



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

ELABORACIÓN DE ANDAMIO DE COLÁGENA DE
ORIGEN MARINO ENTRECruzADO CON
GLUTARALDEHÍDO CON POTENCIAL APLICACIÓN EN
LA INGENIRÍA DE TEJIDOS CUTÁNEOS.

Tesis que presenta

ANDREA DE JESÚS SOSA POOL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

Julio 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____ *Andrea P*

Nombre: Andrea de Jesús Sosa Pool



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Andrea de Jesús Sosa Pool** titulado “**Elaboración de andamio de colágena de origen marino entrecruzado con glutaraldehído con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, línea de investigación en Biomateriales, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos, de este Centro y bajo la co-dirección de la Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga adscrita al ICAT-UNAM.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 1 de Julio de 2021.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación, 812412.

A los laboratorios de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM)-UNAM. Al Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital (MADiT) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnologías (ICAT) - UNAM.

A mi directora de tesis la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza, apoyo y enseñanza durante la elaboración de la tesis.

A mi co-directora de tesis la Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga por todo el apoyo, tiempo y facilidades brindadas para la realización de una estancia de investigación como parte del trabajo del proyecto de tesis en el ICAT-UNAM.

A todos de miembros del comité tutorial, por su aportación con sus observaciones para mejora del trabajo de tesis.

Agradezco a la Dra. Lorena Violeta León Deníz por el apoyo para la colecta de las medusas empleadas en el presente trabajo de investigación.

A la Q.I. Rossana Vargas Faride por las facilidades para realizar el proceso de liofilización en el laboratorio de Química Macromolecular. A la Dra. Ligia Guadalupe Brito Argáez, por las facilidades para realizar el proceso de centrifugación en la unidad de Bioquímica y Biotecnología. Al Dr. Hugo carrillo Escalante por su apoyo para realizar la caracterización de FTIR-ATR de los andamios y las facilidades para realizar el proceso de entrecruzamiento del mismo. Al Dr. José Ocotlán Flores Flores por su ayuda y guía para realizar la prueba de caracterización FTIR de la CLG en el Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del ICAT-UNAM, A la Dra. María Cristina Piña Barba por las facilidades para trabajar en el laboratorio de biomateriales del IIM-UNAM. Al Dr. Leopoldo Ruiz Huerta por la oportunidad de trabajar en el laboratorio MADiT-UNAM.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis compañeros del laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.: Cielo, Ileana, José Luis, Noemi, Oscar, Pedro, Tania y Vanessa por su apoyo y recomendaciones para enriquecer este trabajo.

A mis padres, hermanas y abuelo por siempre apoyarme en cada momento de mi vida. A Jesús, que con paciencia y amor se convirtió en una de las motivaciones para concluir este trabajo de tesis.

DEDICATORIA

A mi Abuela Socorro Madera †, por siempre creer en mí y por enseñarme que con perseverancia y dedicación cualquier meta es posible de alcanzar.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
GLOSARIO	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Anatomía de la piel humana	3
1.1.1. Epidermis	3
1.1.2. Dermis.....	4
1.1.3. Hipodermis.....	4
1.2. Heridas dérmicas.....	4
1.2.1. Proceso de cicatrización cutánea.....	5
1.3. Sustitutos cutáneos	8
1.4. Ingeniería de tejidos	9
1.4.1. Ingeniería de tejidos cutáneos	10
1.4.2. Andamios en la ingeniería de tejidos cutáneos.....	11
1.5. Colágena	13
1.5.1. Colágena de origen marino	14
1.6. Andamios basados en colágena de origen marino.....	16
1.6.1. Métodos para obtener andamios de colágena.....	16
1.6.2. Métodos de entrecruzamiento de CLG	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	20
2.1. Obtención y caracterización de la CLG	20
2.1.1. Extracción de la CLG de medusa (Cassiopea xamachana).....	20
2.1.2. Caracterización de la CLG tipo I de origen marino	22

2.2.	Elaboración de los andamios de CLG entrecruzado	23
2.2.1.	Manufactura mediante liofilización.....	23
2.2.2.	Entrecruzamiento del andamio con GTA	23
2.3.	Caracterización química del andamio de CLG	24
2.4.	Caracterización biológica.....	25
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
3.1.	Obtención y caracterización de la CLG.....	27
3.1.1.	Extracción de la CLG tipo I de origen marino.....	27
3.1.2.	Caracterización de la CLG de origen marino	27
3.2.	Elaboración del andamio de CLG	30
3.2.1.	Manufactura y entrecruzamiento (Liofilización-GTA)	30
3.3.	Caracterización fisicoquímica de los andamios de CLG	31
3.4.	Caracterización biológica.....	34
CONCLUSIONES.....		38
RECOMENDACIONES		39
REFERENCIAS.....		40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales actividades de los factores de crecimiento involucrados en la cicatrización cutánea.	7
Tabla 1.2. Cuadro comparativo de las principales fuentes de CLG empleadas y/o investigadas para la producción de andamios a base de CLG.	15
Tabla 3.1. Absorbancia de las muestras de estudio.	28
Tabla 3.2. Principales enlaces del espectro IR para la CLG tipo I.....	31
Tabla 3.3. Bandas de absorción de las muestras de CLG después de entrecruzar con GTA. ...	32
Tabla 3.4. Tabla de absorbancia de las muestras de los andamios de CLG no entrecruzados y entrecruzados con GTA a 2 y 4 h.	33
Tabla 3.5. Porcentaje de viabilidad de los cultivos de fibroblastos en contacto con los andamios de CLG, CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Anatomía de la piel humana.....	3
Figura 1.2. Etapas del proceso de cicatrización cutánea.....	6
Figura 1.3. Triada de ingeniería de tejidos. Se muestran los componentes de la triada que interactúan entre sí para favorecer la restauración de los tejidos.....	9
Figura 1.4. Estructura de la triple hélice de la colágena tipo I humana.	14
Figura 1. 5. Esquema simplificado de la reacción de entrecruzamiento de la CLG con GTA. ...	18
Figura 2.1. Esquema general de las actividades del proyecto	20
Figura 2.2. Colecta de medusas.....	21
Figura 2.3. Diagrama esquemático del proceso de extracción de la colágena de origen marino	22
Figura 2.4. Montaje del sistema para entrecruzar los andamios de CLG con GTA.....	24
Figura 3.1. CLG tipo I de origen marino obtenida del proceso de extracción realizada a partir de la medusa <i>Cassiopea andromeda</i>	27
Figura 3.2. Curva de calibración empleada para la cuantificación de la CLG obtenida.....	27
Figura 3.3. Apariencia de las muestras sometidas al ensayo de Bradford.....	28
Figura 3.4. Concentración de proteína en la solución de CLG (botón y sobrenadante).	29
Figura 3.5. <i>Electroforetograma de CLG de origen marino</i>	29
Figura 3.6. Andamio de CLG tipo I de origen marino.....	30
Figura 3.7. Espectro IR de la CLG de origen marino.....	31
Figura 3.8. Espectros IR de la CLG después del entrecruzamiento con GTA a 2 y 4 h.	32
Figura 3.9. Resultados del grado de entrecruzamiento de los andamios antes y después de entrecruzar con GTA a 2 y 4 horas.....	34
Figura 3.10. Viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados con los andamios de CLG, CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h a 3, 24 y 48 horas	36
Figura 3.11. Fibroblastos dérmicos humanos teñidos con cristal violeta al 0.5 %.	37

GLOSARIO

ASC	Colágena soluble en ácido
ATR	Reflexión total atenuada
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CENIAQ	Centro nacional de investigación y atención de quemados
CH ₃ COOH	Ácido acético
CLG	Colágena
CO ₂	Dióxido de carbono
DGE	Dirección general de epidemiología
EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FDM	Modelado por deposición de material fundido
FTIR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
GTA	Glutaraldehído
KDa	Kilo Dalton
LOM	Fabricación por corte y laminado
M	Relación molar
MA	Manufactura aditiva
MEC	Matrix extracelular
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	Código numérico
NHS	N-hidroxi succinimida
PBS	Buffer Salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poliácido láctico-Glicólico
PLLA	Poli L-ácido láctico
PR	Prototipado rápido
PSC	Colágena soluble en pepsina
RPMI	Medio del Instituto Conmemorativo Roswell ParK (por sus siglas en inglés)
RPM	Revoluciones por minuto

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SFB	Suero fetal bovino
SGC	Fotopolimerización por luz UV
SLS	Sinterización selectiva por láser
TNSA	Ácido trinitro bencensulfónico
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

En este proyecto se extrajo colágena (CLG) de la medusa *Cassiopea Xamachana*, la cual se empleó para manufacturar un andamio y posteriormente entrecruzarlo con la finalidad de mejorar sus propiedades químicas y físicas, para así evaluar su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos cutáneos.

El proceso de extracción de la CLG se realizó empleando la metodología descrita por Miller. La proteína obtenida se caracterizó mediante el ensayo de Bradford y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Los andamios de CLG extraída de medusa se fabricaron mediante liofilización y posteriormente fueron entrecruzados con glutaraldehído (GTA) durante 2 y 4 h. Los andamios resultantes, se caracterizaron fisicoquímicamente mediante reflectancia total atenuada, ensayo de ninhidrina y biológicamente mediante ensayos de viabilidad celular *in vitro* con fibroblastos dérmicos humanos a 3, 24 y 48 h.

Con base en los resultados de las pruebas de caracterización realizados a las muestras de CLG extraída a partir de medusa, se pudo corroborar que la CLG obtenida mediante el proceso de extracción propuesto, es CLG tipo I. Los andamios de CLG entrecruzados con GTA a 2 y 4 h mostraron un grado de entrecruzamiento del $39.42 \pm 4.16 \%$ y $59.05 \pm 1.05 \%$ respectivamente. Los resultados del ensayo de viabilidad celular de los andamios de CLG entrecruzados demostró que no son citotóxicos, puesto que el entrecruzamiento no afectó la viabilidad celular.

ABSTRACT

In this project, collagen (CLG) was extracted from the jellyfish *Cassiopea Xamachana*, which was used to manufacture a scaffold and later cross-linking in order to improve its chemical, physical and mechanics properties, as well as evaluate its potential application in skin tissue engineering.

The extraction process of the CLG was carried out using the methodology described by Miller. The protein obtained was characterized by the Bradford assay and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. CLG scaffolds of marine origin were manufactured by lyophilization and then were subsequently crosslinked with glutaraldehyde (GTA) for 2 and 4 h. The resulting scaffolds were physical, and chemistry characterized by attenuated total reflectance, ninhydrin assay and biologically by *in vitro* cell viability assays with human dermal fibroblasts at 3, 24 and 48 h.

Based on the results of the characterization tests performed on the marine CLG samples, it was confirmed that the CLG obtained by the proposed extraction process is type I CLG, it was confirmed that the CLG obtained through the proposed extraction process is CLG type I. The CLG scaffolds crosslinked with GTA at 2 and 4 h showed a degree of crosslinking of $39.42 \pm 4.16 \%$ and $59.05 \pm 1.05 \%$ respectively. The results of the cell viability assay of the cross-linked CLG scaffolds showed that they are not cytotoxic, since the cross-linking did not affect cell viability.

INTRODUCCIÓN

La piel es un tejido complejo y vulnerable a procesos que alteran su estructura, integridad y funcionalidad como quemaduras, heridas crónicas y diversas enfermedades congénitas, entre otras. Según la Dirección General de Epidemiología (DGE) de México del primero de Enero al 2 de Agosto de 2019 hubo mil 151 reportes de personas atendidas en diferentes instituciones de salud pública por quemaduras, con un aumento de 8% con respecto al mismo periodo del 2018 [1]. El tratamiento a este tipo de lesiones requiere de un conjunto de variados procedimientos quirúrgicos y frecuentemente el uso de sustitutos cutáneos que contribuyan a aminorar los defectos de cobertura cutánea, así como de acelerar y mejorar la calidad del cierre de la herida. Algunos de los sustitutos cutáneos que se han utilizado, están diseñados para el tratamiento de lesiones superficiales, fungiendo como cobertura temporal que permite el cierre de la herida, mermando la resequedad del tejido perilesional y la colonización por agentes patógenos [2]. Por otro lado, existen sustitutos cutáneos que tienen como objetivo la cobertura de lesiones profundas, representando una alternativa más definitiva y que frecuentemente involucra la activación de los procesos de reparación-regeneración de heridas [3].

En este sentido, los avances tecnológicos en la fabricación de andamios y en el cultivo de células han permitido la producción de sustitutos cutáneos para el tratamiento de diversas patologías que afectan a la piel [4,5]. Los andamios están compuestos de diversos materiales, entre los materiales poliméricos, se tienen los sintéticos, naturales, degradables o no degradables [6,7]. Se han utilizado varias técnicas para construir andamios, pero los cuatro enfoques principales de andamios incluyen: 1) el uso de láminas de células secretoras de la matriz extracelular (MEC) [8], 2) andamios porosos prefabricados de biomateriales sintéticos, naturales y biodegradables [9], 3) andamios de MEC descelularizados [10] y 4) células contenidas en hidrogeles [11].

Algunas de las estructuras que exhiben los andamios que se emplean para el tratamiento de lesiones de la piel son las esponjas, andamios electrohilados, películas y membranas [12,13]. Entre los andamios comerciales que se emplean para el tratamiento de lesiones de la piel se encuentra Integra® el cual es un sustituto cutáneo biosintético que proporciona un entramado que permite la regeneración dérmica y cobertura temporal de la herida y Matriderm® el cual es un sustituto dérmico compuesto de colágena bovina nativa con una capa de elastina. Su matriz permite una mejor regeneración de la dermis que las matrices de colágena pura, permitiendo la migración de fibroblastos del huésped y otras células que regeneran la dermis con propiedades equivalentes a las de la piel sana [2]. Otros productos comerciales tipo injerto celularizados son Dermagraft® y Apligraf® [14,15].

Uno de los biopolímeros más utilizado para generar sustitutos cutáneos es la colágena (CLG), debido a la biocompatibilidad y bioactividad que exhibe esta biomacromolécula [16]. Sin embargo, aunque diversos estudios demuestran que los andamios basados en CLG son por mucho los más prometedores en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa [17,18] su uso para fabricar estructuras 3D reproducibles y con porosidad controlada ha sido limitado debido a su compleja procesabilidad.

