

Evaluación de las propiedades mecánicas de hidrogeles a base de colágeno de piel de tilapia con potencial uso en el tratamiento de quemaduras de segundo grado

Presentado por:

David Fernando Ramírez Rojas

Paula Juliana Ramírez Sánchez

Javier Andrés Santos Soto

Códigos:

U00122100

U00122305

U00121700

Director:

PhD. Víctor Alfonso Solarte David

Co-Director:

PhD. Silvia Milena Becerra Bayona

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa De Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

A nuestros directores de proyecto de grado, PhD. Víctor Alfonso Solarte y PhD. Silvia Milena Becerra, por su constante apoyo y compromiso tanto con el presente proyecto como con cada uno de los integrantes de este, por creer en nuestro éxito, por guiarnos y por brindarnos buenos consejos para mejorar como personas y como profesionales. Muchas gracias por el tiempo invertido, siempre fueron y siguen siendo, un gran ejemplo a seguir.

Todos los integrantes

A la memoria de mi madre, quien en vida anheló tanto el ver culminada esta etapa de mi vida; a mis padres y hermanos, quienes me guiaron y me brindaron todo su amor y sacrificio para que pudiera cumplir esta meta. A ti, mi estrellita, que ahora eres parte de mi vida, me das tu apoyo incondicional y me animas a superarme cada día.

David Ramírez Rojas

A mi madre, por su apoyo incondicional a lo largo de este camino recorrido, por creer en mí y hacer todo lo posible para que tuviera lo necesario para completarlo. Gracias por estar para mí y permitirme dar lo mejor, es un orgullo poderte brindar este logro.

Paula Ramírez

A mi familia, las palabras no pueden expresar lo agradecido que estoy con mi madre y mi padre por todos los sacrificios que han hecho por mí, su amor y guía están conmigo en todas las metas que me propongo. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

Javier Santos

Resumen

Las quemaduras son lesiones cutáneas que se pueden clasificar de acuerdo con la gravedad en: quemaduras de primer, segundo, tercer y cuarto grado. Los tratamientos actuales para las heridas de primer y segundo grado van desde hidrocoloides hasta hidrogeles y más recientemente se ha optado por el uso de piel de fuentes animales, entre los que se destaca la piel de tilapia (PT) por su alto contenido de colágeno tipo I y su alta biocompatibilidad, sin embargo, este tratamiento presenta algunas limitantes, como el desaprovechamiento del colágeno presente en la misma por la degradación que sufre durante su uso clínico y la deshidratación que sufre al ser aplicada por cierto periodo de tiempo (lo que genera una deshidratación también de la herida), que conlleva a debilitamiento y rotura de la misma. Lo anterior genera la necesidad de elaborar un tratamiento óptimo que evite la deshidratación de la PT y permita el aprovechamiento del colágeno presente en la misma. Por esta razón, en este estudio se desarrollaron hidrogeles a base de colágeno de PT a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml, debido a que este tipo de andamios tienen una gran capacidad de retención de agua que permite mantener un entorno de herida hidratado y a su vez, al modular la concentración, se genera un aprovechamiento del colágeno. Las propiedades estructurales como el módulo de compresión, el hinchamiento y la contracción se evaluaron a partir de ensayos de compresión, la relación del cambio de peso y la relación volumétrica de hinchamiento, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que los hidrogeles desarrollados, podrían tener un potencial uso en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado, dado que las propiedades mecánicas obtenidas se asemejan a las de las capas de la piel afectadas por este tipo de heridas, también dado que estos hidrogeles tienen una alta capacidad de retención de agua, no son citotóxicos y podrían favorecer la proliferación celular, por lo que es posible conjeturar que pueden llegar a favorecer la cicatrización de quemaduras de primer y segundo grado.

Palabras claves: Colágeno, hidrogeles, pruebas mecánicas, quemaduras, tilapia.

Abstract

Burns are skin lesions that can be classified according to his severity into first-, second-, third- and fourth-degree burns. Current treatments for first- and second-degree wounds range from hydrocolloids to hydrogels, recently the use of skin from animal sources has been chosen, among these the tilapia skin (PT, for its acronym in Spanish) for its high content of type I collagen and its high biocompatibility, however, this treatment has some limitations, such as the wasting of collagen type I and its high biocompatibility. However, this treatment has some limitations, such as the waste of the collagen present in the skin due to the degradation while its clinical use and the dehydration that occurs when is applied for a certain period (which also dehydrates the wound), leading to weakening and breakage of the wound. This generates the need to develop an optimal treatment that avoids dehydration of the PT and allows the use of the collagen present in it. For this reason, in this study, hydrogels based on PT collagen were developed at concentrations of 1.5, 3 and 5 mg/ml, due to the fact that this type of scaffolds have a high-water retention capacity that allows maintaining a hydrated wound environment and, also, by modulating the concentration, a collagen utilization is generated. Structural properties such as compressive modulus, swelling and shrinkage were evaluated from compression tests, weight change ratio and volumetric swelling ratio, respectively. The results obtained shows that the developed hydrogels could have a potential use in the treatment of first and second degree burns, given that the mechanical properties obtained resemble those of the skin layers affected by this type of wounds, also given that these hydrogels have a high water retention capacity, are not cytotoxic and could favor cell proliferation, so it is possible to conjecture that they could favor the healing of first and second degree burns.

Keywords: Collagen, hydrogels, mechanical testing, burns, tilapia.

Tabla de Contenido

Capítulo 1. Problema U Oportunidad	11
Introducción	11
Planteamiento Del Problema.....	12
Justificación	13
Pregunta Problema	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos.....	14
Limitaciones Y Delimitaciones.....	15
Capítulo 2. Marco Teórico.....	15
Quemaduras	15
Clasificación De Las Quemaduras.....	16
Fisiopatología Local De Las Heridas Por Quemadura	16
Apósitos Para Tratamiento De Quemaduras.....	18
Apósitos De Colágeno	19
Tilapia	20
Morfología De La Piel De Tilapia	20
Tilapia Roja.....	21
Colágeno	23
Estructura	23
Fuentes Y Aplicaciones	25
Proceso De Extracción Del Colágeno.....	26

Hidrogeles	30
Hidrogeles A Base De Colágeno	31
Fabricación De Hidrogeles De Colágeno	31
Capítulo 3. Estado Del Arte	32
Capítulo 4. Metodología	37
Extracción Del Colágeno De Piel De Tilapia Roja.....	37
Preparación De La PT.....	38
Blanqueamiento	39
Desengrasado	39
Hidrólisis Básica.....	39
Extracción Ácida.....	39
Precipitación Salina	40
Diálisis	40
Liofilización.....	40
Caracterización Del Colágeno Extraído De La PT.....	41
Rendimiento De Extracción De Colágeno Solubilizado En Ácido (ASC).....	41
Espectro De Absorción Ultravioleta (UV-VIS).....	41
Espectroscopia Infrarroja Por Transformada De Fourier Con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	42
Preparación De Hidrogeles	43
Cálculos Previos.....	43
Proceso De Preparación De Hidrogeles	44
Pruebas Mecánicas	44

Pruebas De Hinchamiento.....	46
Pruebas De Contracción.....	46
Prueba de Citotoxicidad.....	47
Prueba de proliferación de fibroblastos	47
Prueba de lixiviado	49
Análisis Estadísticos	50
Capítulo 5. Resultados Y Análisis De Resultados	51
Resultados	51
Extracción De Colágeno De La Piel De Tilapia Roja.....	51
Espectro de absorción ultravioleta (UV-VIS).....	59
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	60
Síntesis y fabricación de los hidrogeles de colágeno.....	63
Caracterización mecánica de los hidrogeles de colágeno	66
Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de colágeno de PT	71
Contracción de los hidrogeles de colágeno.....	75
Evaluación de la viabilidad celular en productos derivados del colágeno de PT ...	76
Análisis De Resultados	78
Capítulo 6. Conclusiones Y Recomendaciones	88
Referencias.....	90
Anexos	104

