eng. Regen. Med.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 49–59. doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00003-6.
- [53] L.C. Abraham, E. Zuena, B. Perez-Ramirez, D.L. Kaplan, Guide to collagen characterization for biomaterial studies, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 87 (2008) 264–285. doi:10.1002/jbm.b.31078.
- [54] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Materials.* 3 (2010) 1863–1887. doi:10.3390/ma3031863.
- [55] C. Pellevoisin, C. Bouez, J. Cotovio, 1 - Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing, in: *Skin Tissue Models*, Academic Press, Boston, 2018: pp. 3–37. doi:10.1016/B978-0-12-810545-0.00001-2.
- [56] E. Song, S. Yeon Kim, T. Chun, H.-J. Byun, Y.M. Lee, Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility, *Biomaterials.* 27 (2006) 2951–2961. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.015.
- [57] P. Cabrales-Arellano, T. Islas-Flores, P.E. Thomé, M.A. Villanueva, Indomethacin reproducibly induces metamorphosis in *Cassiopea xamachana scyphistomae*, *PeerJ.* 5 (2017) e2979. doi:10.7717/peerj.2979.
- [58] R.C. Brusca, *Invertebrates*, Sinauer, 2016.
- [59] C. Hamlet, A. Santhanakrishnan, L.A. Miller, A numerical study of the effects of bell pulsation dynamics and oral arms on the exchange currents generated by the upside-down jellyfish *Cassiopea xamachana*, *J. Exp. Biol.* 214 (2011) 1911–1921. doi:10.1242/jeb.052506.
- [60] C. Gambini, B. Abou, A. Ponton, A.J.M. Cornelissen, Micro- and Macrorheology of Jellyfish Extracellular Matrix, *Biophys. J.* 102 (2012) 1–9. doi:10.1016/j.bpj.2011.11.4004.
- [61] N. O'Connor, J. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde, H. Green, GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS

- EPIDERMAL CELLS, *The Lancet*. 317 (1981) 75–78. doi:10.1016/S0140-6736(81)90006-4.
- [62] M.A. Moore, B. Samsell, G. Wallis, S. Triplett, S. Chen, A.L. Jones, X. Qin, Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review, *Cell Tissue Bank*. 16 (2015) 249–259. doi:10.1007/s10561-014-9467-4.
- [63] A.H. Morris, J. Chang, T.R. Kyriakides, Inadequate Processing of Decellularized Dermal Matrix Reduces Cell Viability In Vitro and Increases Apoptosis and Acute Inflammation In Vivo, *BioResearch Open Access*. 5 (2016) 177–187. doi:10.1089/biores.2016.0021.
- [64] J. Xiang, X. Zheng, P. Liu, L. Yang, D. Dong, W. Wu, X. Liu, J. Li, Y. Lv, Decellularized spleen matrix for reengineering functional hepatic-like tissue based on bone marrow mesenchymal stem cells, *Organogenesis*. 12 (2016) 128–142. doi:10.1080/15476278.2016.1185584.
- [65] I. Ortegón-Aznar, I. Sánchez-Molina, R.H.C. Cetz, The distribution of marine algae in a coastal lagoon, northern Yucatan Peninsula, Mexico, *Neotropical Biol. Conserv.* 4 (2009) 99–105. doi:10.4013/5121.
- [66] J.E. Purcell, W.M. Graham, H.J. Dumont, Jellyfish Blooms: Ecological and Societal Importance: Proceedings of the International Conference on Jellyfish Blooms, held in Gulf Shores, Alabama, 12–14 January 2000, Springer Science & Business Media, 2012.
- [67] J. Doyle, J. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19 (1987) 11–15.
- [68] L. Sang, C. Wang, Y. Wang, Z. Wei, Thermo-oxidative ageing effect on mechanical properties and morphology of short fibre reinforced polyamide composites – comparison of carbon and glass fibres, *RSC Adv.* 7 (2017) 43334–43344. doi:10.1039/C7RA07884F.
- [69] R.S. Blanquet, M.A. Phelan, An unusual blue mesogleal protein from the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana*, *Mar. Biol.* 94 (1987) 423–430. doi:10.1007/BF00428249.
- [70] Skin, in: *Ultrastruct. Atlas Hum. Tissues*, Wiley-Blackwell, 2014: pp. 671–748. doi:10.1002/9781118284551.ch13.
- [71] T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif, K. Ilyas, N. Muhammad, S. Zaman Safi, A. Rahim, S. Rizvi, I. Rehman, FTIR analysis of natural and synthetic collagen, *Appl. Spectrosc. Rev.* (2018)

1–44.