Bajo este panorama, la investigación actual apunta a la optimización de biomateriales, entre ellos, los basados en CLG para aplicaciones médicas mejorando su resistencia mecánica, biodegradabilidad o características de liberación mediante entrecruzamiento o combinación de biopolímeros [19], permitiendo la producción de sustitutos cutáneos robustos, que puedan representar una alternativa terapéutica para el tratamiento de quemaduras, heridas crónicas y diversas enfermedades congénitas de la piel. En este sentido, el glutaraldehído (GTA) favorece el entrecruzamiento intercatenario entre las moléculas de CLG [21,22], obteniendo andamios de CLG más resistentes con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos cutáneos.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Anatomía de la piel humana

La piel tiene varias funciones, proporciona una barrera para la pérdida de agua y los agentes patógenos, además de proteger contra diversas formas de trauma, incluida la radiación térmica, química y ultravioleta. La piel nos mantiene en contacto con nuestro entorno a través de una serie de terminaciones nerviosas, regula la temperatura corporal y mejora las funciones metabólicas, además de sintetizar la vitamina D [22].

El sistema tegumentario está formado por la piel y sus estructuras derivadas (Figura 1.1.). La piel se compone de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. El grosor de estas capas varía considerablemente, dependiendo de la ubicación geográfica en la anatomía del cuerpo. El párpado, por ejemplo, tiene la capa más delgada de la epidermis, que mide menos de 0.1 mm, mientras que las palmas y las plantas de los pies tienen la capa epidérmica más gruesa, que mide aproximadamente 1.5 mm. La dermis es más gruesa en la espalda, donde es 30-40 veces más gruesa que la epidermis [23].

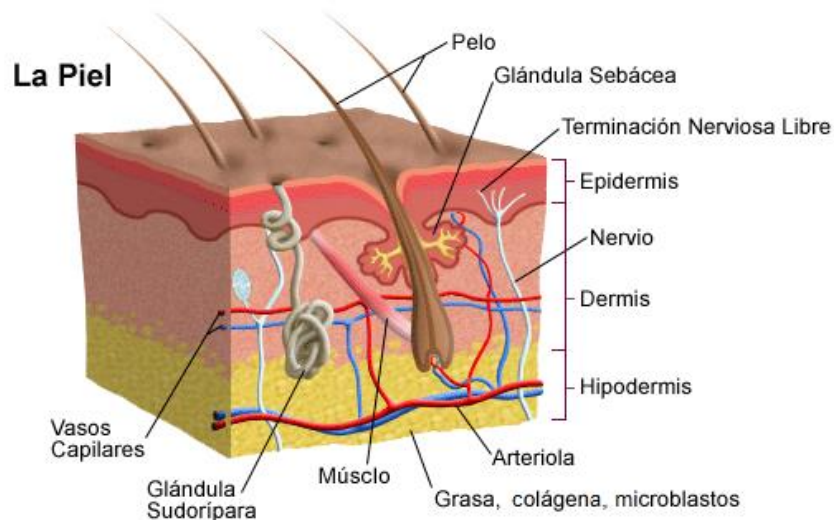


Figura 1.1. Anatomía de la piel humana [24].

1.1.1. Epidermis

La epidermis es una capa de epitelio estratificado y escamoso que se compone principalmente de dos tipos de células: queratinocitos y células dendríticas. Los queratinocitos difieren de las células dendríticas "claras" al poseer puentes intercelulares y grandes cantidades de citoplasma. La epidermis alberga otras poblaciones celulares, como melanocitos, células de Langerhans y

células de Merkel, sin embargo, los queratinocitos representan la mayor densidad celular. La epidermis se divide comúnmente en cuatro capas según la morfología y posición de los queratinocitos, incluyendo la capa celular basal, la capa de células escamosas, la capa celular granular, y la capa de células cornificadas (estrato córneo) [23].

1.1.2. Dermis

Es un sistema integrado de tejido conectivo fibroso, filamentoso y amorfo que acomoda la entrada inducida por estímulos de redes nerviosas y vasculares, apéndices derivados epidérmicamente, fibroblastos y macrófagos. Otras células transmitidas por la sangre, incluyendo linfocitos, células plasmáticas y otros leucocitos, ingresan a la dermis en respuesta a varios estímulos también. La dermis comprende la mayor parte de la piel y proporciona su flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción. Protege el cuerpo de lesiones mecánicas ayuda en la regulación térmica, e incluye receptores de estímulos sensoriales. La dermis interactúa con la epidermis en el mantenimiento de las propiedades de ambos tejidos. Las dos regiones colaboran durante el desarrollo en la morfogénesis de la unión dérmica-epidérmica y los apéndices epidérmicos e interactúan en la reparación y remodelación de la piel a medida que se curan las heridas [25].

1.1.3. Hipodermis

También conocida como tejido celular subcutáneo o panículo adiposo, está constituida por lipocitos o adipocitos que son células encargadas de fabricar y almacenar grasas. Las funciones de la hipodermis son: 1) mantener la temperatura orgánica actuando como aislante, 2) proteger frente a los traumatismos mecánicos, 3) servir de reserva y depósito de calorías, en forma de triglicéridos, y su liberación, en forma de ácidos grasos no esterificados, cuando sea necesario un aporte de energía [26].

1.2. Heridas dérmicas

La Wound, Ostomy and Continence Nurses Society (WOCN) define herida como “una interrupción en la estructura y funciones de la piel y de los tejidos subyacentes, relacionada con diversas etiologías, como los traumatismos, las cirugías, la presión sostenida y las enfermedades vasculares” [27].

La piel aísla y protege al organismo del medio externo. Al ser el órgano más expuesto del cuerpo humano es vulnerable a sufrir interrupciones en su estructura y funcionalidad, lo que se denomina herida dérmica, la cual está relacionada con diversas etiologías como las quemaduras, enfermedades congénitas y traumatismos. Al presentarse una herida dérmica se desencadena

el proceso de cicatrización en el cual, intervienen muchos tipos celulares cuyas interrelaciones están reguladas por las citocinas, la matriz extracelular y las metaloproteinasas. Los progresos logrados en el conocimiento de este proceso permiten ahora comprender mejor la participación de los distintos tipos celulares durante las fases de proliferación, migración celular, síntesis de la matriz y contracción, así como la función esencial de las diferentes citocinas y proteínas de la matriz.

Cuando se produce una herida, la cicatrización cutánea permite la reconstrucción del epitelio estratificado (la epidermis), la unión dermoepidérmica, la dermis y su vascularización. La aparición de una alteración funcional durante este proceso conduce a un retraso de la cicatrización que puede dar lugar a una herida crónica o a la formación de una cicatriz patológica de tipo queloide.

1.2.1. Proceso de cicatrización cutánea

El estudio morfológico de los sitios donantes (cara interna de los muslos, glúteos, la región debajo de la clavícula, la región delante y detrás de la oreja, y el brazo) de injertos humanos y el uso de modelos animales en heridas agudas han permitido identificar cuatro etapas en la cicatrización cutánea, las cuales son las siguientes [28]:

- **Respuesta vascular y coagulación de la sangre:** Esta etapa inicia inmediatamente después de surge una lesión, la sangre penetra en la herida desde los vasos sanguíneos dañados. La sangre retira, por arrastre, los cuerpos extraños, lo que contribuye a prevenir la infección (primer mecanismo de limpieza). Después de algunos segundos los vasos se contraen para reducir el sangrado. Células sanguíneas especiales denominadas plaquetas se adhieren unas a otras para formar un tapón. Este agregado detiene la hemorragia al taponar el vaso sanguíneo lesionado. Para seguir estabilizando el tapón plaquetario, el proceso de coagulación produce fibrina, necesaria para la coagulación sanguínea.
- **Inflamación:** Esta etapa del proceso de cicatrización se caracteriza por la formación de exudado y el enrojecimiento de la piel circundante. En primer lugar, los leucocitos (las llamadas células inflamatorias: primero neutrófilos y luego macrófagos) invaden el tejido lesionado y comienzan a limpiar la zona de desechos, tanto tejidos muertos y contaminantes como bacterias. En segundo lugar, las plaquetas y las células inflamatorias liberan mediadores, como los factores de crecimiento, para desencadenar el ulterior proceso de curación.

- **Proliferación:** En esta etapa los macrófagos segregan mediadores para iniciar la reparación de la dermis. Los fibroblastos, las células principales de la dermis, migran hacia el tejido lesionado y producen colágeno, el componente más importante de la dermis. Se forma tejido conectivo fresco que rellena la brecha y recibe el nombre de tejido de granulación debido a su aspecto granular. Además, se forman nuevos vasos sanguíneos, proceso denominado angiogénesis. Con la finalidad de restaurar la función barrera de la piel, la epidermis tiene que ser reparada por proliferación de los queratinocitos, las células principales de la epidermis, que migran desde los bordes de la herida y los folículos pilosos para cerrar la herida.
- **Remodelación de la MEC y maduración de la cicatriz:** Tras el cierre de la herida, el tejido recién formado no es idéntico al tejido original. En los casos en que sólo se afecta la epidermis no se forma cicatriz (regeneración). Si se lesiona la dermis se formará una cicatriz (reparación normal). Los trastornos de la curación de la herida pueden propiciar una formación cicatricial insuficiente o excesiva.

El proceso de una herida aguda pasará por las etapas del proceso de cicatrización de manera ininterrumpida, secuencial y en un periodo de tiempo predecible, lo cual conducirá al cierre espontáneo de la lesión. En la Figura 1.2. se observan de forma gráfica las etapas del proceso de cicatrización.

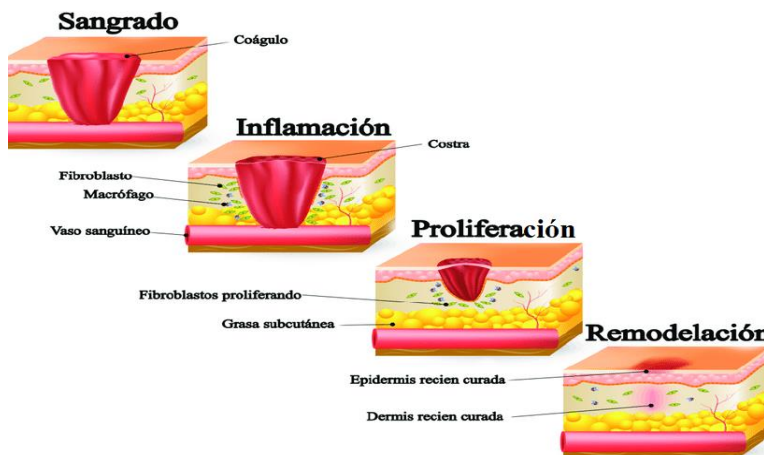


Figura 1.2. Etapas del proceso de cicatrización cutánea. Shield HealthCare (2018).

En la Tabla 1.1. se enlistan las principales actividades de los factores de crecimiento involucrados en el proceso cicatrización cutánea. No obstante, de permanecer estancado el proceso de

cicatrización en alguna de sus etapas durante un periodo de tiempo que exceda los 21 días, la herida se considerará crónica. Dicho estancamiento puede tener lugar debido a la interacción de diversos factores, como el estado nutricional del paciente, el nivel de oxigenación de los tejidos, una elevada carga bacteriana (más de 10⁵ microorganismos por gramo de tejido), el exceso de humedad local, el estrés físico y emocional y la presencia de patologías concomitantes [30,31].

Tabla 1.1. Principales actividades de los factores de crecimiento involucrados en la cicatrización cutánea.

	Células productoras	Actividad
TGF β	Plaquetas, macrófagos, linfocitos, fibroblastos	Proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales, síntesis de matriz extracelular
PDGF	Plaquetas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos	Migración y proliferación de los fibroblastos, síntesis de colágeno. Quimiotáctico para neutrófilos y monocitos
bFGF (FGF2)	Queratinocitos, fibroblastos, plaquetas	Angiogénesis Epitelización
VEGF	Queratinocitos, macrófagos, plaquetas	Angiogénesis
KGF	Fibroblastos	Migración y proliferación de los queratinocitos
EGF	Plaquetas, queratinocitos, macrófagos	Migración y proliferación de los queratinocitos. Proliferación de las células endoteliales y de los fibroblastos

TGF β : factor de crecimiento transformante; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; bFGF: factor de crecimiento de los fibroblastos básico; EGF: factor de crecimiento epidérmico; KGF: factor de crecimiento de los queratinocitos; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular [31].

En México, las estadísticas proporcionadas por el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) muestran que las lesiones por quemaduras ocupan el decimotercer lugar de las causas de defunción con 2 mil 775 muertes al año.

Actualmente se estima que 1 a 2% de la población general padece úlceras crónicas en los miembros inferiores, definidos como pérdida de continuidad en la piel por más de seis semanas sin cicatrización después de tres meses; siendo predominantemente de etiología venosa (70%), seguidas por las arteriales (20%) y neuropáticas [32].

1.3. Sustitutos cutáneos

Los sustitutos cutáneos, creados para tratar tanto heridas agudas como crónicas [34, 35], deberán otorgar una rápida cobertura del defecto para disminuir el dolor de la zona y recuperar la función original del tejido de la forma más segura posible [35]. Además de su disponibilidad inmediata, deben ser estériles, fáciles de aplicar, eficientes, cómodos, elásticos y resistentes [36]. Es fundamental que la pigmentación final del tejido reparado sea lo más semejante a la piel sana, sin dejar secuelas de hiper o hipopigmentación. Además, deberán ser bien tolerados a modo de evitar una reacción inmunológica, inflamación o rechazo agudo del injerto [37]. Lo ideal es que sean biodegradables en su totalidad sin depositar residuos tóxicos en el área afectada y que dejen la menor cantidad de tejido cicatricial posible. Finalmente, un tema no menor es que el costo-beneficio sea favorable para el paciente [38].

Para la creación de la mayoría de estos sustitutos cutáneos se debe considerar tres aspectos fundamentales: Fuente celular, biopolímeros y moléculas solubles [39].

- Fuente celular: Este componente es importante para la formación de la MEC que se irá depositando a medida que progresa la reparación de la herida cutánea. Mediante el cultivo de células *in vitro*, es posible obtener una cantidad suficiente de ellas para luego incorporarlas *in vivo*.
- Biopolímeros: Polímeros empleados como MEC artificial, andamios, plataformas o soportes. Todos ellos son elementos necesarios para otorgar apoyo y cierto grado de bioactividad, aportando un medio favorable para el desarrollo, proliferación y diferenciación celular.
- Moléculas solubles: Corresponden a factores de crecimiento y citoquinas que permitirán modular el comportamiento de las células con su entorno a fin de acelerar la reparación tisular.

1.4. Ingeniería de tejidos

En la década de los 80 surge un nuevo campo de la medicina que aplica los principios del cultivo celular a polímeros sintéticos biodegradables de soporte, con el fin de crear sustitutos biológicos autólogos que puedan mejorar, mantener o restaurar la función de órganos o tejidos dañados.

El término “Ingeniería tisular” se acuñó en 1988 [40] definiéndose como un nuevo campo de investigación, de rápido desarrollo, cuyo objetivo es la fabricación de tejidos [41]. Esta área de investigación, evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales [42].