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Fases de cicatrización de heridas.</i>	17
Figura 2 <i>Sección tridimensional de la piel de un pez.</i>	21
Figura 3 <i>Tilapia Roja.</i>	21
Figura 4 <i>Distribución de colágeno en la piel de la tilapia roja. Microscopia óptica de 10x10 aumentos.</i>	22
Figura 5 <i>Fibras de colágeno.</i>	24
Figura 6 <i>Diagrama de flujo del proceso estandarizado de extracción de colágeno soluble en ácido (ASC) a partir de la piel de tilapia roja.</i>	38
Figura 7 <i>Fotografías representativas del montaje y la realización de la prueba FTIR-ATR.</i>	43
Figura 8 <i>Platos de compresión utilizados en el banco de carga ElectroForce 3500 Serie 3 para las PMC.</i>	45
Figura 9 <i>Distribución de los grupos de las pruebas de citotoxicidad en una placa de 96 pozos.</i>	48
Figura 10 <i>Protocolos de extracción de colágeno de piel de tilapia realizados.</i>	51
Figura 11 <i>Comparación del filtrado luego de la extracción ácida para 2 tamaños de piel.</i>	52
Figura 12 <i>Comparación de las muestras luego de la extracción para cuando el pH se neutralizó o no.</i>	53
Figura 13 <i>Comparación entre dos relaciones de ácido/piel para el proceso de extracción ácida.</i>	54
Figura 14 <i>Proceso de extracción de colágeno de la piel de tilapia roja.</i>	56
Figura 15 <i>Pieles de tilapia roja húmedas y liofilizadas.</i>	57
Figura 16 <i>Rendimiento de extracción de colágeno de piel de tilapia roja.</i>	58

Figura 17 <i>Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS) del colágeno obtenido.....</i>	59
Figura 18 <i>Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS) del colágeno obtenido para las frecuencias de onda de 190 a 260 nm.....</i>	60
Figura 19 <i>Espectro FTIR-ATR del colágeno liofilizado extraído de la PT.</i>	61
Figura 20 <i>Resultado de la búsqueda en la base de datos de BioRad para la identificación de la muestra analizada (colágeno liofilizado).</i>	62
Figura 21 <i>Solución realizada a temperatura ambiente. Mezcla de colágeno, NaOH, PBS y agua destilada.....</i>	64
Figura 22 <i>Hidrogeles de 1.5, 3 y 5 mg/ml en placa de 48 pozos.</i>	65
Figura 23 <i>Hidrogeles de colágeno a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml.</i>	65
Figura 24 <i>Fotografías representativas del montaje y la realización de las PMC.</i>	67
Figura 25 <i>Gráfica de esfuerzo vs deformación representativa para un hidrogel de colágeno. ...</i>	68
Figura 26 <i>Módulo de compresión de los hidrogeles de colágeno a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml.....</i>	69
Figura 27 <i>Gráfica representativa de la curva de esfuerzo vs deformación para las PMT.....</i>	70
Figura 28 <i>Fotografía representativa del montaje y la realización de las PMT.</i>	71
Figura 29 <i>Relación de hinchamiento de hidrogeles de colágeno.</i>	72
Figura 30 <i>Contenido de agua y proteínas de los hidrogeles de colágeno.</i>	73
Figura 31 <i>Relación de rehinchamiento de los hidrogeles de colágeno.</i>	75
Figura 32 <i>Prueba de contracción: cambios de volumen (A) y peso (B).</i>	75
Figura 33 <i>Viabilidad celular del lixiviado de hidrogeles de PT y del colágeno de PT diluido en ácido.....</i>	77

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Clasificación de las quemaduras según la profundidad de las heridas.</i>	16
Tabla 2 <i>Zonas de afectación tisular en una quemadura.</i>	18
Tabla 3 <i>Comparación de la información recolectada sobre el proceso de extracción de Colágeno Soluble en Ácido (ASC, por sus siglas en inglés) de PT.</i>	26
Tabla 4 <i>Condiciones experimentales del espectrómetro FTIR para la ejecución de la prueba. ..</i>	42
Tabla 5 <i>Comparación entre el peso de los precipitados obtenidos tras diferentes concentraciones de NaCl al 12%.</i>	55
Tabla 6 <i>Peso húmedo y seco de pieles de tilapia roja.</i>	57
Tabla 7 <i>Localización de los picos principales del espectro FTIR-ATR del colágeno liofilizado.</i>	61
Tabla 8 <i>Comparación entre los números de onda pico observados en el espectro FTIR del HLG de BioRad y en el espectro FTIR del colágeno liofilizado.....</i>	63

Capítulo 1. Problema U Oportunidad

Introducción

Según la OMS, las quemaduras se catalogan como un problema de salud pública a nivel mundial debido a que cada año alrededor de 11 millones de personas requieren atención médica para el tratamiento de estas. Existen diferentes tipos de tratamientos para estas afecciones, entre los que destacan alternativas innovadoras como la PT, las cuales han presentado buenos resultados al utilizarse como apósitos para el tratamiento de quemaduras superficiales y/o profundas de segundo grado en pacientes pediátricos, adultos y animales por contener grandes cantidades de colágeno tipo I con una estructura morfológica similar al presente en la piel humana. Sin embargo, este tipo de apósito ha presentado ciertas limitaciones, como la degradación del colágeno presente en la PT y la deshidratación de la PT y posteriormente de la herida, lo cual demuestra que existe una necesidad de buscar nuevas alternativas que brinden un mayor aprovechamiento de este colágeno y eviten la deshidratación de la herida durante su uso clínico. Atendiendo a la ya mencionada necesidad, se evaluaron las características de módulo de compresión, relación de hinchamiento, contracción y citotoxicidad, de hidrogeles de colágeno de PT a diferentes concentraciones, como también se estandarizó el proceso de extracción de colágeno de PT acorde a las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de tejidos de la Universidad Autónoma de Bucaramanga – UNAB y se caracterizó el colágeno extraído con técnicas de espectrofotometría como UV-VIS y FT-IR. Lo anterior, con la finalidad de evaluar el potencial uso de los hidrogeles de colágeno de PT en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado.

Planteamiento Del Problema

Las quemaduras ocasionan aproximadamente 180000 muertes al año, una cifra considerablemente pequeña si se compara con los 11 millones de personas que anualmente a nivel mundial requieren asistencia médica para el tratamiento de heridas relacionadas con las quemaduras (OMS, 2018). En el Hospital Universitario de Santander, uno de los centros para quemados más grandes de Santander, Colombia, se reciben al año alrededor de 270 pacientes por quemaduras, con una mortalidad del 1.85% (Ramírez Blanco, Ramírez Rivero, & Díaz Martínez, 2017).

Dependiendo de la gravedad de la quemadura, existen diferentes tratamientos para la misma, por ejemplo, las quemaduras de primer y segundo grado suelen ser tratadas con agentes tópicos farmacéuticos de duración prolongada, sin embargo, estos tratamientos en ocasiones causan la exposición de la herida al ambiente al momento de realizar el desbridamiento de los mismos, lo que aumenta el riesgo de crecimiento microbiano, además de dejar una cicatriz visible (Hashmi & Haith, 2019). Es por ello que en los últimos años se ha incursionado en el uso de la piel animal para el tratamiento de heridas de segundo grado, entre ellas alternativas innovadoras como es la piel de tilapia (PT), producto de residuos agroindustriales (Z. Bao et al., 2018), sobresaliendo frente a las demás pieles de otros pescados por su alto contenido de colágeno (que tiene una alta biocompatibilidad (Serrano Gaona, 2011)), su alta adherencia a la herida y su capacidad de acelerar la cicatrización (Jingjing Chen et al., 2019). No obstante, se presentan dos problemas primordiales con el uso de este tratamiento: el primero es el desaprovechamiento del colágeno presente en la PT que se da durante su uso clínico debido a la adhesión de material orgánico y de estructuras celulares formadas en la herida (W. Bao et al., 2020) que se encargan de degradar el colágeno de la PT (Lima Verde et al., 2021); el segundo problema viene dado por la

deshidratación que sufre la PT luego de haber sido aplicada por un cierto periodo de tiempo (alrededor de 12 días), dado que se requiere una rehidratación que produce debilitamiento, rotura y deslizamiento de la PT aún en contacto con la herida (Lima-Junior et al., 2019), haciendo que el apósito pierda efectividad y, en ocasiones, se deba desbridar la herida para reemplazar la PT (Edmar Maciel Lima Júnior, 2017). De lo antes mencionado, se evidencia la necesidad de nuevas alternativas de tratamiento para quemaduras, que permitan lograr un mejor aprovechamiento del colágeno de PT e impedir que se produzca una deshidratación de la herida.