- [72] P. Garidel, H. Schott, Fourier-transform midinfrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations. Part 2: Detailed analysis and applications, *Bioprocess Int.* 4 (2006) 48–55.
- [73] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, C. Petibois, Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 829–837. doi:10.1007/s00216-009-3019-y.
- [74] P. Qi, Y. Zhou, D. Wang, Z. He, Z. Li, A new collagen solution with high concentration and collagen native structure perfectly preserved, *RSC Adv.* 5 (2015) 87180–87186. doi:10.1039/C5RA14423J.
- [75] C. Chadeaux, A.-S. Le Hô, L. Bellot-Gurlet, I. Reiche, Curve-fitting micro-ATR-FTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials, *E-Preserv. Sci.* 6 (2009) 129–137.
- [76] T. Nagai, N. Suzuki, Y. Tanoue, N. Kai, T. Nagashima, Characterization of Acid-Soluble Collagen from Skins of Surf Smelt (*Hypomesus pretiosus japonicus* Brevoort), *Food Nutr. Sci.* 1 (2010) 59–66.
- [77] M.A. Rizk, N.Y. Mostafa, Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications, *Orient. J. Chem.* 32 (2016) 1601–1609.
- [78] X. Cheng, Z. Shao, C. Li, L. Yu, M.A. Raja, C. Liu, Isolation, Characterization and Evaluation of Collagen from Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for Use in Hemostatic Applications, *PloS One.* 12 (2017) e0169731. doi:10.1371/journal.pone.0169731.
- [79] V.A. Iconomidou, D.G. Chryssikos, V. Gionis, M.A. Pavlidis, A. Paipetis, S.J. Hamodrakas, Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy, *J. Struct. Biol.* 132 (2000) 112–122. doi:10.1006/jsbi.2000.4307.
- [80] A. Mauerer, G. Lee, Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from alpha-helix, beta-sheet or random coil conformations, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 62 (2006) 131–142. doi:10.1016/j.ejpb.2005.08.005.
- [81] K.J. Payne, A. Veis, Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions:

- deconvolution of the amide I band for conformational studies, *Biopolymers*. 27 (1988) 1749–1760. doi:10.1002/bip.360271105.
- [82] D.M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers*. 25 (1986) 469–487. doi:10.1002/bip.360250307.
- [83] B.H. León-Mancilla, M.A. Araiza-Téllez, J.O. Flores-Flores, M.C. Piña-Barba, Physicochemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering, *J. Appl. Res. Technol.* 14 (2016) 77–85. doi:10.1016/j.jart.2016.01.001.
- [84] Martínez Hernández Héctor, *Descelularización De Órganos: Diseño Y Construcción De Un Dispositivo Para La Obtención De Andamios 3d*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [85] S. Vyazovkin, Thermogravimetric Analysis, in: *Charact. Mater.*, American Cancer Society, 2012: pp. 1–12. doi:10.1002/0471266965.com029.pub2.
- [86] J.M. Ruijgrok, J.R. de Wijn, M.E. Boon, Glutaraldehyde crosslinking of collagen: Effects of time, temperature, concentration and presoaking as measured by shrinkage temperature, *Clin. Mater.* 17 (1994) 23–27. doi:10.1016/0267-6605(94)90044-2.
- [87] M.A. Gómez, C.C. Alzate, A. Márquez, J.W. Restrepo, F. Jaramillo, EFFECT OF TEMPERATURE ON THE TENSILE STRENGTH OF SOME FIBER REINFORCEMENTS FOR CERAMIC OR POLYMER MATRICES, *Rev. EIA.* (2009) 65–75.
- [88] M. Broström, S. Enestam, R. Backman, K. Mäkelä, Condensation in the KCl–NaCl system, *Fuel Process. Technol.* 105 (2013) 142–148. doi:10.1016/j.fuproc.2011.08.006.
- [89] G. Leyva-Gómez, E. Lima, G. Krötzsch, R. Pacheco-Marín, N. Rodríguez-Fuentes, D. Quintanar-Guerrero, E. Krötzsch, Physicochemical and functional characterization of the collagen-polyvinylpyrrolidone copolymer, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 9272–9283. doi:10.1021/jp502476x.
- [90] W. Torres-Arreola, R. Pacheco-Aguilar, R.R. Sotelo-Mundo, O. Rouzaud-Sáñez, J.M. Ezquerro-Brauer, CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DEL MANTO, ALETA Y TENTÁCULOS DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*), *Cienc. Technol. Aliment.* 6 (2008) 101–108.
- [91] V. Samouillan, F. Delaunay, J. Dandurand, N. Merbahi, J.-P. Gardou, M. Yousfi, A. Gandaglia, M. Spina, C. Lacabanne, The Use of Thermal Techniques for the

- Characterization and Selection of Natural Biomaterials, *J. Funct. Biomater.* 2 (2011) 230–248. doi:10.3390/jfb2030230.
- [92] M. Nordin, V.H. Frankel, *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [93] M. Griffin, Y. Premakumar, A. Seifalian, P.E. Butler, M. Szarko, *Biomechanical Characterization of Human Soft Tissues Using Indentation and Tensile Testing*, *J. Vis. Exp. JoVE.* (2016). doi:10.3791/54872.
- [94] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, 2008.
- [95] S. Soliman, S. Sant, J.W. Nichol, M. Khabiry, E. Traversa, A. Khademhosseini, Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 96 (2011) 566–574. doi:10.1002/jbm.a.33010.
- [96] Z. Tong, S. Sant, A. Khademhosseini, X. Jia, Controlling the fibroblastic differentiation of mesenchymal stem cells via the combination of fibrous scaffolds and connective tissue growth factor, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 2773–2785. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0219.