El éxito de la ingeniería de tejidos se basa en comprender la interacción entre las células progenitoras o adultas, las señales reguladoras y los biomateriales/andamios utilizados para administrarlas, también conocida como la tríada de la ingeniería de tejidos (Figura 1.3.) [43].

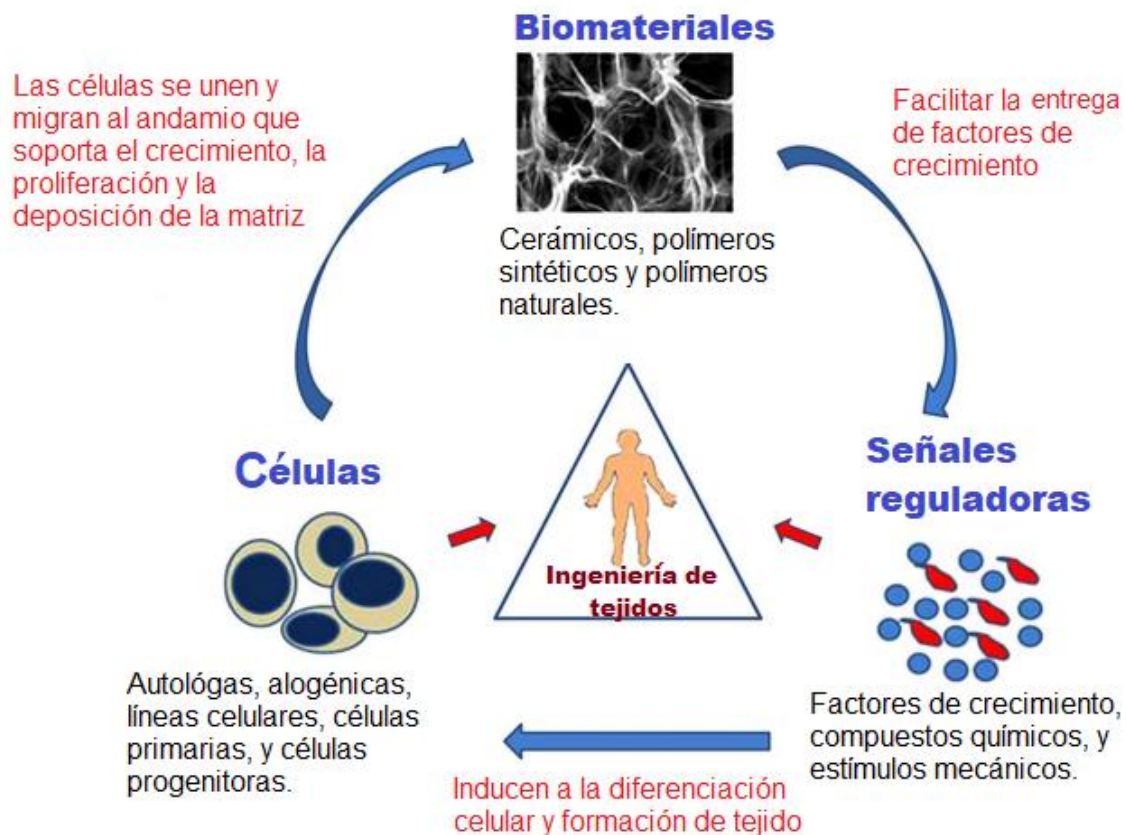


Figura 1.3. Tríada de ingeniería de tejidos. Se muestran los componentes de la tríada que interactúan entre sí para favorecer la restauración de los tejidos [43].

1.4.1. Ingeniería de tejidos cutáneos

A pesar de su importancia clínica, los injertos cutáneos tienen muchas limitaciones, incluida la disponibilidad del donante. A lo largo de los siglos, una demanda cada vez mayor de sustitutos de la piel para el reemplazo de defectos cutáneos resultantes de quemaduras, traumatismos, infecciones, rechazo de injertos, cicatrices, defectos genéticos y otras enfermedades se convirtió en un importante desafío de atención médica. Derivado de esto, se han empleado diferentes estrategias para los tratamientos de heridas, que se analizan a continuación:

- **Injerto de piel con autoinjerto**

Debido a la falta de queratinocitos para reformar el epitelio, las heridas dérmicas más profundas cicatrizan lenta e inadecuadamente, para ello, se han empleado "autoinjertos". Este tipo de injerto proviene de tejido del mismo paciente, por lo que no existe el rechazo. En esta aplicación, la curación de la herida depende del grosor de la dermis subyacente en el injerto. La dermis gruesa conduce a una curación más rápida y a un mejor aspecto cosmético y estético de la herida en cuestión. El tejido de los sitios donantes se puede volver a recolectar varias veces después de la curación, ya que los sitios se adelgazan debido a la falta de regeneración de la dermis después de cada cosecha. Lo cual puede representar un reto, dado que el tejido sano, no siempre está disponible en los pacientes [44].

- **Aloinjertos de piel**

El donador de este material y el receptor son individuos diferentes, pero de la misma especie. Un método para superar la limitación del tejido donante para el injerto de piel con un autoinjerto es usar aloinjertos. El uso clínico del aloinjerto de piel humana se describió por primera vez en el manuscrito de Branca de Sicilia en 1503 y se han utilizado desde la Segunda Guerra Mundial. Este tipo de injertos, no solo proporcionan una barrera ante agentes patógenos, también activan la angiogénesis, proporcionando factores de crecimiento y citocinas esenciales para la curación de heridas [45], y sirven como una cobertura temporal debido al rechazo inmunogénico por parte del sistema inmunitario del huésped y la transmisión viral (p. ej., hepatitis B y C o VIH). La aplicación de aloinjerto de piel humana protege el tejido subyacente al tiempo que permite la formación de tejido de granulación y la contracción de la herida [46].

- **Xenoinjertos**

Un injerto quirúrgico de una especie a otra especie diferente se conoce como xenoinjerto. Los sustitutos de la piel recolectados de los animales que se usan en heridas humanas constituyen

un xenoinjerto y pueden usarse como injertos temporales para heridas humanas. El xenoinjerto fusiona CLG exógena en la herida, ayudando así a la regeneración dérmica. Estos xenoinjertos se absorben a medida que la herida cicatriza, lo que los hace perfectos para heridas quirúrgicas [47]. Los xenoinjertos más utilizados son de piel porcina [45], pese a su uso, han sido relacionados a rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades hacia el humano.

1.4.2. Andamios en la ingeniería de tejidos cutáneos

Un andamio es una estructura 3D fabricada a partir de una gran variedad de biomateriales y es un elemento de soporte vital para la unión celular, el crecimiento y el mantenimiento en el cultivo celular. Las propiedades mecánicas y biológicas de los andamios dependen de la composición química, la estructura y la disposición de sus macromoléculas constituyentes, e influyen en la morfología, el comportamiento y la función celular [48]. Los andamios se pueden elaborar utilizando algunas de las siguientes técnicas de fabricación como:

- Tejido de fibras: El tejido de fibras es una de las técnicas, junto con la de lixiviación de partículas y evaporación de solventes, que se usó inicialmente para la obtención de membranas y andamios tridimensionales, teniendo mucho alcance dada la sencillez de las mismas y sus bajos costos [49] .
- Moldeo por evaporación de disolvente (Solvent casting) y lixiviación de partículas (particulate leaching): Surge como una alternativa a la desventaja presentada por la técnica de tejido de fibra ante la necesidad de controlar el tamaño de los poros y diámetro de las fibras. Es por ello que en este caso, la selección de porógeno a usar es crucial, dado que permitirá controlar el tamaño de poros y proporcionar una interconectividad de los mismos, para generar una relación superficie-área-volumen, así como el nivel de cristalinidad, sin perder la estabilidad física del andamio [43].
- Espumado con gas: La metodología es crear discos de polímeros comprimidos (por ejemplo, poliésteres) que son ligeramente calentados (al menos por encima de su temperatura de transición vítrea, en aquellos casos donde pueda ser necesario) y luego se inyecta gas de dióxido de carbono (CO₂) a alta presión. A medida que se reduce la presión, la nucleación y formación de poros se generan en la matriz del polímero en función de la cantidad de gas inyectado y en la reducción de la tasa de presión [50].
- Moldeo desde el fundido: Esta técnica requiere de mezclar las partículas de un polímero y de un porógeno que se combinan y son inyectadas en un molde en un proceso donde la temperatura debe estar por arriba de la temperatura de transición vítrea del polímero

(para polímeros amorfos) o de la temperatura de fusión (para los polímeros semicristalinos) [51].

- Extrusión: El proceso de extrusión hace referencia a cualquier operación de transformación en la que un material fundido es forzado a atravesar una boquilla para producir un artículo de sección transversal constante y, en principio, longitud indefinida (Michaeli *et al.*, 1993) [52]. Uno de los primeros trabajos reportados usando esta técnica aplicada a la ingeniería de tejidos, fue el trabajo de Widmer y colaboradores en 1998 [53], quienes utilizaron un copolímero de poliácido láctico-glicólico (PLGA) y poli L-ácido láctico (PLLA) para formar andamios tubulares enfocados en la regeneración del nervio periférico.
- Electrospinning o electro-hilado: Es una técnica que permite la creación de micro y nanofibras a través de la deposición en el colector de una solución polimérica eléctricamente cargada. Los andamios producidos por electrospinning son herramientas muy atractivas para la ingeniería de tejidos, dado que estos imitan físicamente (biomimetizan) a una matriz extracelular natural, y es por ello que estos andamios actúan como buenos soportes para la adhesión y desarrollo celular [54].
- Prototipado rápido de formas libres sólidas (PR): Entre las tecnologías de PR están [55]: modelado por deposición de material fundido (FDM, en inglés), sinterización selectiva por láser (SLS, en inglés), estereolitografía (SLA, en inglés), impresión por bioextrusión 3D (3D-P), fabricación por corte y laminado (LOM, en inglés), fotopolimerización por luz UV (SGC, en inglés). Estas técnicas permiten fabricar andamios con arquitectura altamente reproducible y variable en cuanto a composición, permiten controlar tamaño, forma, geometría e interconectividad de la matriz produciendo estructuras biomiméticas y complejas en comparación con las otras tecnologías.
- Liofilización: Esta técnica se basa en la utilización de soluciones homogéneas de un sistema polimérico en un disolvente de punto de congelación relativamente elevado. La solución se enfría hasta temperaturas inferiores a la solidificación del sistema y el disolvente se elimina por sublimación a vacío manteniendo el sistema congelado. La morfología del material poroso está controlada por la transición de fase que tiene lugar durante el proceso de enfriamiento [56].

Idealmente, los andamios no solo deberían proporcionar una estructura de soporte, sino también las señales químicas, mecánicas y biológicas necesarias para responder a los estímulos

ambientales. A diferencia de un cultivo celular monocapa 2D, un cultivo celular 3D es un modelo mucho más satisfactorio, dado que imita con mayor precisión las características *in vivo* de la morfología celular, el comportamiento, la organización y la fisiología, así como las complejas interacciones célula-célula y célula-matriz y la dinámica de transporte de nutrientes y células [57].

1.5. Colágena

La colágena, es una macromolécula biológica que constituye del 25% al 35% de proteínas en el cuerpo humano, es la proteína de mamífero más abundante y la proteína fibrosa estructural clave de la MEC de tejidos biológicos, tanto en organismos invertebrados como vertebrados [58]. La CLG está presente principalmente en los tejidos conectivos fibrosos como fascias, aponeurosis, ligamentos, tendones, periostea, pericondria, epimisia, perimisia, epineuria, perineuria, discos intervertebrales, cápsulas de órganos, adventicia de vasos sanguíneos y la mayoría de los órganos huecos, incluidos los tractos gastrointestinal y genitourinario, meninges, cápsulas articulares, la dermis de la piel, y también abunda en córneas, cartílagos, huesos y escleróticas, donde cumple una función estructural esencial, proporcionando resistencia a la tracción y flexibilidad a los tejidos y órganos. Hasta el momento se han identificado al menos 29 tipos de CLG y se han clasificado principalmente según su estructura. Más del 90% de la CLG en el cuerpo es de tipo I, mientras que los otros tipos comunes de CLG incluyen los tipos II, III y IV.

La molécula de CLG tipo I está constituida por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α , dos cadenas α idénticas designadas como $\alpha 1(I)$ y una cadena α diferente $\alpha 2(I)$ que se enrollan sobre sí mismas formando una superhélice con una longitud de 300 nm, un diámetro de 1.5 nm y un peso molecular de 300 kDa. La estructura a su vez, se divide en dos segmentos: la parte central (helicoidal) y la parte no helicoidal conocida como telopéptido correspondiente a los extremos terminales de la cadena: N-terminal (Grupo amino terminal) y C-terminal (Grupo carboxilo terminal). Las cadenas $\alpha 1(I)$ están conformadas por una secuencia de 1052 aminoácidos de los cuales 1011 corresponden a la parte central, 16 al extremo N-terminal y 25 al extremo C-terminal [59], mientras que la cadena $\alpha 2(I)$ está formada por 1029 residuos aminoácidos (Figura 1.4.) [60]. Su estabilidad se debe principalmente a los entrecruzamientos intermoleculares.

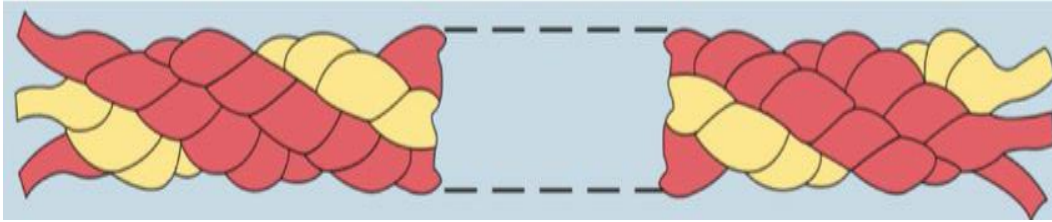


Figura 1.4. Estructura de la triple hélice de la colágena tipo I humana [58].

La conveniencia de la CLG y su amplia aplicabilidad en diversos campos como biomaterial depende principalmente de propiedades como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la fácil disponibilidad y la alta versatilidad [55,56]. Además, la CLG puede formar una arquitectura tridimensional (3D) intrincada altamente organizada de redes de fibra tejida mediante autoagregación y reticulación. Estas redes resisten el estrés de tracción en múltiples direcciones y apoyan el crecimiento celular [62]. Por lo tanto, la importancia de la CLG se reconoce cada vez más como una fuente clave de biomateriales en diversas áreas que van desde soluciones de CLG inyectables hasta andamios biomiméticos para el cultivo de células 3D, ingeniería de tejidos, administración de medicamentos y medicina regenerativa [58,59].

1.5.1. Colágena de origen marino

Los polímeros naturales de los recursos marinos como: Alginato, Carragenina y CLG han atraído cada vez más atención en los últimos años, ya que son biológicamente activos y abundantes en comparación con los polímeros de otras fuentes [65].