Justificación

Actualmente existe la necesidad de desarrollar nuevas alternativas que permitan un mejor aprovechamiento del colágeno presente en la PT, usada para tratar quemaduras superficiales y/o profundas de segundo grado (Lima Verde et al., 2021). Entre los nuevos enfoques sobresale la aplicación de la ingeniería de tejidos dirigida al uso de andamios naturales que estimulan in situ la regeneración celular; facilitan la adhesión, la migración y diferenciación celular; forman la matriz extracelular y permiten la difusión de nutrientes celulares (Roldán Vasco, 2016).

Entre los diferentes tipos de andamios se encuentran los hidrogeles, los cuales se caracterizan por su capacidad de proporcionar un entorno de cicatrización húmedo (Fan et al., 2014), adherirse estrechamente a la herida (B. Ge et al., 2020), facilitar el intercambio gaseoso, actuando como barrera protectora contra los microorganismos, eliminar el exceso de exudados, y con la posibilidad de ser retirados al incluso degradarse en la herida (Fan et al., 2014).

En este contexto, el colágeno presente en la PT puede emplearse como una alternativa innovadora para la formación de hidrogeles, que sirvan como andamios que aceleren la reparación tisular (Serrano Gaona, 2011); dichos hidrogeles mantendrían hidratada la herida, no la expondría a infecciones, no se presentaría pérdidas considerables de colágeno y no se requeriría el

desbridamiento de este apósito (este se degradaría durante su uso clínico). Por lo tanto, el presente proyecto busca evaluar las propiedades mecánicas y de hinchamiento de los hidrogeles fabricados a partir del colágeno extraído de la PT, evaluando así su potencial uso como apósitos en el tratamiento de quemaduras de segundo grado.

Pregunta Problema

¿Cuáles son las propiedades mecánicas y de hinchamiento que presentan los hidrogeles a base de colágeno de piel de tilapia y cómo estas permiten establecer su aplicación en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado?

Objetivo General

Evaluar las propiedades mecánicas y capacidad de hinchamiento de hidrogeles sintetizados a partir de colágeno de piel de tilapia, mediante pruebas mecánicas y de hinchamiento para la determinación de su potencial uso en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado.

Objetivos Específicos

1. Obtener proteínas de la PT, principalmente colágeno, mediante un protocolo de extracción previamente establecido, para la caracterización proteica y posterior uso en el desarrollo de hidrogeles.
2. Desarrollar hidrogeles a base de las proteínas previamente extraídas siguiendo una metodología de fabricación, para la determinación de sus propiedades mecánicas y de hinchamiento.
3. Analizar los resultados de las propiedades mecánicas y de hinchamiento obtenidos, mediante una revisión y comparación bibliográfica, para la determinación de su potencial uso en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado.

Limitaciones Y Delimitaciones

La presente investigación se centró en estandarizar un proceso de extracción de colágeno de PT y en fabricar hidrogeles a diferentes concentraciones (1.5, 3 y 5 mg/ml) del colágeno extraído. Asimismo, la investigación se enfocó en evaluar las propiedades físicas y mecánicas de dichos hidrogeles, tales como la capacidad de hinchamiento, de contracción y el módulo de compresión. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno se evaluaron únicamente por medio de ensayos de compresión, dado que el banco de carga utilizado (del Laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la UNAB) no contaba con la resolución suficiente para realizar ensayos de tensión con los hidrogeles fabricados. De igual forma, se llevaron a cabo pruebas preliminares de citotoxicidad con los hidrogeles de colágeno a las concentraciones ya mencionadas. En cuanto a la caracterización proteica, se realizaron pruebas de absorbancia y FTIR para conseguirlo.

Capítulo 2. Marco Teórico

Quemaduras

Las quemaduras son el resultado de un traumatismo químico, térmico, eléctrico o nuclear que induce la desnaturalización de las proteínas tisulares, la producción de edema y/o la pérdida del líquido intravascular, resultando desde una leve afectación de la epidermis hasta la destrucción total de los tejidos implicados (Azcona Barbed, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga a las quemaduras como un problema de salud pública a nivel mundial, ya que ocasionan alrededor de 180000 muertes al año, una cifra considerablemente pequeña si se compara con los 11 millones de personas que sufrieron quemaduras lo suficientemente graves como para requerir atención médica, generando tiempos de hospitalización prolongados,

desfiguraciones y discapacidad, ocasionando estigmatización y rechazo por parte de la sociedad.

(Moctezuma Paz et al., 2015; OMS, 2018)

Clasificación De Las Quemaduras

En la siguiente tabla se reportan las principales características de las quemaduras según el grado de afectación, relacionando el aspecto, la presencia de cicatriz y el proceso de curación.

Tabla 1

Clasificación de las quemaduras según la profundidad de las heridas.

Grado		Zona de afectación	Aspecto	Presencia de cicatriz	Curación
Primer		Epidermis	Enrojecimiento cutáneo, edema mínimo; no hay presencia de flictenas o ampollas.	No	De forma espontánea entre los 3 a 5 días.
Segundo	Superficial	Dermis	Presencia de flictenas, lecho hiperémico y exudativo.	Solamente si hay infección	De forma espontánea entre los 8 a 10 días.
	Profundo	Dermis	El lecho de la quemadura es pálido, rosáceo y seco. No presentan flictenas.	Sí	De forma espontánea entre las 3 a 6 semanas.
Tercero		Tejido subcutáneo	El lecho de la quemadura es seco, blanco-amarillento. En algunas ocasiones hay presencia de vasos trombosados.	Sí	Tratamiento quirúrgico obligado, requiere de injertos.
Cuarto		Musculo	Aspecto blanco o negro.	No hay cicatrización	

Fuente: (García-Espinoza et al., 2020; Ingen-Housz-Oro & Benjoar, 2010; Palao Doménech 2009;

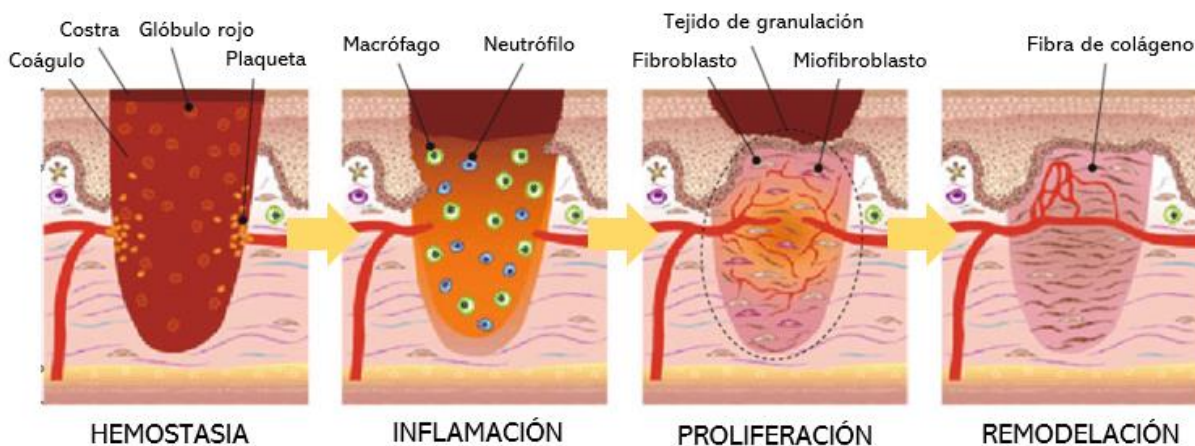
Pérez Boluda, Martínez Torreblanca, Pérez Santos, & Cañadas Núñez, 2011)

Fisiopatología Local De Las Heridas Por Quemadura

En una herida por quemadura, como en otros tipos de heridas, el tejido cutáneo dañado inicia de forma natural el proceso de cicatrización reparando la estructura anatómica afectada; este proceso se ejecuta por medio de cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (observar Figura 1) (Guarín-Corredor, Quiroga-Santamaría, & Landínez-Parra, 2013).