## Capítulo 4

### **ANEXOS**

## ANEXO A. Carta de Consentimiento informado

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mérida, Yucatán. a

Día		Mes		Año	

A quien corresponda:

Yo \_\_\_\_\_ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio ***“Evaluación de la biocompatibilidad de andamios poliméricos en cultivos primarios de fibroblastos humanos”*** Que se realiza en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY A.C.) en conjunto con el Centro Dermatológico de Yucatán (CDY). Entiendo que los objetivos del proyecto consisten en obtener y analizar una biopsia de piel, y que las células obtenidas (fibroblastos) a partir de la biopsia, se emplearan para la evaluación de curación de heridas mediante andamios. Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados consisten en que la biopsia de piel me será retirada de la espalda por un cirujano calificado, a través del empleo de un sacabocado estéril y desechable de 2 mm de diámetro y que la biopsia obtenida se empleará para a investigación.

Los riesgos para mi persona son los implicados en la toma de la biopsia, lo que puede generar molestia en la extracción relacionada al uso del sacabocado y a la aplicación intradérmica de la anestesia y posterior sutura del área sujeta a biopsia. El resto de los procedimientos no tienen riesgo. 3 Días después de la toma de biopsia deberé acudir al CDY con la finalidad de que el personal de salud revise la sanación de la lesión y retire los puntos de sutura.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio.

Así mismo, cualquier trastorno temporalmente relacionado con esta investigación podre

consultarlo con la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, con sede en Calle 43 No. 130. Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, a al teléfono +52 (999) 942-8330.

Cuando el trastorno se identifique como efecto de la intervención, los gastos relacionados con la recuperación de la salud o la estabilización y control de las secuelas serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en la institución no se verá afectada.

Nombre del paciente	Firma
Domicilio	Teléfono
Nombre y firma del testigo	Firma
Domicilio	Teléfono
Nombre y firma del testigo	Firma
Domicilio	Teléfono
Nombre y firma del Investigador responsable	Firma
Domicilio	Teléfono

c.c.p Paciente o familiar

c.c.p. Investigador (conservar en el expediente de la investigación)

## **ANEXO B. Comprobación estadística del proceso de descelularización**

De manera conjunta, se realizó un análisis de ajuste estadístico para verificar la significancia de los datos obtenidos del proceso de descelularización. En la figura 4.1 es posible observar el gráfico obtenido de la distribución normal de los datos, con un tamaño de muestra de 12 individuos, una media muestral de 322.392 ng/mL y una desviación estándar de 241.038 ng/mL. Asumiendo que los nanogramos de DNA presentes en un mililitro de disolución ng/mL proviene de una distribución normal, los límites de tolerancia establecen que se puede estar 95.0% confiados en que 99.0% de la distribución cae entre -677.807 y 1322.59 como se muestra en la gráfica (Fig. 4.1, límites dictados por líneas verdes). Este intervalo se calcula tomando la media de los datos  $\pm 4.14954$  veces la desviación estándar.

Los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov-Smirnov se pueden observar en la tabla 3, con respecto a los datos obtenidos de la respuesta de nanogramos de DNA por mililitro presente en las muestras. Para la primera prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtuvo un valor de probabilidad de 0.14, en donde debido a que este valor es mayor al valor de significancia  $\alpha$  de 0.05, se puede aceptar la idea de que los datos de ng/mL de DNA de las muestras provienen de una distribución normal con 95% de confianza. En cuanto a la segunda prueba de normalidad, Kolmogorov-Smirnov arroja un valor de probabilidad de 0.77, el cual al ser un valor mayor al valor de significancia  $\alpha$  de 0.05, se puede aceptar la idea de que ng/mL proviene de una distribución normal con 95% de confianza. De ambas pruebas podemos concluir que la variable de respuesta ng/ml tiene una distribución normal, por lo tanto es posible realizar pruebas paramétricas de comparación de medias para determinar los factores que la afectan como lo dicta la literatura [94].