Los organismos marinos son una rica fuente de compuestos estructuralmente nuevos y biológicamente activos. Hasta la fecha, muchos componentes biológicos han sido aislados de varios recursos marinos (Tabla 1.2.). La CLG de origen marino ofrece ventajas sobre la CLG de los mamíferos, como ser amigable con el medio ambiente, tener una mejor absorción debido al bajo peso molecular, tener una respuesta inflamatoria mínima o nula, puede extraerse fácilmente, es soluble en agua y es segura porque está libre de riesgos de enfermedades animales, está disponible en cantidades abundantes y presenta un 99% de identidad con la CLG humana [18], [64]. Hasta la fecha, se ha encontrado CLG en varias especies marinas, incluidos corales, esponjas, erizos de mar, salmones, medusas, moluscos y algas rojas coralinas [16].

Tabla 1.2. Cuadro comparativo de las principales fuentes de CLG empleadas y/o investigadas para la producción de andamios a base de CLG.

Fuente	Inmunogenicidad / antigenicidad	Riesgo de Zoonosis	Restricción religiosa	Disponibilidad	Precio**	Referencias
Recombinante	Bajo	No	No	Limitada	Muy alto	Davinson-Kotler et al. (2019); He et al. (2021)
Bovina	Bajo	Si	Si	Muy alta	Bajo	Zhang et al. (2017); Ávila Rodríguez (2018)
Porcina	Bajo	Si	Si	Muy alta	Bajo	Silvipriya et al. (2015); Ávila Rodríguez (2018)
Ovina	Bajo	Si	No	Limitado*	Moderado	Busra et al. (2019)
Equina	Bajo	Si	Si	Alta	Moderado	Silvertein et al. (2014); Gallo et al. (2020)
Aves de corral	Variable	Si	No	Alta	Alto	Pantin-Jackwood et al. (2017); Gronlien et al. (2019)
Peces	Variable	Si (Pero más baja que las fuentes mamíferas y aviares)	No	Muy alta	Alto	Kobayashi et al. (2016); Milovanovic and Hayes (2018); Kourani et al. (2019); Salvatore et al. (2020)
Medusa	Bajo	No	No	Limitado*	Alto	Putra et al. (2014); Flaig et al. (2020)

El suministro limitado resaltado con (*) indica un muy bajo número de empresas que proporcionan esa colágena. En cuanto al precio (**), un costo comercialmente competitivo del a colágena para usos sanitarios está en el rango de 5,000 a 50,000 USD / kg (Silva et al., 2014) [66].

1.6. Andamios basados en colágena de origen marino

Andamios fabricados a partir de la CLG de origen marino, con una porosidad mayor al 90% y tamaños de poro entre 100-150 μm han sido ampliamente usados para ingeniería de tejidos en cartílago, hueso, hígado, piel y tejido cardíaco [62–64].

Entre los trabajos de investigación más notorios de la ingeniería de tejidos de la piel empleando CLG de origen marino, se encuentran investigaciones previas de Vigneswari *et al.*, quién describió el efecto de curación de heridas de los andamios de poli 3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato (P-3HB-co-4HB) donde la superficie aminolizada fue conjugada con péptidos de CLG de escamas de tilapia. Los andamios P-3HB-co-4HB/péptidos de CLG mejoraron la fijación y proliferación de fibroblastos de ratón (L929) y tuvieron un efecto significativo en la contracción y el cierre de la herida [70]. Se usó CLG de escamas de pez Mrigal (*Cirrhinus cirrhosis*) para la fabricación de andamios mediante el método de liofilización [71]. Este andamio de CLG de origen marino favoreció el crecimiento y la proliferación de fibroblastos y queratinocitos humanos primarios y el co-cultivo 3D, lo que dio como resultado una curación más rápida de la herida y el desarrollo de una capa epidérmica estratificada *in vitro*, demostrando su aplicabilidad como un sustituto dérmico. Ullah *et al* [72] fabricaron un andamio poroso compuesto de quitosano/glicerina y CLG de escamas de pescado de tilapia a través del método de reticulación de liofilización deshidrotermal (DHT). Dicho andamio promovió la proliferación, adhesión e infiltración de fibroblastos humanos y queratinocitos *in vitro*.

1.6.1. Métodos para obtener andamios de colágena

Generalmente, se han fabricado andamios 3D porosos de CLG por métodos de liofilización y evaporación en punto crítico.

Entre los trabajos de investigación reportados referentes a este tema de investigación se encuentran: el desarrollo de un enfoque indirecto del uso de la tecnología de manufactura aditiva para fabricar andamios con canales internos para vascularización predefinidos, es decir, mediante la generación de un molde de sacrificio por impresión de chorro de tinta de compuestos orgánicos de bajo punto de fusión [73].

Ahn y *et al.* (2010) desarrollaron un método de manufactura aditiva criogénica combinado con liofilización y electrohilado para obtener andamios de CLG de baja viscosidad a temperaturas bajo cero, a fin de mejorar ciertos aspectos en la procesabilidad de las soluciones de CLG. La estructura de poros del andamio fue controlada por las micro/nanofibras de CLG presentes en capas en el andamio. Los andamios jerárquicos se caracterizaron con respecto a la unión celular inicial y la proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea dentro de

los andamios. El andamio jerárquico exhibió una unión celular inicial increíblemente mejorada y una compacidad celular entre los poros del andamio trazado en relación con el andamio de CLG 3D normalmente diseñado [67].

Lode *et al.* (2016) desarrollaron un método sencillo basado en el trazado en 3D de una dispersión de CLG altamente viscosa. El estado hinchado de las fibrillas de CLG a pH 4 permitió la extrusión homogénea del material, la deposición de hebras uniformes y finalmente la construcción de andamios 3D. La estabilización de las estructuras trazadas se logró mediante liofilización y reticulación química con la carbodiimida EDC. Los andamios exhibieron una alta forma y fidelidad dimensional y una porosidad jerárquica que consistía en macroporos generados por la deposición de hebras, así como una microporosidad interconectada dentro de las hebras como resultado del proceso de liofilización. El cultivo de células estromales mesenquimales humanas en los andamios, con y sin estimulación adipogénica u osteogénica, reveló su citocompatibilidad y aplicabilidad potencial para la ingeniería de tejido adiposo y óseo [74].

1.6.2. Métodos de entrecruzamiento de CLG

El entrecruzamiento se produce comúnmente cuando las cadenas de un polímero se unen entre ellas por medio de enlaces covalentes propiciados por agentes físicos y químicos. La radiación gamma puede ser aplicada como agente entrecruzante físico. Sin embargo, la energía de la radiación gamma puede destruir la estructura nativa de la proteína. Así como la radiación gamma también la radiación ultravioleta puede ser utilizada como entrecruzante. Es menos dañina que la radiación gamma, pero la luz UV a su vez puede perjudicar la estructura de la proteína. Por otro lado, ejemplos de entrecruzante químicos son el glutaraldehído (GTA) y genipina. El GTA es una molécula alifática de cinco carbonos con un grupo de aldehído en cada extremo de la cadena [75]. Es uno de los compuestos químicos utilizados para mejorar las propiedades mecánicas de los biomateriales a base de CLG. El GTA se aplica ampliamente como agente de unión cruzada para la preparación de, por ejemplo: válvulas cardíacas, injertos vasculares, cartílago elástico, xenoinjertos de tendón y piel artificial [71,72]. Se sabe que los enlaces cruzados de CLG con GTA se forman a través de la reacción de grupos de ϵ -amino de residuos de lisina o hidroxilisina presentes en la CLG con el grupo aldehído [77]. En general, el principal producto de la reacción en solución acuosa en pH neutro es un intermedio base Schiff [78]. El esquema simplificado de esta reacción se puede ver en la Figura 1.5.

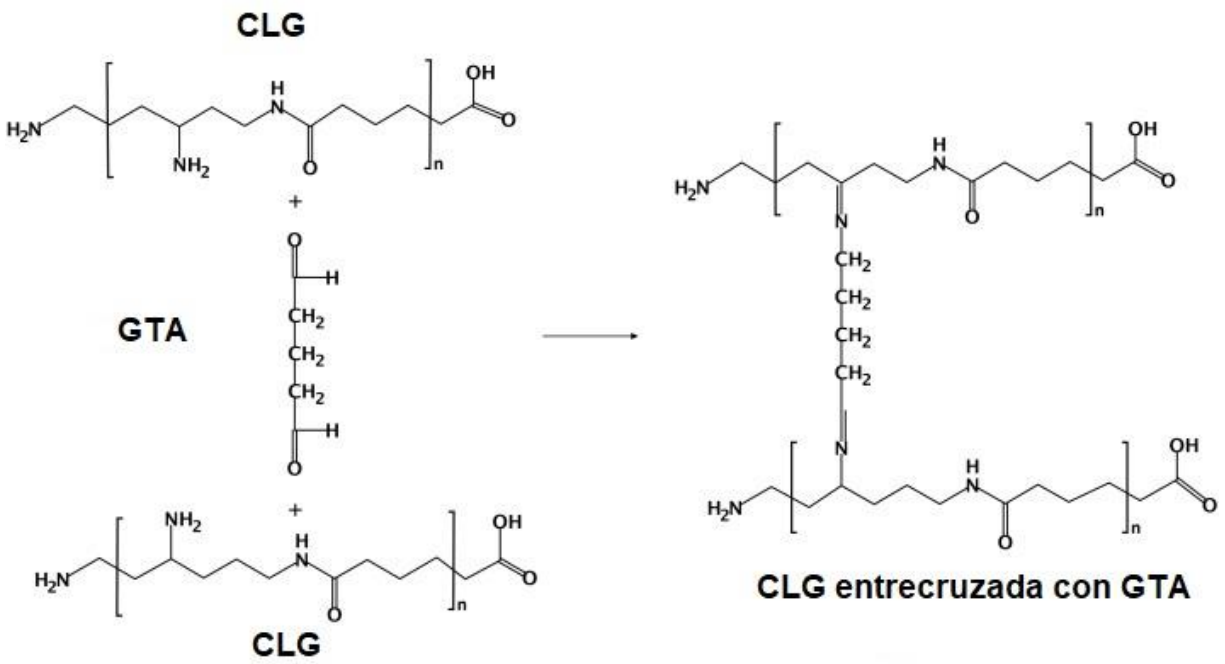


Figura 1.5. Esquema simplificado de la reacción de entrecruzamiento de la CLG con GTA [79].

HIPÓTESIS

La utilización del método de liofilización y entrecruzamiento con glutaraldehído (GTA) permitirá obtener un andamio de colágena de medusa (*Cassiopea xamachana*) con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos cutáneos.

OBJETIVOS

General

Obtener un andamio de colágena de origen marino entrecruzado con glutaraldehído con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos cutáneos.

Específicos

1. Obtener y caracterizar CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*).
2. Manufacturar andamio de CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*) mediante liofilización entrecruzado con GTA.
3. Caracterizar por FTIR y ensayo de ninhidrina el andamio de CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*) entrecruzado con GTA.
4. Evaluar la citotoxicidad del andamio en cultivo de fibroblastos *in vitro*.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

El esquema de las actividades realizadas en la parte experimental de este proyecto se muestra en la Figura 2.1. cómo puede apreciarse, se realizaron 4 etapas principales.

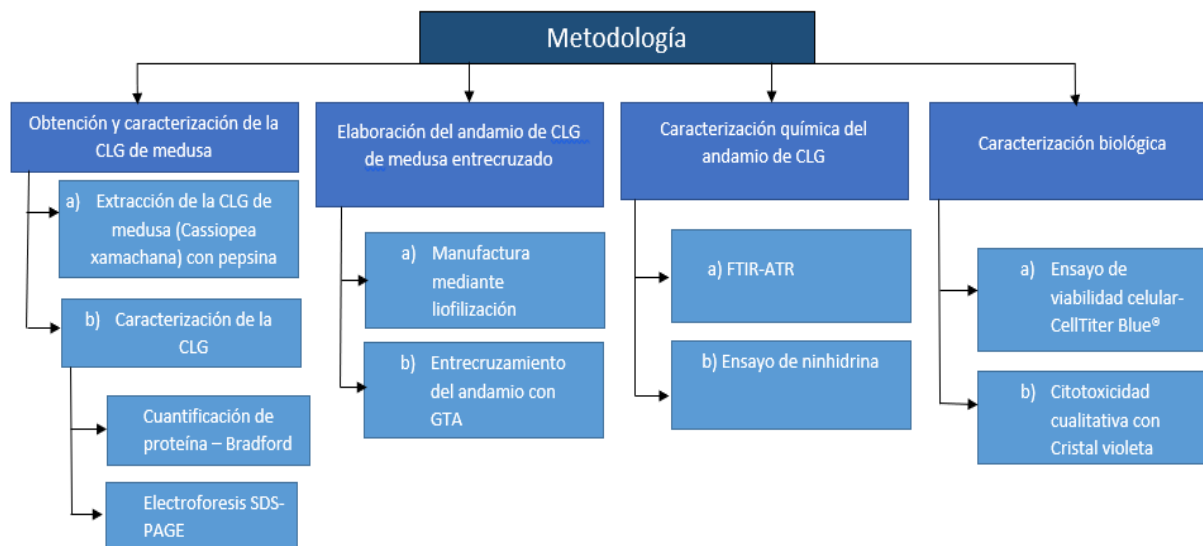


Figura 2.1. Esquema general de las actividades del proyecto.

2.1. Obtención y caracterización de la CLG

2.1.1. Extracción de la CLG de medusa (Cassiopea xamachana)

Para la obtención de la CLG se empleó la metodología descrita por Miller y Rhodes [80] con modificaciones en los tiempos de la digestión enzimática y pretratamiento de la materia prima. El procedimiento para la extracción de CLG de origen marino, fue el siguiente:

- **Selección de la materia**

Las medusas de la especie *Cassiopea Xamachana* fueron colectadas en la laguna de Chelem, ubicada en la costa norte del estado de Yucatán en el Golfo de México. La colecta se realizó de forma aleatoria (Figura 2. 2.), en el periodo de junio de 2019 a enero de 2020. Permiso de colecta registrado ante SEMARNAT: SGPA/DGVS/011043/17.



Figura 2.2. Colecta de medusas.

- **Preparación de la materia prima**

Se preparó la medusa, retirando la parte oral (tentáculos) y utilizando exclusivamente la parte aboral (campana). Todas las campanas se lavaron con agua destilada y posteriormente se colocaron en un procesador de alimentos para reducir el tamaño de las campanas y facilitar la acción del ácido durante el proceso de solubilización.

- **Solubilización**

La solubilización de 2 Kg de campanas de medusa se realizó con ácido acético (CH_3COOH) 0.5 M en una proporción 1:1 por 4 horas a 25 °C. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar los residuos no solubilizados.