Figura 1

Fases de cicatrización de heridas.



Fuente: modificado de (Kawasumi, Sagawa, Hayashi, Yokoyama, & Tamura, 2013)

En la hemostasia se busca detener la pérdida de sangre mediante la activación plaquetaria y la contracción de los vasos arteriales, que reducen el flujo sanguíneo cercano; estos procesos liberan quimioquinas y factores de crecimiento (FC) que iniciarán la fase inflamatoria, atrayendo células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y linfocitos que se encargarán de destruir los microorganismos infecciosos, fagocitar elementos de desechos presentes en el lugar de la herida y regular la función de reparación del tejido. Posteriormente, en la fase de proliferación se busca regenerar el tejido y cubrir la herida, para ello se estimula la síntesis de componentes de matriz, la creación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la migración de células como fibroblastos (que producirán colágeno, principalmente tipo III, y fibronectina) y enzimas como las metaloproteinasas que permitirán la remodelación de la matriz. La fase de proliferación terminará con el cierre de la herida a causa de la proliferación epitelial y la contracción de los miofibroblastos. Finalmente, en la etapa de remodelación se da una reorganización del contenido proteico de la matriz extracelular, principalmente en el reemplazo del colágeno tipo III por tipo I,

suministrando una estructura más rígida y menos elástica (Tiwari, 2012; Valencia-Gómez, Martel-Estrada, Vargas-Requena, Rodríguez-González, & Olivas-Armendariz, 2016). El proceso de cicatrización puede verse beneficiado por el suministro de colágeno heterólogo al reducir la carga bacteriana de la herida, facilitar la activación de las células inflamatorias, actuar como soporte estructural para los fibroblastos, inducir la vascularización y aportar fuerza tensional al nuevo tejido (Torra i Bou et al., 2000)

En el caso particular de las quemaduras, el proceso de cicatrización se ve afectado por la desnaturalización proteica ocasionada por las altas temperaturas de la quemadura, generando necrosis tisular (García Alonso, 2017). En la siguiente tabla se reportan las zonas de afectación tisular ocasionada por quemaduras, descritas por primera vez en 1953 por el investigador Douglas Jackson.

Tabla 2

Zonas de afectación tisular en una quemadura.

Zona	Ubicación	Contenido celular	Curación
Zona de necrosis	Zona central	No hay células viables	Daño irreversible
Zona de estasis	Rodea a la zona de necrosis	Mezcla de células viables y no viables.	Puede evolucionar a zona de necrosis o a zona de hiperemia según el tratamiento aplicado
Zona de hiperemia	Rodea a la zona de estasis	Mayoritariamente constituido por células viables	Recuperación completa (a menos que se presenten complicaciones)

Fuente: (Jackson, 1953; Teot, Otman, Brancati, & Mittermayr, 2020)

Apósitos Para Tratamiento De Quemaduras

Un apósito es una compresa estéril utilizada para aislar, proteger y optimizar el proceso de cicatrización de heridas al facilitar un ambiente en donde los principios fisiológicos como la oxigenación, circulación sanguínea y la humedad se mantienen para la debida curación del tejido

afectado (Fornes Pujalte, Palomar Llatas, Díez Fornes, Muñoz Mañez, & Lucha Fernandez, 2008).

Un apósito ideal para tratamiento de heridas cutáneas debe cumplir una serie de requisitos como:

- a) Tener capacidad para absorber el exudado;
- b) mantener el entorno húmedo;
- c) permitir el intercambio gaseoso;
- d) ser aislante térmico;
- e) proteger contra las bacterias;
- f) no ser perjudicial para la salud, y
- g) facilidad de retiro.

Los apósitos más utilizados en la actualidad son los hidrogeles, hidrocoloides, hidrofibras, alginatos y los hidrocélulares (Osorio González, 2020).

Apósitos De Colágeno

Los apósitos de colágeno se componen generalmente de colágeno tipo I, proveniente principalmente de fuentes animales como bovinas, equinas, porcinas o aviares. Actualmente, son utilizados en heridas crónicas como úlceras por presión, pie diabético, quemaduras de espesor parcial o total, entre otras (Miranda Altamirano, 2020). Estos apósitos producen un aumento significativo de la producción de fibroblastos (que segregan proteínas de colágeno) que ayudan a captar fibronectina, mantener el ambiente termostático y químico de la herida, preservar macrófagos, leucocitos, fibroblastos y células epiteliales. Además, ayudan en la inhibición del exceso de metaloproteinasas (MMPs), en donde el exceso de estas provocaría una degradación del colágeno.

Tilapia

La tilapia es una especie de peces llamada *Oreochromis spp*, nativos de África y Medio Oriente (Valenzuela Rojo, Lopez-Cervantes, & Sánchez-Machado, 2018). La tilapia es la especie piscícola más cultivada en Colombia alcanzando las 58065 toneladas al año (95% del cual, pertenece a la tilapia roja), cifra considerablemente alta a comparación de otras especies piscícolas como la cachama, trucha o bocachico con 17437, 7110 y 2648 toneladas, respectivamente. (Castillo Campo; Riaño Pacanchique, Vega Vargas, & Chirivi Benavides, 2017)

Morfología De La Piel De Tilapia

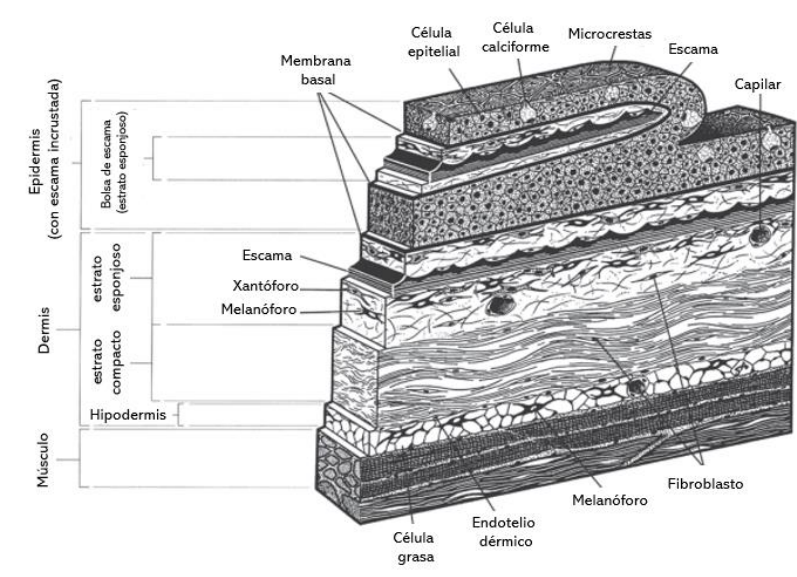
En general, la piel de los peces representa entre el 7 al 8% del peso total del animal, se compone principalmente de dos capas: una epidermis externa y una dermis interna (ver Figura 2); las dos capas difieren en origen, estructura y función. (Elliott, 2011)

La epidermis es esencialmente de estructura celular, contiene células epiteliales (también conocidas como células de Malpighi), células calciformes y otros tipos de células que varían entre los diversos taxones de peces; esta capa tiene un aspecto transparente debido a que contiene poco o nada de pigmento. (Elliott, 2011)

La dermis se separa de la epidermis gracias a una membrana basal acelular (también conocida como lamina basal), contiene vasos sanguíneos, nervios, escamas, células pigmentarias (también conocidas como cromatóforos, se destacan los xantóforo y melanóforos) y tejido adiposo (grasa); se compone de dos subcapas: una subcapa compacta o esponjosa, que está formada por células pigmentarias, leucocitos, escamas, y una fina red de colágeno que se dispone de forma paralela a la capa papilar; y una subcapa gruesa, formada por una densa matriz de colágeno entrelazada (Liñan Cabello, 2014; Sierra et al., 2003). La dermis se separa del músculo esquelético subyacente por la hipodermis, que se compone en gran parte de tejido adiposo (grasa).