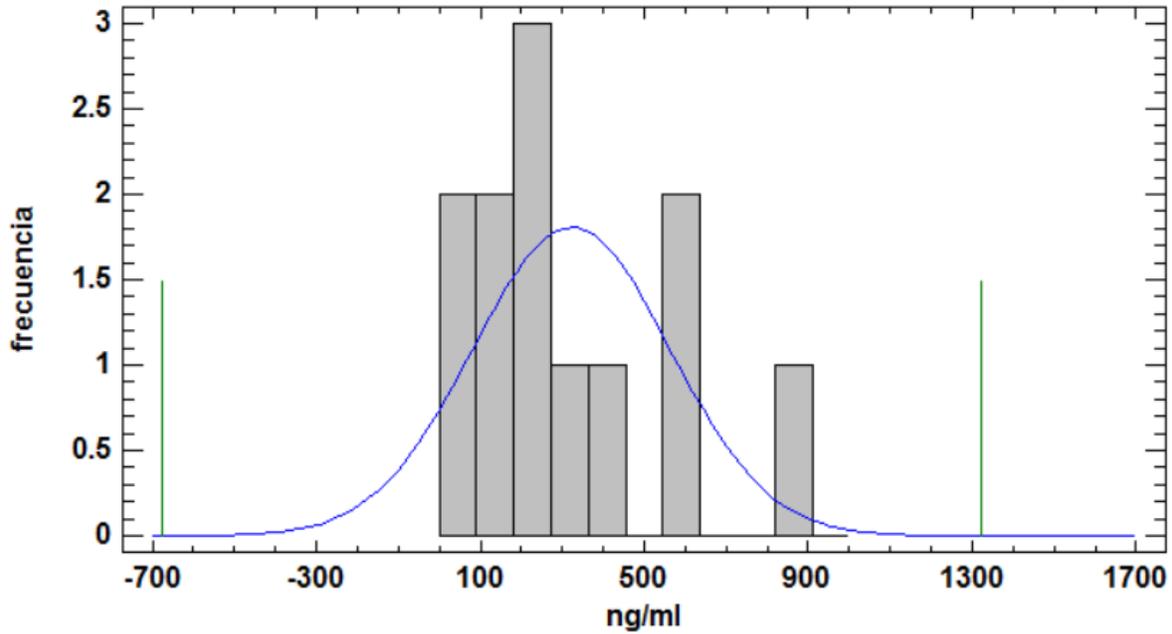


Figura 0.1 Gráfico de frecuencias para ng/mL.

Tabla 4.1. Pruebas de Normalidad para ng/mL.

Prueba	Estadístico	Valor de Probabilidad (P)
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.897872	0.142358
Estadístico de prueba Kolmogorov-Smirnov	0.192006	0.768222

De acuerdo con lo anterior es posible proponer un análisis estadístico paramétrico, en donde la idea principal es analizar el efecto de los tratamientos sobre la cuantificación de DNA presente en las muestras, para esto se realiza un diseño experimental de análisis de varianza ANOVA de una vía para comparar las medias entre tratamientos y sí es que éstas presentan alguna similitud, en donde nuestra hipótesis nula (que llamaremos  $H_0$ ) dictaría que no existen diferencias estadísticamente significativa en cuanto a la cantidad de DNA presente en las muestras. Por el contrario, la hipótesis alternativa (representada por  $H_i$ ), declinaría a que existen diferencias

significativas en la cantidad de DNA presente en las muestras, por lo menos en alguno de los casos. A continuación, se muestra el análisis estadístico para la variable que cuantifica el DNA presente en cada muestra.

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado para el DNA presente en cada muestra. Los datos fueron analizados con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , en donde se tomaron en cuenta los valores de probabilidad (P) obtenidos, con la finalidad de determinar si los resultados son estadísticamente significativos. De acuerdo con éstos, el porcentaje de DNA contenido medido en nanogramos por mililitro, en función de las muestras descelularizadas y el control de tejido normal, son factores significativos para el ajuste del modelo, debido a que su valor P es menor (0.003) al valor de significancia que se tomó como referencia ( $\alpha=0.05$ ). Es decir, se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , aceptando la alternativa  $H_1$ , lo cual quiere decir que existe evidencia estadísticamente significativa, con un 95% de confianza de que la cantidad de DNA en ng/mL presente en las muestras descelularizadas y de tejido normal es diferente.

Tabla 4.2 Análisis de Varianza de los nanogramos por mililitro de DNA presente en cada muestra Vs Tratamiento de descelularización.

Fuente de variación	Grados de libertad (DF)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrado Medio (MS)	Estadístico de Fisher (F)	Valor de Probabilidad (P)
ng/ml	3	518430	172810	11.46	0.003
Error	8	120664	15083		
Total	11	639094			

Al analizar las gráficas de residuales para el rendimiento, mostradas en la Figura 4.2, se observa que éstos se encuentran normalmente distribuidos. En la gráfica de histograma [Fig. 4.2 a)] se muestra un comportamiento normal parcial, el cual puede ser corroborado al observar el gráfico de probabilidad [Fig. 4.2 b)], en el cual los datos se encuentran con una tendencia marcada

sobre la línea de probabilidad normal. Finalmente, en el gráfico de residuales vs ajustes [Fig. 4.2-c)] se observa que los residuos presentan una varianza constante, salvo algunos datos que para efectos de esta investigación pudieran considerarse como puntos a mejorar, en cuanto al procesamiento de andamios tegumentarios en función de la presencia de DNA residual. Esto muestra un buen control en cuanto al experimento y que los resultados que arroje el análisis son fidedignos, de acuerdo con Montgomery y colaboradores [94].