- **Digestión de los telopéptidos**

La digestión de los telopéptidos se realizó con pepsina con una relación en peso de 1:10 (enzima/tejido) y se agitó suavemente por 3 horas a 25 °C. Al eliminar los telopéptidos, la colágena resulta menos antígena, más pura y con mejores posibilidades para ser utilizada como biomaterial.

- **Recuperación de la Colágena**

La proteína se recuperó de la solución ácida precipitándola con cloruro de sodio (NaCl) 1 M en agitación constante durante una 1 hora. El precipitado resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 10 °C, de esta segunda centrifugación, se descartó el sobrenadante con la finalidad de eliminar los microresiduos.

El botón resultante se filtró y dializó empleando una membrana de diálisis de 12 KDa (SIGMA ALDRICH) usando CH_3COOH 5 mM en un exceso de 100 volúmenes por 48 horas a una temperatura de 4 °C para eliminar los iones de NaCl . Al concluir el proceso de diálisis los botones

se almacenaron en tubos falcon de 50 mL y se colocaron en el ultracongelador. Finalmente, los botones se liofilizaron por un periodo de 5 días a 49 °C y con una presión atmosférica de 0.050 mbar empleando el liofilizador FreeZone 4.5 (LABCONCO®). La colágena extraída fue molida con un mortero y almacenada en un desecador a una temperatura de 25 °C. En la Figura 2.3. se puede observar el diagrama esquemático del proceso de extracción.



Figura 2.3. Diagrama esquemático del proceso de extracción de la colágena de origen marino.

2.1.2. Caracterización de la CLG tipo I de origen marino

Análisis de proteína: La concentración de proteína se determinó colorimétricamente utilizando un estándar de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) de acuerdo al método de Bradford. Se colocó en una placa de cultivo de 48 pozos 200 µL de sobrenadante y de botón de CLG al 0.025%, respectivamente, con la finalidad de conocer la concentración de proteína en cada muestra. El equipo empleado fue el lector multimodal Cytation 3 (Biotek®). El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm.

Electroforesis en dodecil sulfato de sodio (SDS) en gel de Poliacrilamida:: La pureza de las soluciones de CLG tomadas a diferentes tiempos con pepsina se analizaron por electroforesis en

gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida basándose en el método de Laemmli (1970) [81]. El porcentaje de gel que se usó fue de 7.5 % de gel separador, 4 % de concentrador y 24 µg de proteína. Se empleó un voltaje 120 V. Después de la corrida, para detectar las fracciones proteicas, las muestras se tiñeron con azul de Coomassie al 10% y destañadas con ácido acético.

2.2. Elaboración de los andamios de CLG entrecruzado

2.2.1. Manufactura mediante liofilización

Los andamios se manufacturaron mediante liofilización, este procedimiento incluye la formación de cristales de hielo dentro de la solución de CLG durante la congelación que se realiza entre -20 y -45 °C, estos cristales actúan como agentes porogénicos en la etapa de secado al vacío, resultando finalmente en un andamio poroso tridimensional.

El proceso de manufactura de andamios por el proceso de liofilización consistió colocar alícuotas de 2 mL de CLG (18 mg/mL) de origen marino en placas de cultivo de 24 pozos (Diámetro por pozo: 1.6 cm). La placa se congeló a -20 °C durante 72 horas. La sublimación se realizó empleando el liofilizador FreeZone 4.5 (LABCONCO®) a una temperatura de -49 °C y una presión atmosférica de 0.050 mbar durante 48 horas.

2.2.2. Entrecruzamiento del andamio con GTA

Para entrecruzar los andamios de CLG obtenidos, éstos se colocaron en un desecador junto con un vial que contenía 10 mL de una solución de GTA al 25% (m/m). Posteriormente, el desecador fue sellado al vacío mecánico utilizando una bomba de diafragma marca KNF modelo UN811 KTP, a una temperatura constante de 25 °C como se observa en la Figura 2.4, con la finalidad de que los andamios solamente reaccionaran con el vapor de GTA al interior del desecador. Los tiempos de reacción seleccionados para el entrecruzamiento con GTA fueron de 2 y 4 horas [82]. Pasado cada respectivo tiempo de reacción, el desecador fue abierto en una campana de extracción y se retiró el vial que contenía la solución de GTA. Se dejaron secar los andamios en la campana durante una hora.

- **Eliminación del entrecruzante residual**

Posteriormente de haber sometido a los andamios al proceso de entrecruzamiento con la metodología propuesta, se sometió a los andamios a un proceso de eliminación de residuos de GTA que no reaccionaron con los andamios de CLG. Para ello, se cerró de nuevo el desecador, que contenía en su interior solamente los andamios entrecruzados con GTA y se generó vacío mediante la bomba de diafragma durante 60 minutos.

El desecador fue de nuevo abierto y los andamios entrecruzados en su interior fueron lavados con agua destilada y se dejaron secar al aire durante 18 horas.



Figura 2.4. Montaje del sistema para entrecruzar los andamios de CLG con GTA.

2.3. Caracterización química del andamio de CLG

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR, por sus siglas en inglés): Esta prueba permite identificar la presencia de grupos funcionales en las materias primas y los productos, por lo que, se realizó con la finalidad de visualizar algún cambio químico en la estructura después de someter a los andamios al tratamiento de entrecruzamiento con GTA. Inicialmente, esta prueba se realizó mediante la técnica de ATR utilizando un espectrómetro Nicolet 8700 (Thermo Scientific). Para esta prueba se emplearon 5 mg de muestra de CLG antes y después de entrecruzar con GTA a periodos de tiempo de 2 y 4 horas (CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h). Las muestras se colocaron sobre el cristal de seleniuro de zinc (ZnSe) del espectrómetro a un intervalo de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

Ensayo de Ninhidrina: Este ensayo se realizó para hacer el análisis del grado de entrecruzamiento de los andamios de CLG entrecruzados con GTA con base en la cantidad de grupos amino libres en dichos andamios.

Inicialmente, se colocó 2 mg de cada muestra (CLG, CLG.GTA-2h y CLG-GTA-4h) en tubos de ensayo a los cuales se les agregó 2 mL de la solución de la ninhidrina al 20% en etanol al 96%. El C+ fue la solución de ninhidrina sin andamio. Los tubos se calentaron a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño maría por 25 minutos y posteriormente se dejaron enfriar por una hora a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomaron alícuotas de $200\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra y se colocaron en pozos (Figura 2.5.) de una placa de cultivo de 48

pocillos para medir la absorbancia de cada solución a una longitud de onda de 570 nm empleando el lector de placas CYTATION 3 (BioTek®).

El contenido de los grupos amino libres presentes en la CLG, utilizado como indicador del grado de entrecruzamiento, se definió como:

$$\text{Grado de entrecruzamiento \%} = \left[\frac{NH_0 - NH_t}{NH_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde NH_0 es la cantidad de grupos amino libres en las muestras no entrecruzadas y NH_t es la cantidad de grupos amino libres en las muestras entrecruzadas [83].

2.4. Caracterización biológica

Ensayo de viabilidad celular: Se realizaron lixiviados con los andamios de CLG entrecruzados a 2 y 4 horas con GTA y sin entrecruzar, respectivamente, por lo cual fueron previamente pesados y esterilizados mediante luz UV. Posteriormente se lavaron con PBS 1X (0.01 M) y se colocaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus siglas en inglés) con 1% de antibiótico y antimicótico y anfotericina B, con base en la norma ISO 10993-12.

Los lixiviados obtenidos se colocaron en un cultivo de fibroblastos humanos con una densidad celular de 6×10^3 células por pozo. Con base en el diseño experimental se colocó en cada pozo 40 μ L de cada lixiviado y 40 μ L de RPMI con SFB al 10%. Como control positivo se utilizaron fibroblastos con medio (C+) y al control negativo se le agregó una solución con SDS en PBS al 1% v/v (C-). El seguimiento de la proliferación celular se realizó utilizando el reactivo CellTiter-Blue® a las 3, 24 y 48 horas de haber iniciado en ensayo. Éste reactivo 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 (BioTeK®). Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se empleó la siguiente ecuación [84]:

$$\% \text{ viabilidad} = \left[\frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Ensayo de citotoxicidad cualitativa: Para el ensayo se empleó el cultivo de fibroblastos dérmicos humanos utilizado en el ensayo de viabilidad con CellTiter-Blue®. Transcurrido cada tiempo de incubación se retiró el medio de cada pozo y se lavaron con PBS 1X (0.01 M). Posteriormente las células se fijaron en el pozo con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 0.5 %, el cual es un

colorante basófilo que atraviesa la membrana celular y se acumula en el citoplasma y tiene la capacidad de vincularse al ADN.

Finalmente se realizó la microscopia óptica de los cultivos de fibroblastos teñidos con el cristal violeta y expuestos a los andamios de CLG entrecruzados y sin entrecruzar mediante el empleo del microscopio invertido modelo TCM 400 de la marca LABOMED®.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención y caracterización de la CLG

3.1.1. Extracción de la CLG tipo I de origen marino

En la Figura 3.1. se puede apreciar la apariencia de la CLG extraída de la medusa *Cassiopea xamachana* con la metodología propuesta. La proteína se encuentra en su presentación en polvo con una coloración ligeramente beige.

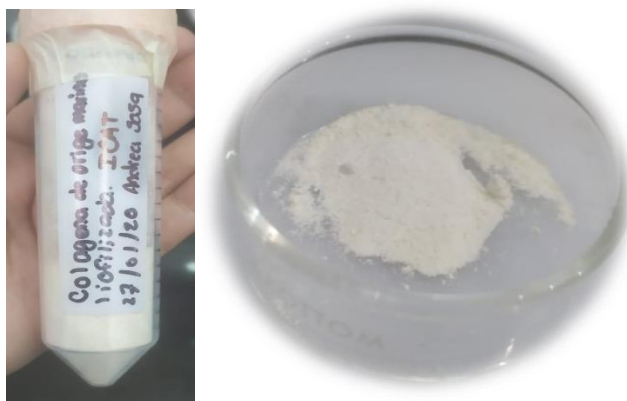


Figura 3.1. CLG tipo I de origen marino obtenida del proceso de extracción realizada a partir de la medusa *Cassiopea xamachana*.

3.1.2. Caracterización de la CLG de origen marino

La proteína obtenida fue caracterizada por el método de Bradford y electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamina (SDS-PAGE).

Análisis de proteína (método Bradford): En la Figura 3.2. se observa la curva de calibración obtenida utilizando concentraciones de BSA de 0 a 10 μg .

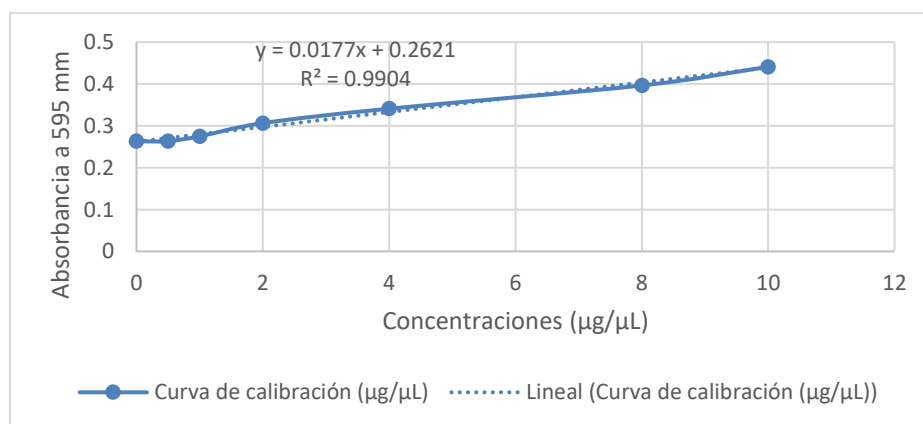


Figura 3.2. Curva de calibración empleada para la cuantificación de la CLG obtenida.

En la Figura 3.3. se presentan las muestras de CLG posterior a su centrifugación, el botón y sobrenadante por duplicado en la placa de cultivo de 48 pozos después de adicionar el azul de coomassie.

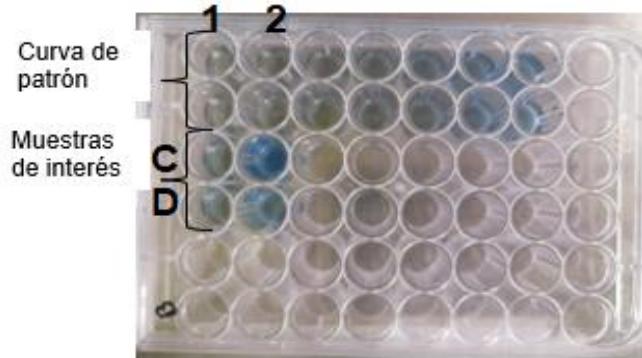


Figura 3.3. Apariencia de las muestras sometidas al ensayo de Bradford. La muestra de sobrenadante se encuentra en los pozos C1 y D1, la muestra de Botón en C2 y D2.

Los resultados del análisis de concentración de proteína de ambas muestras se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Absorbancia de las muestras de estudio.

Muestra	Absorbancia promedio
Botón de CLG	0.56 ± 0.08
Sobrenadante	0.32 ± 0.01

La lectura de absorbancia en el botón de CLG fue significativamente mayor a la de la muestra de sobrenadante. La ecuación de la recta para la regresión fue $y = 0.0177x + 0.2621$ y el coeficiente de correlación, $R^2 = 0.9904$ este valor debe ser lo más cercano a 1, esto sugiere una relación lineal entre la absorbancia y la concentración (variables). El R^2 calculado indica que el 99 % de la información está ajustada a la variable Y (absorbancia), confirma además que el grado de relación entre las variables es alto [85].

Con base en la absorbancia y los valores obtenidos de la curva de calibración se pudo calcular la concentración total de proteína en cada muestra, como se observa en la Figura 3.4.