Figura 2

Sección tridimensional de la piel de un pez.



Fuente: adaptado de (Elliott, 2011)

Tilapia Roja

La tilapia roja es el resultado de múltiples cruces entre cuatro especies de tilapia:

Oreochromis mossambicus, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Oreochromis hornorum*,

en las que se buscó adicionar la mejor característica de cada una, siendo estas: coloración roja, resistencia y reproducción en diferentes medios (pH, niveles de oxígeno, temperaturas), tamaño y peso (Castillo Campo, 2012).

Figura 3

Tilapia Roja.



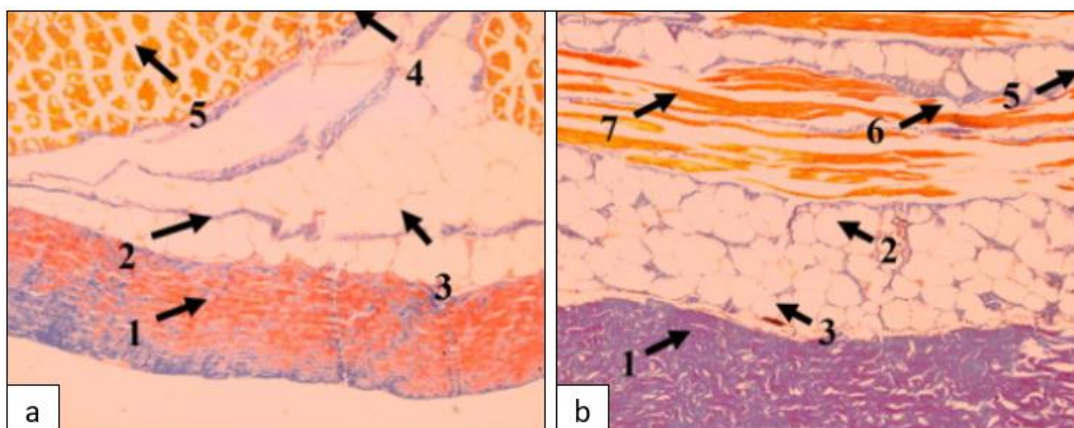
Fuente: Dreamstime. Imagen libre de derechos.

La proteína más abundante en la piel de los peces es el colágeno tipo I (H. A.-O. Jafari et al., 2020), y se estima que, en la piel de la tilapia roja, se encuentra alrededor de 24% de proteínas con respecto al contenido total de la piel, el resto se compone de agua (71%), grasas y cenizas (Nurilmala, Suryamarevita, Husein Hizbullah, Jacobeb, & Ochiai, 2021). En la Figura 4 se muestra la distribución del colágeno en la piel de la tilapia roja en la región dorsal y ventral del animal.

El colágeno de PT es una de las fuentes que presenta mayor rendimiento, en comparación con las escamas y huesos de este mismo animal. Este colágeno proveniente de la PT es principalmente colágeno tipo I, el cual tiene una composición muy similar al que está presente en la piel humana, cuya diferencia más alta se presenta en el contenido de glicina con apenas una variación del 2.6%; los aminoácidos restantes, como la alanina, arginina, leucina y la prolina presentan variaciones inferiores al 1%. De acuerdo con las características antes mencionadas, el colágeno que se obtiene de la PT es apto para el uso clínico, siendo en este caso una alternativa terapéutica para el tratamiento de quemaduras, sin que se genere alguna respuesta inmune en el cuerpo (Serrano Gaona, 2011).

Figura 4

Distribución de colágeno en la piel de la tilapia roja. Microscopia óptica de 10x10 aumentos.



Nota. a) piel dorsal, b) piel ventral. 1, estrato compacto; 2, células grasas; 3, límite entre capas de grasa; 4, fibra de colágeno; 5, miómero (músculo esquelético) de transferencia; 6, misio (músculo); 7, miómero (músculo esquelético) longitudinal. Fuente: (Nurilmala et al., 2021).

Colágeno

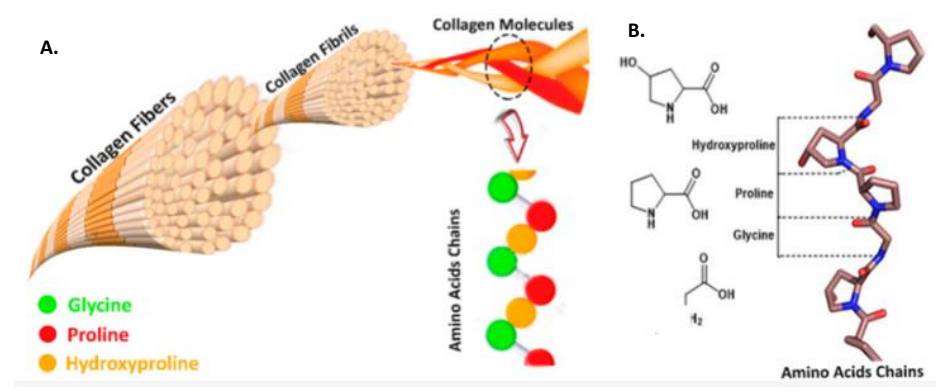
Estructura

En los animales pluricelulares el colágeno es la proteína que más predomina en la matriz extracelular, ayuda a mantener la estructura de los tejidos animales, y les confiere una mayor fuerza, resistencia y elasticidad (Serrano Gaona, 2011), existen alrededor de 28 tipos de colágeno, de los cuales un 80-90% del presente en los organismos es colágeno tipo I, II y III, entre los que el más abundante suele ser el colágeno tipo I, que se encuentra en la piel, órganos y tendones. El colágeno que es producido por los organismos es endógeno (es sintetizado de forma natural) y está constituido por una triple hélice, gracias a la cual presenta una alta resistencia a la tracción y una excelente capacidad para retener agua (Meisenberg, 2017). Esta triple hélice, como se puede observar en la Figura 5, está compuesta de aminoácidos, en donde cada cadena de polipéptidos es levógira (orientada a la izquierda) y está constituida de la forma Glicina-X-Y, en donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido, pero usualmente son prolina (28%) e hidroxiprolina (38%) (Shoulders & Raines, 2009), respectivamente. Estas cadenas que conforman la triple hélice se estabilizan entre sí gracias a la glicina, ya que este aminoácido tiene una cadena lateral de hidrógeno que permite crear enlaces entre las hélices, los cuales estabilizan las cadenas alfa y hacen que la molécula resista al ataque de otras, es por ello que es necesario que cada tercer aminoácido sea un residuo de glicina, estos enlaces que se generan entre los hidrógenos de las cadenas laterales se forman en su mayoría entre protones amidas y oxígenos carbonilo, sin embargo, aunque la glicina juega un papel fundamental en la estabilidad de la triple hélice, tanto

la prolina como la hidroxiprolina cumplen funciones importantes con el mismo objetivo, ya que, por ejemplo, la hidroxiprolina en la posición X favorece la estabilidad de la hélice a través de la formación de enlaces entre grupos -OH (H. Jafari et al., 2020). Las moléculas de colágeno definen las propiedades materiales del mismo y establecen cómo se altera la conformación del mismo en respuesta a una fuerza mecánica, a su vez, proporcionan señales para el proceso de degradación del colágeno. Cuando se agrupan varias moléculas jerárquicamente se forman estructuras denominadas fibrillas que al agruparse forman estructuras denominadas fibras (observar sección A de la Figura 5), las cuales previenen el mal funcionamiento mecánico prematuro, brindan soporte estructural a los órganos del cuerpo, aseguran la elasticidad, firmeza y fuerza necesaria para la locomoción y la regeneración de los tejidos. Estas fibras, se desarrollan a partir del autoensamblaje del colágeno, proceso que se lleva a cabo mediante interacciones no covalentes y puede verse influido por algunas condiciones fisicoquímicas como el pH, el tipo o la concentración del colágeno, la temperatura y la sal, entre otros.