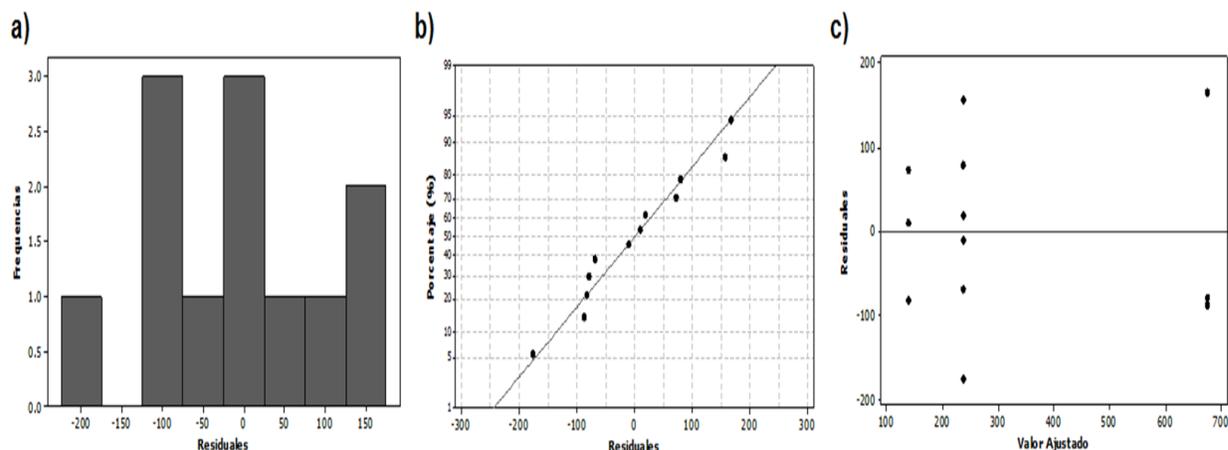


Figura 0.2. Gráficos de los residuales con respecto a la variable de respuesta rendimiento. a) histograma de frecuencias, b) probabilidad normal residual c) ajustes de residuales.

Más aún, para corroborar si este modelo lineal se ajusta a esta variable de respuesta (ng/mL), el valor de coeficiente de correlación y el ajustado arrojaron una estimación de 81.12% y 74.04%, lo que quiere decir que el modelo estadístico ANOVA se ajusta perfectamente a los datos obtenidos. En cuanto a la comparación entre cada uno de los tratamientos +Dcel y -Dcel, en la tabla 4.3 se muestran los resultados del agrupamiento por grupos que arroja la prueba Tukey. De ésta es posible percibir que existe una diferencia significativa con un 95% de confianza al comparar la cantidad de DNA presente en el tejido normal y los tratamientos descelularizados, perteneciendo a dos grupos distintos, aislados uno del otro en función de las medias maestras. Además, con estos resultados se da por manifiesto que la serie de repeticiones, utilizando la metodología para la generación de andamios tegumentarios a partir de la descelularización del tejido del organismo *C. xamachana* (+Dcel) pertenecen al mismo grupo de tratamientos, con un 95% de confianza grupal y un nivel de confianza individual del

98.74%, siendo posible corroborar la eficacia del proceso de descelularización al demostrar que: al menos en una serie de repetición de 3 lotes distintos de procesamiento de los andamios, la cantidad de DNA remanente presente en las muestras será el mismo. Esta aseveración puede ser corroborada al observar el diagrama de caja y bigotes que se muestra en la figura 3.1 del capítulo de Resultados y discusiones, siendo muy evidente la separación de ambos grupos.

Tabla 4.3 Tabla de resultados del análisis de Tukey.

Tratamientos	No. de repeticiones	Media por tratamiento (ng/mL)	Porcentaje de descelularización (%)	Grupo
+Dcel	3	204.6	70	$\alpha$
-Dcel	3	675.8	0	$\beta$

## **ANEXO C. Comprobación estadística de la determinación de proliferación celular**

Para corroborar los resultados obtenidos de manera gráfica, en la Tabla 4.4 se presentan los resultados del análisis de varianza del diseño experimental factorial general realizado para la variable de respuesta proliferación celular, medida en absorbancia. Los datos fueron analizados con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , tomándose en cuenta los valores obtenidos para la probabilidad (P), con la finalidad de determinar si los resultados son estadísticamente significativos para cada uno de los factores tiempo de ensayo y tratamientos.