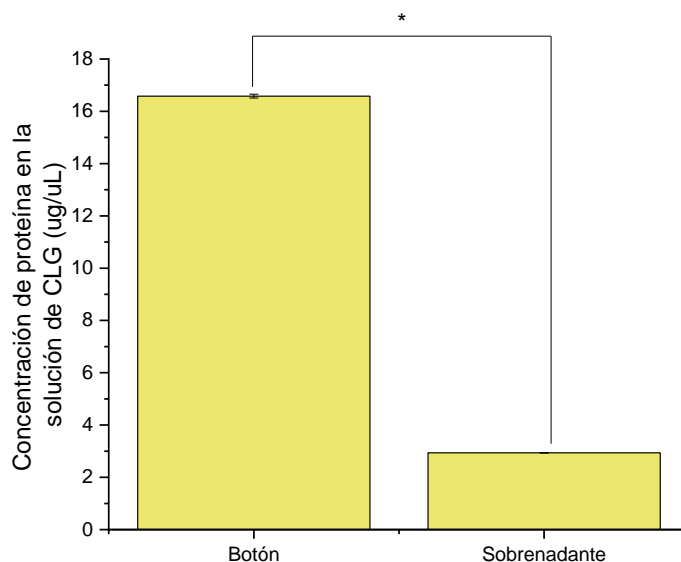


Figura 3.4. Concentración de proteína en la solución de CLG (botón y sobrenadante) (* $p \leq 0.05$).

a) Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida

En la Figura 3.5., se pueden apreciar los resultados obtenidos del análisis de SDS-PAGE de las muestras de CLG extraída a diferentes tiempos de hidrólisis con pepsina: 0.5 (1), 1.5 (2), 2.5 (3), 3.5 (4) y 20 horas (5). El mantenimiento de la triple hélice se confirma por la presencia del trímero γ y el dímero β . El perfil electroforético (cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ) es similar a lo observado por Yu, *et al.*, para colágena proveniente de espinas y cráneos de atún [86] y Qiu, *et al.*, para la colágena extraída de la medusa *Nemopilema nomurai* [87].

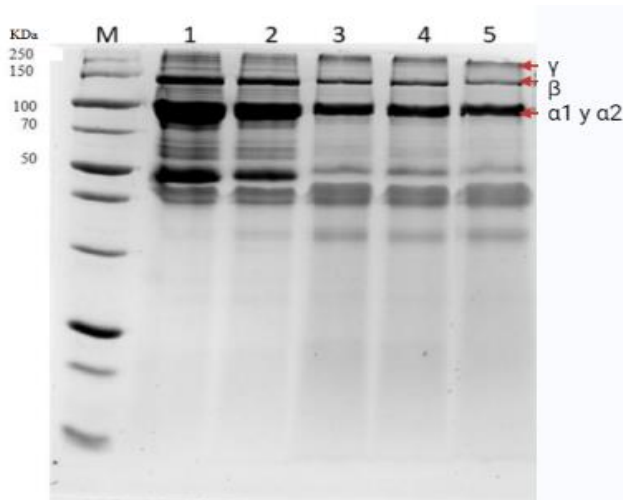


Figura 3.5. Electroforetograma de CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*). Donde M es el marcador de peso molecular, 1-5 son las muestras tomadas a diferentes tiempos de hidrólisis con pepsina. En todas las muestras se exhiben como principales constituyentes las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, dímeros y trímeros (β y γ) propios de la CLG tipo I [80,81].

3.2. Elaboración del andamio de CLG

3.2.1. Manufactura y entrecruzamiento (Liofilización-GTA)

Los andamios entrecruzados presentaron un color beige más oscuro comparado con los andamios de CLG sin entrecruzar, de igual forma los andamios entrecruzados a 4 horas presentaron un color beige más oscuro que el andamio de CLG entrecruzado a 2 horas con GTA (Figura 3.6.). El cambio de color se puede atribuir a la creación de enlaces imina ($\text{CH}=\text{N}$), entre los grupos amina libres de la proteína y los grupos aldehído del GTA. Conforme aumenta el tiempo de entrecruzamiento de los andamios puede observarse que el tono del color beige va en aumento, que puede deberse a la creación de una mayor cantidad de enlaces imina, con base lo reportado en la literatura [21,82].

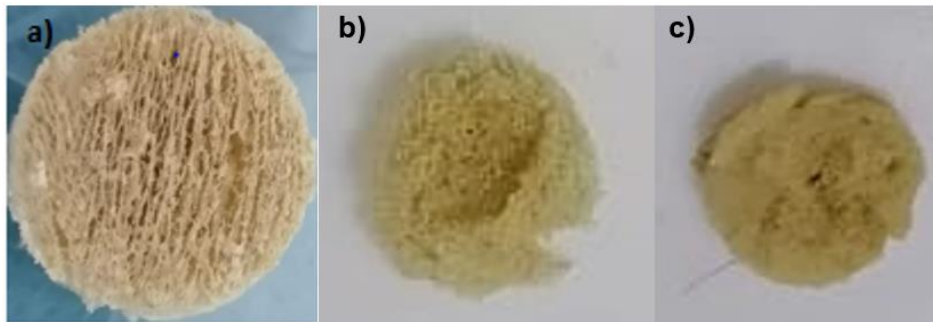


Figura 3.6. Andamio de CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*) sin entrecruzar (a), entrecruzado con GTA por un periodo de 2 horas (b) y entrecruzado con GTA por un periodo de 4 horas (c).

Con respecto a la morfología de los andamios de CLG entrecruzados con GTA comparados con los no entrecruzados, hay cambios visualmente notables, como: la reducción del diámetro, pese a que se prepararon a partir del mismo volumen y concentración de CLG; disminución del diámetro de la sección transversal y menor tamaño de los poros de dichos andamios. La formación de poros es un aspecto importante en los andamios con potencial aplicación en la ingeniería del tejido cutáneo, debido a que se ha demostrado que los poros permiten la supervivencia celular, ya que garantizan el ingreso de nutrientes y la eliminación de desechos celulares, así como el intercambio gaseoso necesario para los procesos de reparación-regeneración de heridas [91], para este tipo de andamios porosos, un macroporo adecuado, presenta un diámetro de 100 a 200 μm , aunque esponjas microcelulares con diámetros de poro de 1 a 100 μm demuestran óptimos crecimientos de fibroblastos [92].

3.3. Caracterización fisicoquímica de los andamios de CLG

FTIR-ATR: En la Figura 3.7., se puede observar el espectro IR de los andamios de CLG de origen marino, mientras que en la Tabla 3.2. se enlistan los principales picos de absorción presentes en el espectro comparado con aquellos reportados previamente.

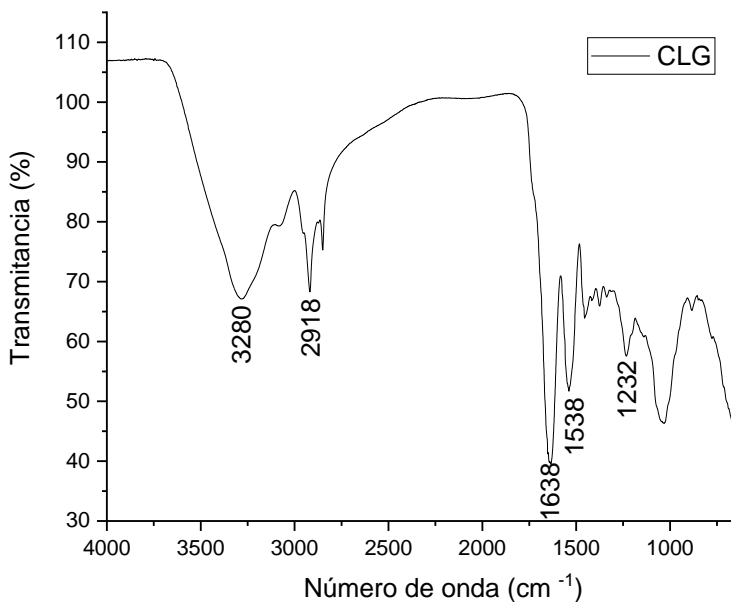


Figura 3.7. Espectro IR de la CLG de origen marino

Tabla 3.2. Principales enlaces del espectro IR para la CLG tipo I.

Valores experimentales	[89]	[93]	Tipo de enlace
Número de onda (cm ⁻¹)			
3280	3420	3352	Estiramiento N–H (Amida A)
2918	2928	2927	Estiramiento asimétrico CH ₂ (Amida B)
1638	1646	1646	Estiramiento simétrico C=O (Amida I)
1538	1536	1558	Flexión N–H (Amida II)
1232	1236	1262	Estiramiento C–N y N–H (Amida III)

Según Oliveira, *et al.* [89] y Jeong, *et al.* [93], la banda de la amida A está relacionada con el estiramiento N–H. Las vibraciones del estiramiento de N–H tienen lugar entre 3400 y 3440 cm^{-1} y cuando el número de onda se desplaza a un valor más bajo ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$) sugiere que un grupo N–H en la molécula de CLG está participando en un enlace de hidrógeno y contribuyendo al mantenimiento de la estructura de triple hélice como ha sido previamente reportado [94]. El número de onda observado para esta banda en el andamio de CLG es de 3280 cm^{-1} denotando un cambio considerable y evidenciando el enlace de hidrógeno restante que contribuye a la estructura helicoidal de la proteína obtenida [95].

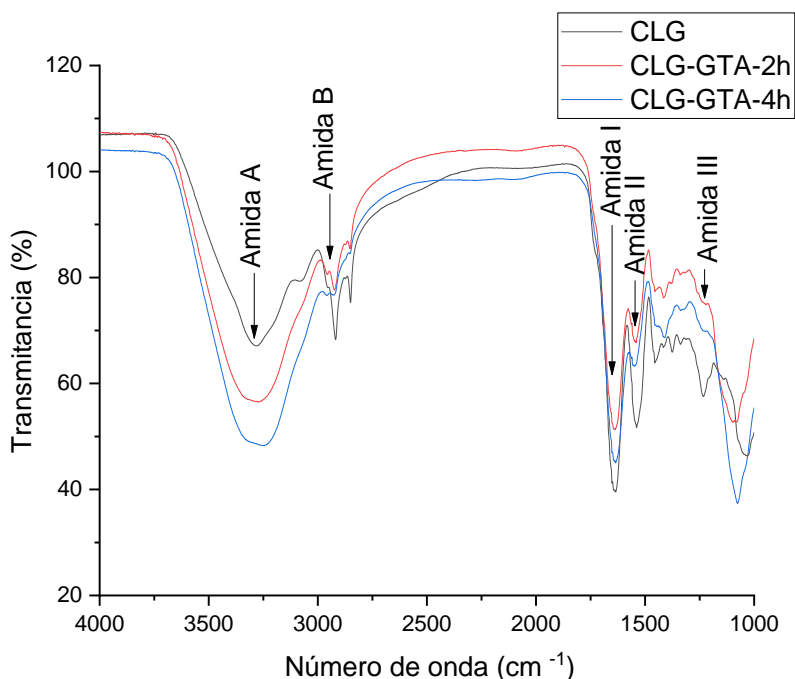


Figura 3.8. Espectros IR de la CLG después del entrecruzamiento con GTA a 2 y 4 h.

Tabla 3.3. Bandas de absorción de las muestras de CLG después de entrecruzar con GTA.

CLG-GTA-2h	CLG-GTA-4h	Tipo de enlace
Número de onda (cm^{-1})		
3284	3284	Estiramiento N–H (Amida A)
2924	2924	Estiramiento asimétrico CH_2 (Amida B)
1638	1635	Estiramiento simétrico C=O (Amida I)
1544	1546	Flexión N–H (Amida II)
1238	1238	Estiramiento C–N y N–H (Amida III)

En los espectros de IR de los andamios entrecruzados con GTA a 2 y 4 h se observa cambios en los picos de absorción en 2924, 2857, 1546 y 1238 cm^{-1} con respecto a la CLG sin entrecruzar. La reacción de entrecruzamiento entre la CLG y el GTA ocurre mediante la formación de enlaces covalentes imina, vía reacción de Schiff, entre los grupos aldehído del entrecruzante y amino de la CLG [79]. El pico relacionado con los enlaces imina debería estar presente entre 1600 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} , sin embargo, en la Figura 3. 8, no se aprecia un cambio significativo en este intervalo, lo que podría estar indicando un traslape con el pico característico a 1638 cm^{-1} o que se requiere de una técnica de mayor sensibilidad, como la resonancia magnética nuclear del protón (^1H -RMN). Algunos reportes indican una banda de absorción a 1740 cm^{-1} que se puede atribuir a los grupos carbonilo del GTA que no reaccionaron con la CLG [96]. En el espectro IR no se observa dicha banda, por lo que no hay evidencia de presencia de residuos de este entrecruzante.

Ensayo de Ninhidrina: La solución de ninhidrina al reaccionar con los grupos amino libres presentes en la biomacromolécula de CLG, se torna de un color azul-morado y absorbe luz UV a 570 nm. La cantidad de grupos amino libres, es proporcional a la absorción de la solución. En la Tabla 3.4. se presentan las lecturas de absorbancia a 570 nm por quintuplicado de todas las soluciones de ninhidrina después de reaccionar con los grupos de amino libre en los andamios de CLG entrecruzados con GTA y sin entrecruzar, al igual que la solución sin andamio. Se obtuvo el promedio de todas las lecturas y con ello se calculó el grado de entrecruzamiento mediante la fórmula (1).

Tabla 3.4. Tabla de absorbancia de las muestras de los andamios de CLG no entrecruzados y entrecruzados con GTA a 2 y 4 h.

	CLG	CLG-GTA-2h	CLG-GTA-4h	Sin andamio
1	0.45	0.28	0.18	0.94
2	0.45	0.32	0.19	0.99
3	0.46	0.22	0.21	0.98
4	0.53	0.29	0.19	0.97
5	0.46	0.32	0.20	0.89
Promedio	0.47 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.95 ± 0.04

El grado de entrecruzamiento aumentó con el tiempo de reacción de los andamios al vapor de GTA. El grado de entrecruzamiento de los andamios de CLG entrecruzados durante 2 y 4 horas fue del $39.42 \pm 4.16 \%$ y $59.05 \pm 1.05 \%$ respectivamente como se parecía en la figura 3.9 este comportamiento era el esperado, ya que se ha reportado que la interacción de CLG con GTA se

da a través de grupos amino libres presentes en la CLG, por lo que estos grupos disminuyen al darse el entrecruzamiento [79].

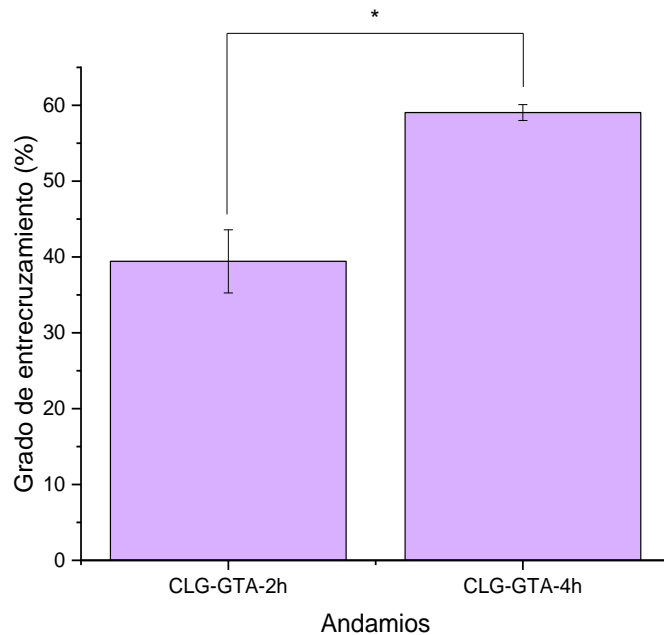


Figura 3. 9. Resultados del grado de entrecruzamiento de los andamios antes y después de entrecruzar con GTA a 2 y 4 horas (* $p \leq 0.05$). $n= 5$

3.4. Caracterización biológica

Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad de los fibroblastos humanos expuestos a lixiviados de los andamios de CLG entrecruzados con GTA y sin entrecruzar se evaluó durante un periodo de incubación de 3, 24 y 48 horas con CellTiter-Blue®.