Figura 5

Fibras de colágeno.



Nota. (A) Contenido aproximado de colágeno en diferentes tejidos. (B) Estructura de fibras de colágeno, fibrillas, hélices triples de cadenas alfa y residuos de aminoácidos, 4-hidroxiprolina (Hyp), glicina (Gly) y prolina. Adaptado de Fuente: (H. Jafari et al., 2020)

La organización estructural jerárquica de las moléculas de colágeno se puede perder por un proceso denominado desnaturalización, el cual es un proceso irreversible, que conlleva a la formación de cadenas enrolladas al azar, que se denominan gelatina. Esta desnaturalización se puede dar por tratamientos químicos o térmicos, cuando se excede la temperatura de transición hélice-espiral (Serrano Gaona, 2011).

Tanto la síntesis como la degradación del colágeno son influenciadas por la carga mecánica, de forma que las moléculas de colágeno, para responder a dichas cargas mecánicas, deben alterar su estructura deformándose significativamente, lo que provoca señales que alteran sus propiedades biológicas (Chang & Buehler, 2014). Una de sus propiedades esenciales es la elasticidad y la capacidad de modificar su estructura para brindar dicha propiedad, esta capacidad elástica está dada por el módulo de Young, que para una molécula de colágeno es entre 3-7 GPa (Chang & Buehler, 2014).

Fuentes Y Aplicaciones

Gracias a la degradación de las moléculas de colágeno, esta proteína es esencial para muchos procesos biológicos y patológicos, como la cicatrización de heridas, la morfogénesis y la remodelación de tejidos (Chang & Buehler, 2014). Esta proteína es muy importante y de gran utilidad debido a sus características esenciales, entre las que se incluye la estabilidad térmica, la resistencia mecánica y la capacidad de interactuar con diferentes biomoléculas, también debido a que se ha demostrado que presenta muy buenas características para su aplicación a nivel clínico debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja antigenicidad (Tian et al., 2021). Por las características antes mencionadas y por la capacidad de alterar su estructura desde un nivel molecular en respuesta a las fuerzas mecánicas convirtiendo las mismas en señales bioquímicas

que controlan procesos biológicos, el colágeno ha sido una proteína que ha tomado gran fuerza en diferentes campos de la ciencia.

Algunas de las aplicaciones en las que se emplea el colágeno a nivel biomédico son, principalmente, en ingeniería de tejidos, biomateriales, agentes hemostáticos y apósitos para la curación de heridas o quemaduras (H. Jafari et al., 2020). Una de estas aplicaciones es el uso del colágeno en geles e hidrogeles, los cuales se ha demostrado que tienen gran estabilidad mecánica y funciones biológicas muy similares a las de los tejidos naturales, por lo que se suelen aplicar en diferentes campos biomédicos como andamios tridimensionales, en implantes médicos o como andamios de células (Tian et al., 2021).

Proceso De Extracción Del Colágeno

El proceso de extracción de colágeno consta principalmente de siete etapas: blanqueamiento, eliminación de extracto etéreo, hidrólisis alcalina de proteínas no colágenas, hidrólisis ácida, precipitación, diálisis en ácido y liofilización.

Tabla 3

Comparación de la información recolectada sobre el proceso de extracción de Colágeno Soluble en Ácido (ASC, por sus siglas en inglés) de PT.

#	Blanqueamiento	Eliminación de extracto etéreo	Desproteínización con NaOH	Hidrólisis ácida	Precipitación con NaCl	Referencia
1	-	N-Butanol (10%), T= 8°C t= 12 h L= 2 cm	$C_b = 0.5 \text{ M}$ T= 8 °C t= 20 h	$C_a = 0.7 \text{ M}$ T= NR t= 12 h	$C_{NaCl} = 10\%$ T= 4°C t= NR G= NR	(Giraldo Ríos, 2019)
2	NaClO = 250ppm, L = 0.5cm	N-Butanol (10%) T= NR t= 12 h	$C_b = 0.4 \text{ M}$ T= NR t=12 h	$C_a = 0.7 \text{ M}$ T= 18.5° C t= 5 h	$C_{NaCl} = 12\%$ T= 4°C t= 1 h G= 20000 g	(Quintero & Zapata, 2017)

#	Blanqueamiento	Eliminación de extracto etéreo	Desproteínización con NaOH	Hidrolisis ácida	Precipitación con NaCl	Referencia
3	-	N-Butanol (10%) T= 4°C, t= 24 h L= NR	$C_b= 0.1\text{ M}$ T= 4°C t= 48 h	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4°C t= 72 h	$C_{NaCl}= 2.3\text{ M}$ T= NR t= 30 min G= 21200 g	(Zeng et al., 2009)
4	-	N-Butanol (10%), T= 4°C, t= 24 h L= NR	$C_b=0.1\text{ N}$ T= 4°C t= 48 h	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4°C t= 72 h	$C_{NaCl}= 0.9\text{ M}$ T= 4°C t= 1h G=20000 g	(Nagai & Suzuki, 2000)
5	-	-	NaHCO ₃ $C_b= 0.1\text{ M}$ T= 4°C t= 6h L= NR	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4°C t= 24 h	$C_{NaCl}= 0.5\text{ mol/L}$ T= 4°C t= 15 min G= 20000 g	(Junde Chen et al., 2016)
6	-	-	$C_b= 0.1\text{ N}$ T= 4°C t= 4 h L= 0.5	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4-6°C t= 1 h	$C_{NaCl}= 0.9\text{ M}$ T= 4°C t= 1 h G= 30000 g	(Potaros, Raksakulthai, Runglerdkreangkrai, & Worawattanamateekul, 2009)
7	-	-	$C_b= 0.1\text{ M}$ T= 4°C t= 24 h L= NR	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4°C t= NR	$C_{NaCl}= 0.9\text{ M}$ T= 4°C t= 30 min G= 9500 g	(Sun, Hou, Li, & Zhang, 2017)
8	-	N-Butanol (10%) y etanol (25%) T= 4°C t= 24 h L= NR	$C_b= 0.1\text{ M}$ T= 4°C t= 36 h	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= 4°C t= 24 h	$C_{NaCl}= 0.15\text{ M}$ T= 20°C t= 20 min G= 18000 g	(Tian et al., 2021)
9	-	Etanol (5%) T= Amb t= 24 h L= 5 cm	$C_b= 0.12\text{ M}$ T= Amb t= 24 h	$C_a= 0.5\text{ M}$ T= Amb t= 24 h	-	(Bi et al., 2019)

Nota. El guion (-) en las celdas vacías indica que en la referencia consultada no se realizó o no se encontró información del proceso que se nombra en el encabezado de la columna correspondiente. Amb: ambiente; C_a : concentración de ácido; C_b : concentración de base; C_{NaCl} : concentración de cloruro de sodio; G: gravedades; L: longitud; NR: no reportado; T: temperatura; t: tiempo.

A continuación, se describe cada uno de los procesos necesarios para realizar la extracción de colágeno de acuerdo con la información adquirida.

Blanqueamiento. Este proceso consiste en aclarar la piel de tilapia con que se trabaja (donde el agente blanqueador más comúnmente usado es el hipoclorito de sodio (NaClO)); esto con el fin de que el colágeno obtenido sea de un color blanquecino y no grisáceo (en cumplimiento de la norma NTC 3750 que establece los requisitos que debe cumplir el colágeno soluble y los métodos de ensayo a los que debe ser sometido), también, se usa este compuesto químico por su fácil extracción y debido a sus propiedades desinfectantes, es posible limpiar las pieles de microorganismos para que no se alteren las etapas posteriores, ni el producto final (Quintero & Zapata, 2017) . Esta etapa no se lleva a cabo en la mayoría de los artículos recopilados (observar Tabla 3), sin embargo, la realización o no de esta fase, no afectará la calidad del colágeno obtenido al final del proceso, esto mientras se use en bajas concentraciones y por tiempos moderados (Quintero & Zapata, 2017)

Eliminación de extracto etéreo. En la mayoría de las publicaciones sobre extracción de subproductos de mar recomiendan realizar este paso para eliminar la grasa presente en la muestra con que se trabaja, esto con el fin de que el colágeno obtenido al final del proceso tenga la menor cantidad de grasa posible, para ello se emplea usualmente n-butanol (observar *Tabla 3*), que es un alcohol butílico que se emplea como disolvente. Sin embargo, en algunas publicaciones en que no se realiza esta etapa también se obtienen resultados favorables de la extracción.