Tabla 4.4. Análisis de Varianza de absorbancia del análisis de proliferación celular Vs los efectos principales de las fuentes de variación: Tratamiento, tiempo (días) y su interacción.

Fuente de variación	Grados de libertad (DF)	Suma de cuadrados (SS)	Suma de cuadrados ajustada (AdjSS)	Cuadrado Medio ajustada (AdjMS)	Estadístico de Fisher (F)	Valor de Probabilidad (P)
Tratamiento	5	2.73494	2.73494	0.54699	12.40	0.000
Tiempo (días)	2	8.83852	8.83852	4.41926	100.18	0.000
Interacción	10	4.14319	4.14319	0.41432	9.39	0.000
Error	36	1.58813	1.58813	0.0441		
Total	53	17.30477				

De acuerdo con la tabla anterior, los *tratamientos*, el *tiempo de ensayo (días)* y las interacciones entre estos son factores significativos para el ajuste del modelo, debido a que su valor P es menor al valor de significancia que se tomó como referencia ( $\alpha=0.05$ ). Es decir, existe evidencia estadística significativa, con un 95% de confianza de que estos factores afectan la variable de respuesta de la proliferación celular (medida en absorbancia).

Al analizar las gráficas de residuales para la proliferación celular, mostradas en la Figura 4.6,

se observa que éstos están normalmente distribuidos. En la gráfica de residuales vs ajustes (sección b) se observa que los residuos presentan una varianza constante y de la gráfica de residuos vs orden (sección c) de observación se muestra que los residuales están de manera aleatorizada, es decir, no presentan una tendencia que los relacionen entre sí.

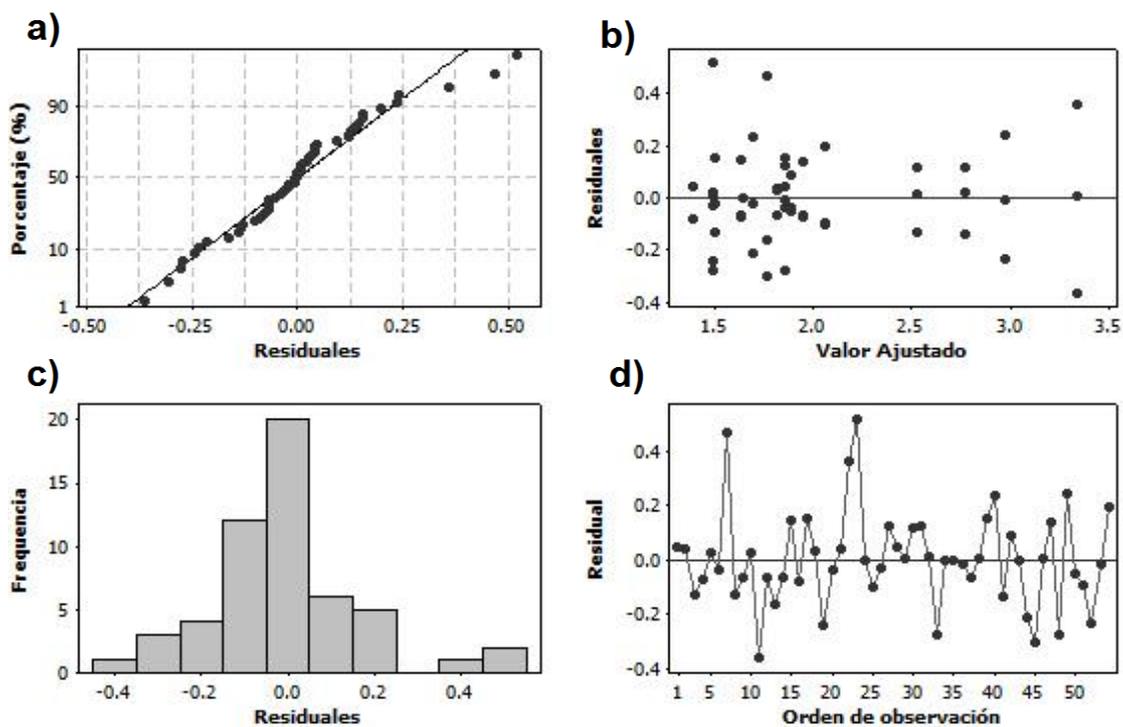


Figura 0.3. Gráficos de los residuales con respecto a la variable de respuesta absorbancia. a) probabilidad normal residual, b) ajustes de residuales, c) histograma de frecuencias y d) ajuste de orden de observación.