Los cultivos de fibroblastos en contacto con los andamios sin entrecruzar y entrecruzados presentaron un cambio de color de azul a rojizo, lo cual, indica que los andamios no son citotóxicos y que no afectan la viabilidad celular debido a que los fibroblastos conservan su capacidad reductora dentro del citoplasma.

Se realizó la lectura de la absorbancia del ensayo a las 3, 24 y 48 horas (Tabla 3.5.) y posteriormente empleando la ecuación (2), se calculó la viabilidad de los fibroblastos expuestos de forma indirecta a los andamios de CLG entrecruzados con GTA a 2 y 4 horas y no entrecruzados.

Tabla 3.5. Porcentaje de viabilidad de los cultivos de fibroblastos en contacto con los andamios de CLG, CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h.

Muestra	% de Viabilidad	Citotoxicidad
<i>Sin andamio 3 h</i>	100	Control
<i>Sin andamio 24 h</i>	100	Control
<i>Sin andamio 48 h</i>	100	Control
<i>CLG 3 h</i>	127.47 ± 13.24	Viable
<i>CLG 24 h</i>	103.55 ± 3.72	Viable
<i>CLG 48 h</i>	94.39 ± 8.09	Viable
<i>CLG-GTA-2h 3 h</i>	104.94 ± 8.36	Viable
<i>CLG-GTA-2h 24 h</i>	99.38 ± 5.87	Viable
<i>CLG-GTA-2h 48 h</i>	83.76 ± 4.67	Viable
<i>CLG-GTA-4h 3 h</i>	107.66 ± 11.28	Viable
<i>CLG-GTA-4h 24 h</i>	98.77 ± 15.72	Viable
<i>CLG-GTA-4h 48 h</i>	90.37 ± 7.79	Viable

Tóxico: Se considera efecto tóxico cuando la viabilidad celular es inferior al 70% Viable: Se considera efecto viable cuando la viabilidad celular es superior al 70% [84].

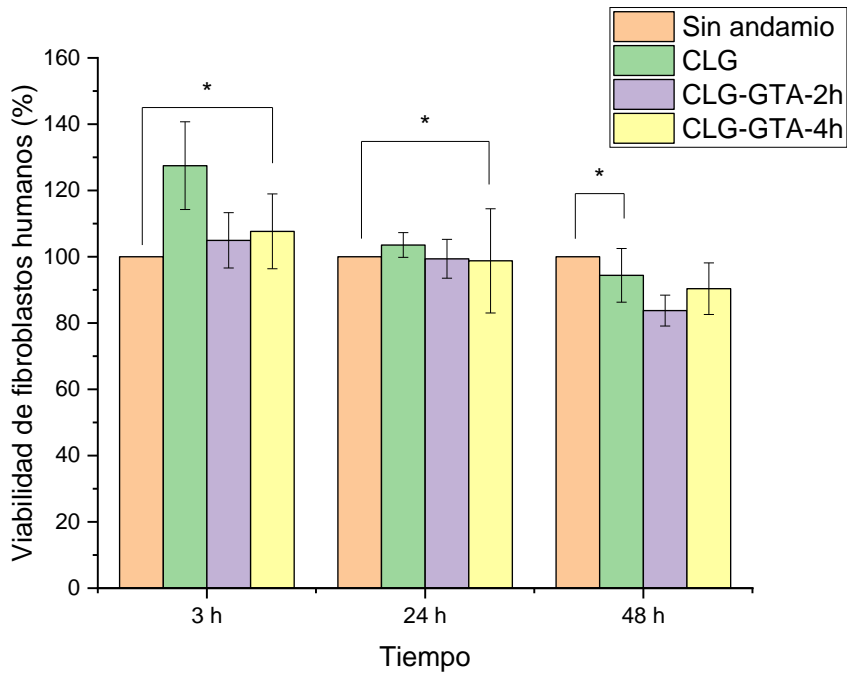


Figura 3.10. Viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados con los andamios de CLG, CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h a 3, 24 y 48 horas (* $p \leq 0.05$).

En la Figura 3.10. se demuestra de forma cuantitativa que los andamios de CLG entrecruzados con GTA no son citotóxicos ya que presentaron una viabilidad superior al 70% respecto al control (sin andamio) como lo establece la Norma ISO 10993-5 [97].

Como se observa en la Figura 3.10. a las 3 horas la viabilidad de los andamios de CLG y CLG entrecruzados con GTA a 2 y 4 horas, es mayor a la del control positivo. Transcurridas 24 horas de incubación los andamios CLG-GTA-2h y CLG-GTA-4h presentan una viabilidad celular menor comparado con el control positivo. El andamio de CLG sin entrecruzar continuó mostrando una mayor viabilidad celular que el control positivo.

Por último, a las 48 horas del ensayo el andamio de CLG sin entrecruzar mostro un porcentaje de viabilidad celular similar al del control positivo. Con base en lo reportado en la literatura, esto es debido a que la CLG muestra naturalmente propiciar la proliferación celular, particularmente en células epidérmicas y fibroblastos [21]. Por el contrario, los andamios de CLG entrecruzados a 2 y 4 horas presentaron una disminución de la viabilidad celular con respecto al control positivo, sin embargo, su porcentaje de viabilidad fue mayor al 70% en ambos andamios, por lo que no presentaron efecto citotóxico al entrecruzarlos con la metodología propuesta, esto contrasta con lo reportado en trabajos anteriores, en los cuales se menciona que los biomateriales entrecruzados con GTA son poco biocompatibles con algunas líneas celulares incluyendo

fibroblastos humanos [79, 98, 99], esto atribuido a la degradación a la liberación continua de aldehídos que contribuyen a efectos citotóxicos prolongados [100].

Ensayo de citotoxicidad cualitativa: En la Figura 3.11. se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía óptica, con el microscopio invertido modelo TCM 400 de la marca LABOMED®. Se observa con el objetivo de 10X el cultivo de fibroblastos *in vitro* teñido con cristal violeta al 0.5% previamente puestos en contacto indirecto con los andamios de CLG y CLG-GTA-4h ya que presentan el mismo perfil de proliferación en todos los casos. Las células observadas presentan una morfología elongada típica de los fibroblastos que ha sido reportada en diversos trabajos [101]–[103].

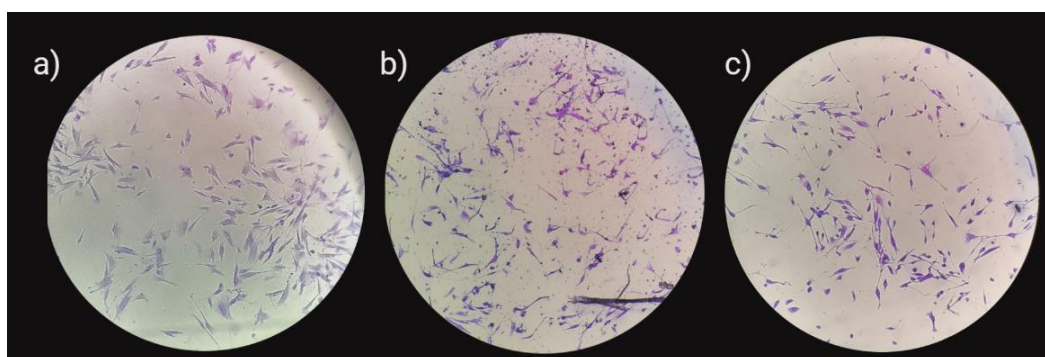


Figura 3.11. Fibroblastos dérmicos humanos teñidos con cristal violeta al 0.5 %. a) Cultivo de fibroblastos sin andamio, b) cultivo de fibroblastos expuestos al andamio de CLG sin entrecruzar y c) cultivo de fibroblastos expuestos al andamio de CLG-GTA-4h.

CONCLUSIONES

Mediante la metodología propuesta se extrajo CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*), y de acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de Bradford para cuantificar la concentración de proteína de la misma, esta presenta mayor contenido proteico en el botón en comparación con el sobrenadante, siendo las concentraciones de 16.58 y 2.94 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), respectivamente.

Con base en los resultados de las pruebas de caracterización por electroforesis y FTIR-ATR realizadas a las muestras de CLG de origen marino, se confirmó que la CLG obtenida mediante el proceso de extracción propuesto, es CLG tipo I.

Por medio de los resultados del ensayo de ninhidrina pudo determinarse el grado de entrecruzamiento de CLG mediante la reacción con GTA con los tiempos de exposición propuestos. Los andamios entrecruzados a 2 y 4 horas mostraron un aumento en el grado de entrecruzamiento del $39.42 \pm 4.16 \%$ y $59.05 \pm 1.05 \%$ respectivamente.

Los resultados del ensayo de viabilidad celular de los andamios de CLG entrecruzados a 2 y 4 horas demostró que no son citotóxicos, puesto que el entrecruzamiento no afectó la viabilidad celular. De igual forma con los resultados del ensayo de citotoxicidad cualitativa se pudo observar que los fibroblastos en contacto con los andamios de CLG entrecruzados mostraron en general una morfología extendida.

Mediante la metodología propuesta se pudo aumentar el grado de entrecruzamiento de los andamios de CLG, sin perder las características biológicas que posee la CLG y que mantiene aun después del entrecruzamiento con GTA.

La hipótesis planteada en este trabajo de investigación si se cumple, con base en los resultados obtenidos se demuestran que el andamio elaborado a base de CLG de medusa (*Cassiopea xamachana*) y entrecruzado con GTA presenta un reforzamiento en su estructura molecular y un comportamiento biológico adecuado para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos cutáneos.

RECOMENDACIONES

La experimentación que se llevó a cabo en la realización de este proyecto de investigación contempló la caracterización fisicoquímica y biológica de los andamios de CLG entrecruzados con GTA. Sin embargo, se recomienda realizar otras técnicas de caracterización para evaluar a mayor profundidad la caracterización fisicoquímica y biológicas de estos andamios, como:

- Pruebas de pérdida de masa para conocer el tiempo de degradación de los andamios de CLG antes y después de ser entrecruzados con GTA.
- Pruebas a tensión para medir las propiedades mecánicas de los andamios.
- Debido a que con el análisis FTIR-ATR no fue posible visualizar la banda de absorción característica de los enlaces imina resultantes del entrecruzamiento de la CLG y el GTA, se recomienda emplear espectroscopia Raman, ya que ofrece mayor sensibilidad para detectar estos cambios químicos.
- Prueba de hemólisis para conocer de forma cualitativa y cuantitativa si el andamio de CLG de origen marino obtenido por liofilización y entrecruzado con GTA es hemocompatible, así como ensayo de cierre de herida.

REFERENCIAS

- [1] DGE, Boletín epidemiológico. Secretaria de Salud, 61–64, 2019.
- [2] R. Roa and C. Robles, Uso de biopolímeros para la elaboración de andamios con aplicación en ingeniería tisular, *Rev. Chil. cirugía*, 67, 1, 647–652, 2015.
- [3] C. Guarín, Q. Santamarí, and P. Landínez, Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas, *Fac. Med. Univ. Nac. Colomb.*, 61, 4, 441–448, 2013.
- [4] N. Papanas and E. Maltezos, The diabetic foot: Established and emerging treatments, *Acta Clin. Belg.*, 62, 4, 230–238, 2007.
- [5] S. Shahrokhi, A. Arno, and M. G. Jeschke, The use of dermal substitutes in burn surgery: Acute phase, *Wound Repair Regen.*, 22, 1, 14–22, 2014.
- [6] M. Cascone, M. Barbani, and C. Cristallini, Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides, *Biomater Sci. Polym*, 12, 3, 267–281, 2001.
- [7] L. J. Chen and M. Wang, Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer, *Biomaterials*, 23, 13, 2631–2639, 2002.
- [8] T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, and Y. Sakurai, Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, 16, 4, 297–303, 1995.
- [9] P. Chan, T. Hui, and O. Chan, Photochemical Cross-linking for collagen-based scaffolds: A study on optical properties, mechanical properties, stability, and hematocompatibility, *Tissue Eng.*, 13, 1, 73–85, 2007.
- [10] R. Knight, H. Wilcox, and S. Korossis, The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves, *Eng. Med.*, 22, 1, 129–143, 2008.
- [11] G. Orive, R. Hernandez, and A. Gascón, Challenges and perspectives of cell microencapsulation, *Trends Biotechnol*, 22, 2, 87–92, 2004.
- [12] D. Sundaramurthi, U. Krishnan, and S. Sethuraman, Electrospun nanofibers as scaffolds for skin tissue engineering, *Polym. Rev.*, 54, 2, 348–376, 2014.
- [13] X. Liu, T. Lin, J. Fang, and G. Yao, In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes, *J. Biomed. Mater.*, 94, 2, 499–508, 2010.
- [14] M. Norouzi, S. Boroujeni, N. Omidvarkordshouli, and M. Soleimani, Advances in skin regeneration: Application of electrospun scaffolds, *Adv. Healthc. Mater.*, 4, 8, 1114–1133, 2015.
- [15] R. Shevchenko, S. James, and E. James, A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *J. R. Soc. Interface*, 7, 43, 229–258, 2010.