Hidrólisis de proteínas no colágenas. En esta etapa se busca la hidrólisis o eliminación de proteínas no colágenas presentes en la PT para favorecer la extracción final de colágeno, para ello se suele emplear un tratamiento alcalino como el hidróxido de sodio (NaOH) a concentraciones no muy altas, en el rango de 0.1-0.5 M (observar *tabla 3*) para evitar el daño en la

estructura del colágeno desde etapas iniciales (Giraldo Ríos, 2019). De acuerdo con las publicaciones halladas sobre extracción de colágeno de subproductos marinos, se suele realizar este proceso a bajas temperaturas entre 4-8 °C.

Hidrólisis ácida. Inicialmente es necesario realizar un buen lavado de la piel después del paso anterior, ya que, si permanecen restos alcalinos dentro de la PT, al realizar la hidrólisis ácida, esta se va a neutralizar por el efecto alcalino, por ello, la piel debe estar a un pH neutro antes de dar inicio a la extracción ácida (Zeng et al., 2009). El objetivo de esta etapa es disolver el colágeno, para ello se debe someter la piel de tilapia a una sustancia ácida que es normalmente ácido acético, a concentraciones que varían entre 0.5 a 0.7 M y a temperaturas bajas alrededor de los 4°C.

Precipitación con sal. Esta precipitación es necesaria para separar el colágeno disuelto de la solución ácida, este proceso se lleva a cabo usando NaCl a concentraciones variables (observar *Tabla 3*). Esta precipitación se da debido a que la sal es muy soluble y provoca una disminución en el agua disponible para el colágeno, provocando que se precipite (Giraldo Ríos, 2019). La mezcla obtenida se centrifuga a bajas temperaturas, alrededor de los 4° C para separar la solución (sal y el ácido) del colágeno.

Diálisis. Esta etapa se realiza para eliminar los residuos de iones de sal y ácido que puedan estar presentes en el colágeno precipitado. Este proceso se lleva a cabo mediante la migración de líquidos a través de una membrana para diálisis, la cual permite retener las moléculas de colágeno y facilita la migración de la sal y el ácido hacia el líquido menos concentrado, que suele ser inicialmente ácido acético a una menor concentración que el empleado en la extracción ácida y posteriormente se suele usar agua destilada para la eliminación de los residuos de ese ácido, esto con el fin de evitar la desnaturalización del colágeno. (Giraldo Ríos, 2019)

Liofilización. Por último, se liofiliza el colágeno, este proceso se realiza para conservar proteínas a largo plazo sin causar daño en las mismas y para garantizar que el colágeno obtenido será de alta calidad y estable en soluciones o en sus posibles aplicaciones (Rittié, 2017). En la mayoría de los trabajos se obtiene la gráfica de absorbancia en la que se observa el momento en que se da el mayor pico, a partir del cual es posible determinar si es colágeno con base en la información previa recolectada, en donde se encontró que usualmente este pico de colágeno tipo I se da alrededor de los 222nm cuando se realiza con ácido (B. Ge et al., 2020).

Hidrogeles

Los hidrogeles son una clase de andamios que se describen como estructuras de red tridimensional formadas a partir de la reticulación de polímeros (que pueden ser sintéticos y/o naturales) con enlaces covalente o interacciones no covalentes. Se caracterizan por tener una alta capacidad de absorción y retención de agua o fluidos biológicos (la cantidad de fluidos que absorben dependerá de factores como la estructura del hidrogel, la densidad de reticulación, la composición de la solución y la técnica utilizada para sintetizarlo (Catoira, Fusaro, Di Francesco, Ramella, & Boccafoschi, 2019; F. Ullah, Othman, Javed, Ahmad, & Akil, 2015), la cual viene dada por su naturaleza hidrofílica. Esta capacidad de absorción de agua les permite imitar el entorno de la matriz extracelular de los tejidos naturales y favorecer la formación de tejido tridimensional (Rodríguez López, 2019), lo cual los convierte en andamios de gran interés para su aplicación en la ingeniería de tejidos, la medicina regenerativa, la administración de fármacos, entre otros. (Mitura, Sionkowska, & Jaiswal, 2020)

Los hidrogeles pueden clasificarse según sus propiedades físicas, la naturaleza del hinchamiento, el método de reticulación, el origen, las cargas iónicas, la tasa de biodegradación, la naturaleza observada de la reticulación y las fuentes. De acuerdo con las fuentes, los hidrogeles se

pueden subclasificar como sintéticos, híbridos (semisintéticos) y naturales (F. Ullah et al., 2015), de los cuales, estos últimos están hechos de polímeros naturales que pueden obtenerse a partir de fuentes naturales como, por ejemplo, el colágeno extraído de PT.

Hidrogeles A Base De Colágeno

El colágeno es una proteína que se utiliza ampliamente como biomaterial debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja antigenicidad, baja respuesta inflamatoria, facilidad de incorporación a la nueva matriz tisular y excelentes propiedades biológicas (Catoira et al., 2019; Heo et al., 2016). Adicionalmente, el colágeno es un material altamente reticulado (Mitura et al., 2020), que da lugar a estructuras de triple hélice autoensambladas (hidrogeles) a 37°C y pH neutro, es decir, bajo condiciones fisiológicas (Heo et al., 2016; Osidak, Kozhukhov, Osidak, & Domogatsky, 2020). La mayoría de los hidrogeles a base de colágeno son producidos con colágeno tipo I (Osidak et al., 2020), siendo este tipo de colágeno del que se compone la PT. Los hidrogeles que se componen de colágeno proporcionan un entorno de cicatrización húmedo, pueden retirarse sin complicaciones (Fan et al., 2014), se adhieren fuertemente en heridas y se degradan y absorben durante su aplicación clínica (B. Ge et al., 2020). Es por ello que los hidrogeles a base de colágeno se encuentran entre los andamios más estudiados para aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos (Sarrigiannidis et al., 2021).

Fabricación De Hidrogeles De Colágeno

Los hidrogeles a base de colágeno se pueden sintetizar por diversos métodos, los cuales pueden dividirse en dos grandes grupos: reticulación química y reticulación física (Catoira et al., 2019; Gu, Shan, Ma, Tay, & Niu, 2019). En el método de reticulación química los hidrogeles de colágeno pueden formarse con enlaces covalentes por medio de las siguientes técnicas:

polimerización radical, reticulación por radiación, reticulación enzimática, termogelación (Catoira et al., 2019), y empleando agentes reticuladores (por ejemplo, el glutaraldehído) que interactúan con el colágeno, formando dentro y entre sus fibrillas reticulaciones exógenas (Gu et al., 2019). El método de reticulación física se basa en el autoensamblaje del colágeno, que viene dado principalmente por las interacciones intermoleculares, como la reticulación iónica, las interacciones hidrofóbicas y los geles con enlaces de hidrógeno (Catoira et al., 2019). Entre las técnicas de reticulación física se encuentran el tratamiento con luz ultravioleta, el tratamiento deshidrotérmico y la fotooxidación mediada por tintes, que son capaces de formar enlaces entrecruzados en las matrices de colágeno. Durante el proceso de gelificación se pueden controlar o modificar muchos parámetros, como la temperatura, el pH y la concentración del precursor del hidrogel (en este caso, colágeno), para conseguir la estructura de hidrogel deseada. (Jingjing Chen et al., 2019)

Entre estos dos métodos de reticulación, la reticulación química es el más eficaz por su capacidad de producir un grado de reticulación uniforme y elevado, pero su desventaja radica en la toxicidad de las sustancias químicas utilizadas y en los altos costos que puede acarrear. Por otro lado, la reticulación física evita con éxito la introducción de dichas sustancias, produce biomateriales con una excelente biocompatibilidad, y destaca por su sencillez, seguridad y bajo coste. (Gu et al., 2019)

Capítulo 3. Estado Del Arte

Hace algunos años, los apósitos tenían la única función de cubrir y proteger tanto la herida como la piel perilesional frente a traumas mecánicos, químicos o biológicos del ambiente como infecciones, microtraumatismos, entre otros (Fornes Pujalte et al., 2008). Sin embargo, con los

avances de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, los apósitos, además de cubrir y proteger la herida, también promueven el proceso de curación y cicatrización, facilitando el tratamiento de las mismas (Ovington, 2007); por esto, en los últimos años se han realizado investigaciones en búsqueda de biomateriales que tengan una posible aplicación como apósitos para el tratamiento de heridas específicas, como las quemaduras.