Con respecto a la gráfica que representa los efectos principales que afectan a la variable de respuesta *Proliferación celular (absorbancia)* (Fig. 4.7), se revela el incremento de tiempo de ensayo produce un aumento significativo en la absorbancia medida, y por ende en la población celular, siendo el día siete la media máxima de proliferación, este es un resultado esperado según la literatura [89,95,96]. En cuanto al efecto de *tratamientos*, se pueden encontrar resultados variados, en donde como es de esperarse, el control positivo (C+) presenta una absorbancia media y proliferación alta, por el contrario, el control negativo (C-) muestra una

tendencia de absorbancia media a la baja, cuyos resultados son normales. Algo interesante sucede con el andamio tegumentario (+Dcel), teniendo una absorbancia media superior al control positivo, presentando un máximo de población celular a los siete días de ensayo. En cuanto a la MEC de *C. xamachana* sin tratamiento, presenta un decaimiento de población celular a los siete días de ensayo, esto puede ser debido a que los organismos simbios, las zooxantelas (Z) y las células mioepiteliales (M) presentan apoptosis celular al no encontrarse en las condiciones fisicoquímicas necesarias para sobrevivir [58], provocando la segregación de materia orgánica en descomposición que puede afectar la proliferación de los fibroblastos. Con esto podemos aseverar que ambos tratamientos presentan un efecto significativo en cuanto a la proliferación celular.

Cuando el efecto de un factor (en este caso *Tratamientos*) depende del nivel del otro factor (*tiempo* del ensayo) se puede utilizar una gráfica de interacción para visualizar posibles interacciones entre ambos. En donde, mientras mayor sea la diferencia en la pendiente entre las líneas, mayor será el grado de interacción. Sin embargo, la gráfica de interacción no es concluyente en cuanto a si la interacción es estadísticamente significativa. De esta manera las gráficas de interacción para la *proliferación celular (absorbancia)* (Fig. 4.8), se muestra un evidente despunte de población celular desde el día 3 hasta el día 7 en +Dcel, corroborando los resultados anteriores. En cuanto al control positivo (C+) y control negativo (C-), se mantienen en los estándares mostrados en los resultados de la gráfica de efectos principales, así como de +Dcel. Finalmente, según los resultados del análisis estadístico (Tabla 4.4), y de los resultados de los gráficos de efectos principales e interacciones, es posible concluir con un 95% de confianza de que los andamios generados a partir del proceso de descelularización de la MEC de *C. xamachana* presentan una excelente viabilidad celular, de tal modo que pueden ser utilizados en la ingeniería de tejidos de la membrana cutánea del sistema tegumentario.