- [16] A. Rahman, Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications, *Mar. Drugs*, 17, 2, 118–130, 2019.
- [17] H. Sumiyoshi, S. Nakao, H. Endo, T. Yanagawa, Y. Nakano, Y. Okamura, et al., A novel composite biomaterial made of jellyfish and porcine collagens accelerates dermal wound healing by enhancing reepithelization and granulation tissue formation in mice, *Adv. wound care*, 9, 6, 295–311, 2020.
- [18] S. Yamada, K. Yamamoto, T. Ikeda, K. Yanagiguchi, and Y. Hayashi, Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine, *Biomed Res. Int.*, 2014, 302–332, 2014.
- [19] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, and F. Berthod, Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Materials (Basel)*, 3, 3, 1863–1887, 2010.
- [20] L. Chi, Obtención de un andamio bicapa mediante la técnica de electrohilamiento para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos de la piel, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2015.
- [21] L. Marinucci, C. Lilli, M. Guerra, S. Belcastro, E. Becchetti, G. Stabellini, et al., Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: An in vitro study, *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A, 2, 504–509, 2003.
- [22] J. Abdo, N. Sopko, and S. Milner, The applied anatomy of human skin: A model for regeneration, *Wound Med.*, 28, 100179, 2020.
- [23] P. Kolarsick, M. Kolarsick, and C. Goodwin, Anatomy and Physiology of the Skin, in *JDNA*, 3, 4, 2011, 295–300.
- [24] J. Kozłowska and A. Sionkowska, Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen–calcium phosphate composite materials, *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 397–403, 2015.
- [25] D. Chu, Section 3: Overview of biology, development, and structure of skin, in *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 7^{o.}, New York: McGraw-Hill Interamericana, 2008, 57–73.
- [26] A. Buendia, J. Mazuecos, and F. Camacho, Capítulo 1. Anatomía y fisiología de la piel, in *Manual de dermatología*, 2^{o.}, España: Grupo Aula Médica, 2018, 2–27.
- [27] G. Vela-Anaya, Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud, *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc.*, 26, 2, 105–114, 2018.
- [28] J. Arenas, Las heridas y su cicatrización, *Elsevier*, 22, 5, 126–132, 2003.
- [29] J. Fletcher, Differences between acute and chronic wounds and the role of wound bed preparation., *Nurs Stand*, 22, 24, 62 - 68, 2008.

- [30] H. Orsted, D. Keast, and L. Forest, Basic principles of wound healing, *Wound Care Canada*, 9, 2, 4–12, 2011.
- [31] P. Martín, Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration, *Science (80-.)*, 276, 5309, 75–81, 1997.
- [32] N. Sanchez, F. Guardado, J. Arriuaga, and T. Jorge, Revisión en úlceras venosas: Epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento actual., *Rev. Mex. Angiol.*, 47, 1, 26–38, 2019.
- [33] F. Wood, M. Kolybaba, and P. Allen, The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: Eleven years of clinical experience, *Burns*, 32, 5, 538–544, 2006.
- [34] V. Van der Veen, M. Van der Wal, M. Van Leeuwen, M. Ulrich, and E. Middelkoop, Biological background of dermal substitutes, *Burns*, 36, 3, 305–321, 2010.
- [35] C. Dieckmann, R. Renner, L. Milkova, and J. Simon, Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond, *Exp. Dermatol.*, 19, 8, 697–706, 2010.
- [36] L. Cambolor-Santervás, A. Meana-Infiesta, J. M. Llana-Coto, F. Vaquero-Lorenzo, S. Gómez-Llames, D. López-García, et al., Tratamiento de úlceras vasculares crónicas con equivalentes cutáneos obtenidos mediante ingeniería tisular, *Angiología*, 55, 1, 21–33, 2003.
- [37] A. Metcalfe and M. Ferguson, Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, *J. R. Soc. Interface*, 4, 14, 413–437, 2007.
- [38] Y. Ikada, Challenges in tissue engineering, *J. R. Soc. Interface*, 3, 10, 589–601, 2006.
- [39] S. Pineda and H. Rojas, Sustitutos cutáneos bioingenierizados para el tratamiento de heridas cutáneas difíciles de curar, *Rev. Chil. Derm.*, 31, 2, 145–150, 2015.
- [40] R. Skalak and C. Fox, Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken, in *Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken Tissue engineering (UCLA Symposia on molecular and cellular biology, New series)*, New York: Garland Science, 1988, 307–311.
- [41] B. Alexander and J. Leor, Tissue Engineering – The Bladder, in *Stem cell and gene-based therapy*, 1°, Londres: Springer, 2006, 225–227.
- [42] V. Pérez, I. Carreño, A. Romero, and G. Antonio, Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, *Uso biopolímeros para la Elabor. andamios con Apl. en Ing. tisular*, 6, 8, 177–181, 2017.
- [43] R. Lanza, J. Vacanti, and R. Langer, Part 4. Biomaterials in tissue engineering, in *Principles*

of tissue engineering, 5th ed., USA: Academic Press, 2020, 273–286.

- [44] K. Vig, A. Chaudhari, S. Tripathi, S. Dixit, R. Sahu, S. Pillai, et al., Advances in skin regeneration using tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 4, 789, 2017.
- [45] A. Halim, T. Khoo, and S. Mohd Yussof, Biologic and synthetic skin substitutes: An overview, *Indian J. Plast. Surg. Off. Publ. Assoc. Plast. Surg. India*, 43, 1, 23–28, 2020.
- [46] W. Bradford, S. Daane, M. Zakhireh, and K. L. Carroll, Human skin allograft used to treat open wounds after club foot release, *Ann. Plast. Surg.*, 51, 6, 593–7, 2003.
- [47] R. Nathoo, N. Howe, and G. Cohen, Skin substitutes: An overview of the key players in wound management, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 7, 10, 44–48, 2014.
- [48] Q. Huang, Y. Zou, M. C. Arno, S. Chen, T. Wang, J. Gao, et al., Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells, *Chem. Soc. Rev.*, 46, 20, 6255–6275, 2017.
- [49] H. Leatrese, K. Byung-Soo, and D. Mooney, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming., *Biomed. Mater.*, 42, 3, 396–402, 1988.
- [50] B. Kim and D. Mooney, Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering, *Trends Biotechnol.*, 16, 224–230, 1998.
- [51] R. Thomson, M. Wake, M. Yaszemski, and A. Mikos, Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs BT - Biopolymers II, 1995, 245–274.
- [52] W. Michaeli, W. Frings, H. Höcker, and U. Berghaus, Reactive Extrusion of Styrene Polymers, *Int. Polym. Process.*, 8, 4, 308–318, 1993.
- [53] M. Widmer, P. Gupta, L. Lu, R. Meszlenyi, G. Evans, K. Brandt, et al., Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration., *Biomaterials*, 19, 21, 1945–1955, 1998.
- [54] V. Jacobs, R. Anandjiwala, and M. Maaza, The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 115, 5, 3130–3136, 2010.
- [55] P. Webb, A review of rapid prototyping (RP) techniques in the medical and biomedical sector, *J. Med. Eng. Technol.*, 24, 4, 149–153, 2000.
- [56] V. Reyna, Efecto de diferentes métodos de entrecruzamiento sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de andamios de quitosano-colágeno, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2019.
- [57] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 3, 5517–5527, 2015.
- [58] G. Meisenberg, Capítulo 2. Introducción a la estructura de las proteínas, in *Principios de bioquímica médica*, 4º., España: Elsevier, 2018, 201–213.

- [59] A. Viidik, C. C. Danielsen, and H. Oxlund, On fundamental and phenomenological models, structure and mechanical properties of collagen, elastin and glycosaminoglycan complexes, *Biorheology*, 19, 3, 437–451, 1982.
- [60] J. Park and J. Bronzino, Section 3. Polymeric Biomaterials, in *Biomaterials: Principles and Applications*, 2^o., New York: CRC PRESS, 2003, 55–79.
- [61] F. Song, K. Wisithphrom, J. Zhou, and L. Windsor, Matrix metalloproteinase dependent and independent collagen degradation, *Front. Biosci.*, 11, 3100–3120, 2006.
- [62] S. Gorgieva and V. Kokol, Chapter 2. Collagen VS Gelatine-Based biomaterials and their biocompatibility: Review and perspectives, in *Biomaterials applications for nanomedicine*, 2^o., InTech, 2011, 17–39.
- [63] C. Lee, A. Singla, and Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.*, 221, 1, 1–22, 2001.
- [64] S. Shin, I. Muhammad, S. Fazli, H. Kang, Y. Lim, R. Lee, et al., Alginate–marine collagen–agarose composite hydrogels as matrices for biomimetic 3D cell spheroid formation, *RSC Adv.*, 52, 46952–46965, 2016.
- [65] Y. Zhang, D. Zhou, J. Chen, X. Zhang, X. Li, W. Zhao, et al., Biomaterials based on marine resources for 3D bioprinting applications, *Mar. Drugs*, 17, 10, 555–37, 2019.
- [66] L. Salvatore, N. Gallo, M. Natali, A. Terzi, A. Sannino, and M. Madaghiele, Mimicking the hierarchical organization of natural collagen: Toward the development of ideal scaffolding material for tissue regeneration, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, 1, 1–32, 2021.
- [67] S. Ahn, Y. Koh, and G. Kim, A three-dimensional hierarchical collagen scaffold fabricated by a combined solid freeform fabrication (SFF) and electrospinning process to enhance mesenchymal stem cell (MSC) proliferation, *Mater. Sci.*, 20, 6, 1–7, 2010.
- [68] C. Hernández and R. Gómez González, Obtención de andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio, *Rev. Cuba. Ing.*, 7, 3, 15–24, 2016.
- [69] G. Cunniffe and F. O’Brien, Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine, *JOM J. Miner. Met. Mater. Soc.*, 63, 4, 66–73, 2011.
- [70] S. Vigneswari, V. Murugaiyah, G. Kaur, H. Abdul Khalil, and A. Amirul, Biomacromolecule immobilization: grafting of fish-scale collagen peptides onto aminolyzed P(3HB-co-4HB) scaffolds as a potential wound dressing., *Biomed Mater.*, 11, 5, 2016.
- [71] P. Pal, P. Kumar, P. Dashich, B. Das, P. Prasana, and D. Moulik, Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin., *Int. J. Biol. Macromol.*, 93, 1507–1518, 2016.
- [72] S. Ullah, I. Zainol, R. Chowdhury, and M. Fauzi, Development of various composition

- multicomponent chitosan/fish collagen/glycerin 3D porous scaffolds: Effect on morphology, mechanical strength, biostability and cytocompatibility, *Int. J. Biol. Macromol.*, 111, 158–168, 2018.
- [73] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, and J. Czernuszka, Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication, *Biomaterials*, 24, 8, 1487–1497, 2013.
- [74] A. Lode, M. Meyer, S. Brüggemeier, B. Paul, H. Baltze, M. Schröpfer, et al., Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions., *Biofabrication*, 8, 1, 150–153, 2016.
- [75] A. Korn, S. Fearheller, and E. Filachoine, Glutaraldehyde: Nature of the reagent, *J. Mol. Biol.*, 65, 3, 525–529, 1972.
- [76] M. Jastrzebska, R. Wrzalik, A. Kocot, J. Zalewska-Rejdak, and B. Cwalina, Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue, *J. Biomater. Sci.*, 14, 2, 185–197, 2003.
- [77] M. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, and K. Sheikh, Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement, *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 6, 741–771, 1987.
- [78] H. Lee, L. Lynn, D. Cheung, and M. Nimni, Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 9, 1185–1201, 1990.
- [79] K. Adamiak and A. Sionkowska, Current methods of collagen cross-linking: Review, *Int. J. Biol. Macromol.*, 161, 550–560, 2020.
- [80] E. Miller and R. Kent Rhodes, Chapter 2. Preparation and characterization of the different types of collagen, in *Methods in Enzymology*, 82, New York: Academic Press, 1982, 33–64.
- [81] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 5259, 680–685, 1970.
- [82] J. Quijano, Elaboración de andamios electrohilados de gelatina para posible uso en ingeniería tisular para piel., Universidad Autonoma de Yucatán (UADY), 2020.
- [83] P. Muñoz, O. Rivera, B. Mendoza, J. Claudio, J. Mata, I. Delgadillo, et al., Design of silica-oligourethane-collagen membranes for inflammatory response modulation: Characterization and polarization of a macrophage cell line, *Macromol. Biosci.*, 18, 9, 1800099–11, 2018.
- [84] C. Galindo, C. Cortés, and L. Montell, Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas, *Nutr. Hosp.*, 29, 6, 1388–1393, 2014.

- [85] B. Pateiro and W. González, Multivariate partially linear models, *Elsevier*, 76, 14, 1543–1549, 2006.
- [86] D. Yu, C. Chi, B. Wang, G. Ding, and Z. Li, Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), *Chin. J. Nat. Med.*, 12, 9, 712–720, 2014.
- [87] L. Qiu, B. Wang, S. Zou, Q. Wang, and L. Zhang, Isolation and characterization of collagen from the jellyfish *Nemopilema nomurai*, *J. Pharm. Pract.*, 38, 6, 509–515, 2020.
- [88] I. Bae, K. Osatomi, A. Yoshida, K. Osako, A. Yamaguchi, and K. Hara, Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes, *Food Chem.*, 108, 1, 49–54, 2008.
- [89] V. Oliveira, R. Neri, F. Monte, N. Roberto, H. Costa, C. Assis, et al., Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: Structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation, *J. Mol. Struct.*, 1176, 751–758, 2019.
- [90] A. Abreu, Estudio del efecto del grado de entrecruzamiento de gelatina electrohilada en su resistencia a la degradación, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), 2017.
- [91] M. Vahidi, M. Frounchi, and S. Dadbin, Porous gelatin/poly(ethylene glycol) scaffolds for skin cells, *Soft Mater.*, 15, 1, 95–102, 2017.
- [92] Y. Cao, J. Vacanti, K. Paige, J. Upton, and C. Vacanti, Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear, *Plast. Reconstr. Surg.*, 100, 2, 297–302, 1997.
- [93] H. Jeong, J. Venkatesan, and S. Kim, Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 18, 6, 1185–1191, 2013.
- [94] J. Muyonga, C. Cole, and K. Duodu, Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chem.*, 85, 1, 81–89, 2004.
- [95] I. Fernández, N. Rodríguez-Fuentes, L. León-Deniz, L. Alcántara Quintana, J. M. Cervantes-Uc, W. A. Herrera Kao, et al., Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*, 111, 110748, 2020.
- [96] M. Chang and J. Tanaka, FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials*, 23, 24, 4811–4818, 2002.
- [97] ISO, ISO-10993-5: Tests for in vitro cytotoxicity. 9–10, 2009.
- [98] M. van Luyn, P. van Wachem, L. Damink, P. Dijkstra, J. Feijen, and P. Nieuwenhuis, Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure

to human fibroblasts, *Biomaterials*, 13, 14, 1017–1024, 1992.

- [99] J. Gough, C. Scotchford, and S. Downes, Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis, *J. Biomed. Mater. Res.*, 61, 1, 121–130, 2002.
- [100] C. Schmidt and J. Baier, Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 22, 2215–2231, 2000.
- [101] T. Hasegawa, N. Chosa, T. Asakawa, Y. Yoshimura, and A. Asakawa, Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells derived from human deciduous teeth in vitro, *Exp. Ther. Med.*, 1, 3, 477–480, 2010.
- [102] F. Guo, D. E. Carter, A. Mukhopadhyay, and A. Leask, Gingival fibroblasts display reduced adhesion and spreading on extracellular matrix: A possible basis for scarless tissue repair, *PLoS One*, 6, 11, 27097–9, 2011.
- [103] H. Yamaba, M. Haba, M. Kunita, T. Sakaida, H. Tanaka, Y. Yashiro, et al., Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging, *Exp. Dermatol.*, 25, 3, 45–51, 2016.