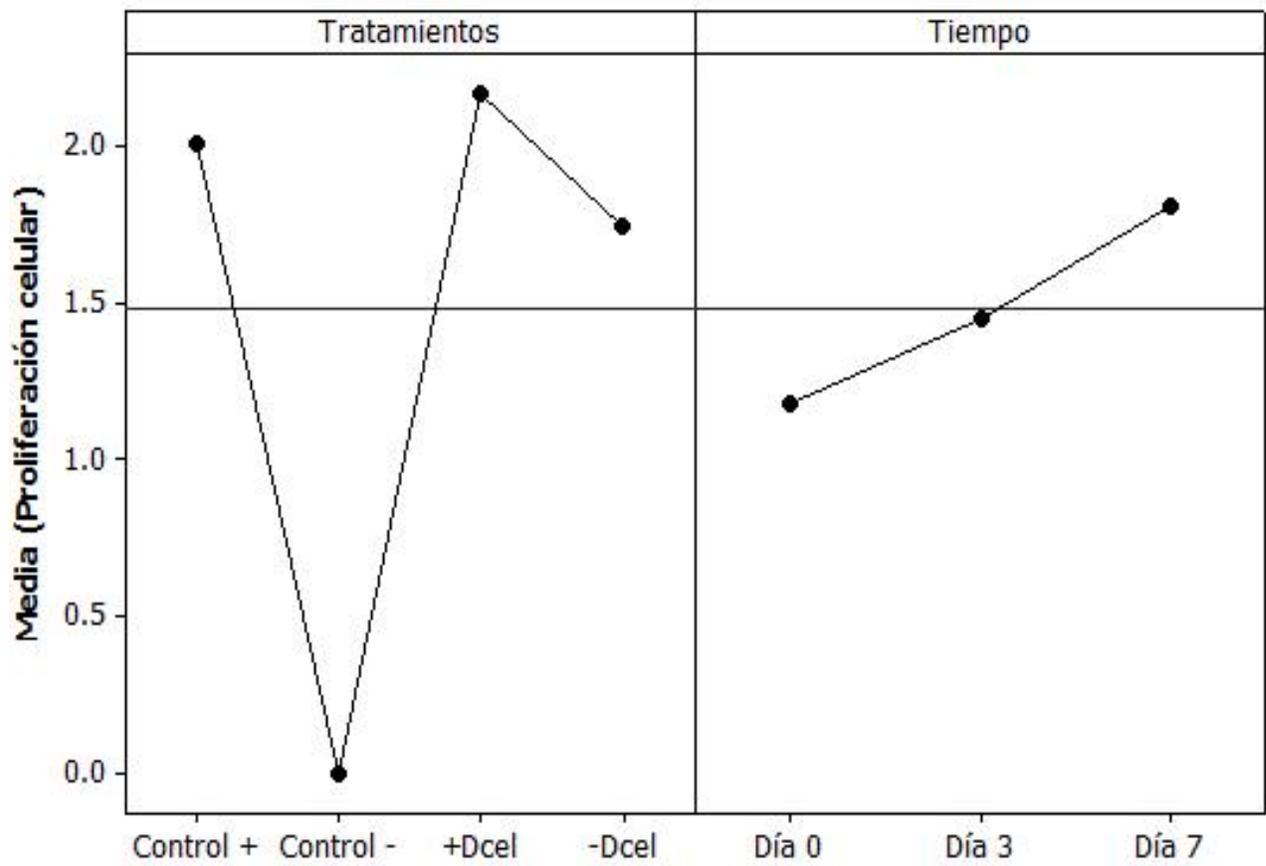


Figura 0.4. Efectos sobre la variable de absorbancia. Muestra el gráfico que representa los efectos principales para la variable de respuesta proliferación celular (absorbancia).

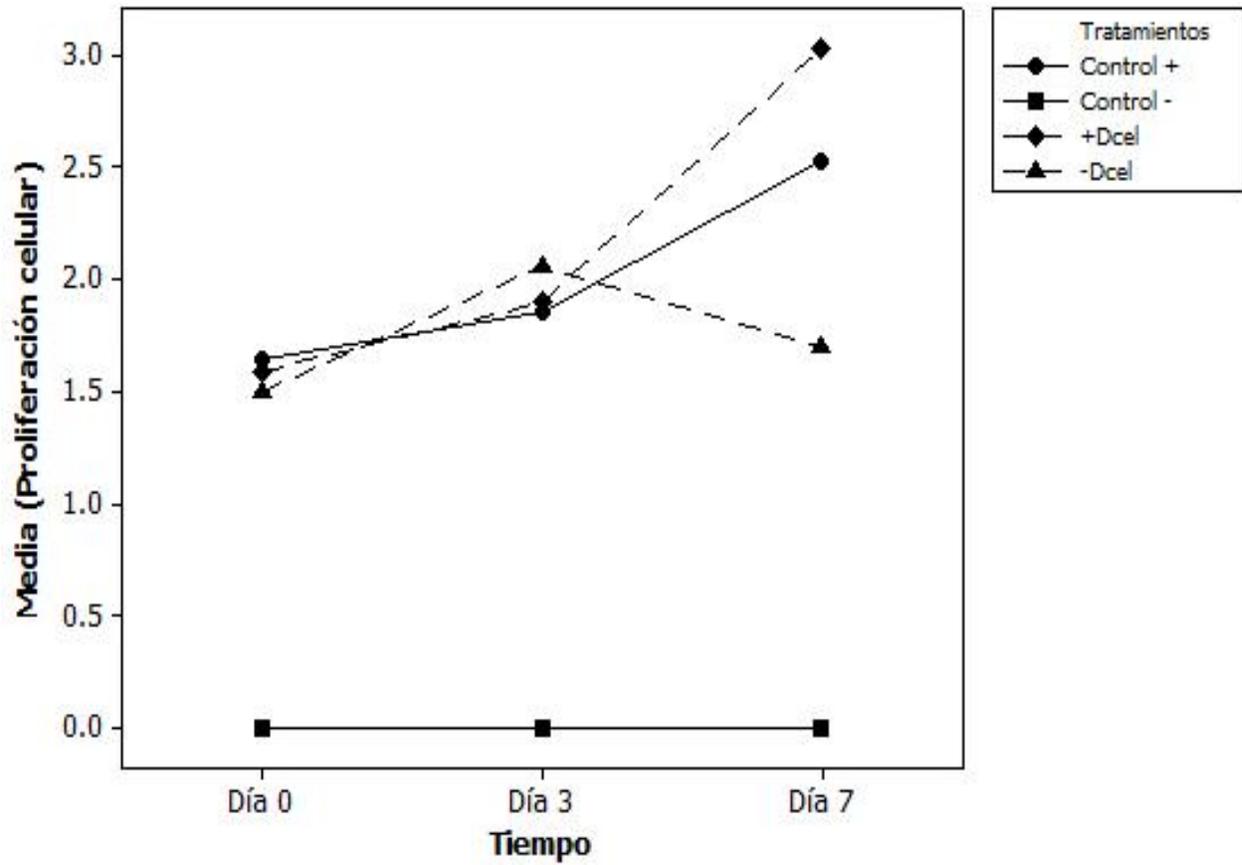


Figura 0.5. Proliferación celular. Muestra el gráfico que representa los efectos de interacción entre los dos factores para a la variable de respuesta proliferación celular (absorbancia).