Los biomateriales se pueden clasificar según su composición en cinco diferentes grupos: polímeros, metales, cerámicos, compuestos (también conocidos como composites, en inglés) y materiales naturales (Sáenz Ramírez, 2004); estos últimos han sido ampliamente utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa gracias a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y similitud a las moléculas que comprenden la matriz extracelular de la herida (Valencia-Gómez et al., 2016). Estos biomateriales emplean recursos naturales como el colágeno, la albumina, la celulosa o la quitina (Montañez Supela, 2014; S. Ullah & Chen, 2020) en campos como la ingeniería de tejido óseo, cardiovascular, de piel, cartílago y tendón (S. Ullah & Chen, 2020).

Actualmente el colágeno extraído de fuentes animales es ampliamente utilizado en las industrias biomédicas, cosmetológicas y farmacéuticas dadas sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja antigenicidad (D. Liu, Zhou, Li, & Regenstein, 2014). Es por esto que en los últimos años se han evaluado las propiedades que presenta la tilapia (*Oreochromis spp.*) como apósito natural para el tratamiento de quemaduras dadas sus altas concentraciones de colágeno tipo I, especialmente en las zonas de la piel, escamas y columna vertebral (Lima-Verde et al., 2020).

Diferentes estudios preclínicos y clínicos realizados en países como Brasil, China y Alemania indican que la PT puede ser utilizada para el tratamiento de quemaduras dado su alto

contenido de colágeno (que presenta un perfil de aminoácidos muy similar al que se encuentra en la piel humana, en donde la glicina presenta el mayor grado de variación con tan solo un 2.6 % (Serrano Gaona, 2011)), su alta adherencia a la herida y su capacidad de acelerar la cicatrización (Jingjing Chen et al., 2019). De acuerdo con un estudio de Jude Chen, de las escamas de tilapia se puede obtener un rendimiento en peso seco de colágeno, de alrededor de 3.2 g colágeno /100 g escamas, mientras que de la piel se puede llegar a obtener hasta 27.2 g/100 g, por lo que resulta más eficiente trabajar con PT (Junde Chen et al., 2016). El grupo de investigación brasileño liderado por el médico Lima Júnior realizó estudios preclínicos en ratas Wistar aplicando PT directamente en heridas provocadas en las ratas, los investigadores lograron evidenciar un proceso de cicatrización similar a los obtenidos en los tratamientos convencionales, generando una reducción de la reacción inflamatoria y unos valores normales de parámetros hematológicos y bioquímicos (Edmar Maciel Lima Júnior, 2017); estos hallazgos permitieron en su momento continuar con estudios clínicos, entre los cuales se destacan los realizados en el 2019 por Borges de Miranda y Teixeira Brandt en paciente adultos, y por los grupos de investigación de Lima Júnior y Almeida Costa en pacientes pediátricos, obteniendo resultados favorables en cuanto a tiempo de tratamiento, nivel de dolor en cambios de apósitos, cantidad de analgésicos, y costo promedio de tratamiento por paciente (Borges de Miranda & Teixeira Brandt, 2019; Costa et al., 2019; E. M. Lima Júnior et al., 2020; Lima Verde et al., 2021). En un estudio realizado por investigadores de la universidad de Yantai, China, encontraron que la PT favorece la angiogénesis y la re-epitelización de heridas por su alta expresión del factor de crecimiento beta I (D. Li et al., 2021); también, en un estudio realizado por Dongsheng Li y colaboradores, se investigaron las propiedades de la matriz dérmica acelular de PT, de lo cual, se concluyó que frente a otras alternativas animales como las porcinas y bovinas, la matriz dérmica acelular de PT era más

propensa a degradarse in vitro e in vivo y brindaba una correcta velocidad de degradación en la herida (D. Li et al., 2021). No obstante, uno de los problemas presentados en los estudios clínicos, se daba en la disminución progresiva del contenido del colágeno de la PT durante los usos clínicos debido a la adhesión de material orgánico y de estructuras celulares (propias de las heridas) a este biomaterial (Lima Verde et al., 2021). Otro problema identificado viene dado por la deshidratación que sufre la PT luego de haber sido aplicada por aproximadamente doce días, dado que esta tiende a deshidratarse lo que produce su ruptura, debilitamiento y deslizamiento de la PT en la herida (Lima-Junior et al., 2019); por estas razones ha sido importante buscar nuevas formas de implementación del colágeno presente en la PT de una manera más efectiva.

La extracción del principal componente regenerativo de la PT, el colágeno tipo I, representa el punto de partida para la fabricación de nuevas formas de presentación de esta proteína, ya sea en láminas, partículas, membranas, esponjas o hidrogeles (Westgate, Cutting, G, & Asaad, 2012) Se han encontrado diferentes métodos para la extracción del colágeno presente en la PT, en los cuales se sigue una misma secuencia de procesos para la extracción del mismo, que son: preparación, pretratamiento, extracción y recuperación. La preparación es el único proceso inicial e igual en todos los métodos, que consiste en limpiar y retirar las partes animales que no son necesarias. Entre los métodos más reportados para la extracción de colágeno de PT se encuentran: colágeno solubilizado en ácido (ASC), colágeno solubilizado en pepsina (PSC), extracción con solvente eutéctico profundo (DES) y fluidos supercríticos (SF) (H. Jafari et al., 2020) de los cuales, de acuerdo con la investigación realizada, los más comúnmente implementados son el ASC y PSC. La diferencia entre estos métodos radica en que el ácido acético (comúnmente usado en ASC) solubiliza la proteína, mientras que por PSC se hidroliza la

proteína para que se haga más pequeña y posteriormente, se solubilice. Por ello, se llega a preferir el ASC frente al resto de alternativas de extracción del colágeno de la PT. (Serrano Gaona, 2011)

Una vez extraído el colágeno tipo I de la PT, se puede emplear en distintas formas de presentación, generalmente como apósitos, en donde una de sus implementaciones fue la realizada por la investigadora Leilei Sun et. al, desarrollando esponjas de colágeno de PT como apósitos hemostáticos, de los cuales pudieron determinar que presentaban una alta biocompatibilidad, además encontraron que el entrecruzamiento dado por el proceso de fabricación promovía la proliferación de los fibroblastos, disminuía el índice de coagulación y generaba un mejor efecto hemostático (Sun et al., 2020). Otra forma de presentación para el colágeno extraído son los hidrogeles (Westgate et al., 2012), que son matrices tridimensionales que han tomado gran relevancia en las últimas dos décadas debido a sus amplias aplicaciones, entre ellas la cicatrización de heridas y la ingeniería de tejidos (El-Sherbiny & Yacoub, 2013). Estos hidrogeles pueden ser sintéticos, semisintéticos o naturales; estos últimos se caracterizan por estar compuestos de polímeros naturales, como el colágeno. Este tipo de hidrogel a base de colágeno, de acuerdo con el investigador Hon Wei Ng, tiene características muy importantes en cuanto a degradabilidad, ya que la estructura de triple hélice del colágeno se mantiene intacta en la degradación del hidrogel, siendo la concentración de colagenasa el único factor que afecta a la velocidad de degradación de los mismos (Ng, Zhang, Naffa, & Prabakar, 2020; Virumbrales-Muñoz et al., 2019); también, de acuerdo con la investigación llevada a cabo por Ouyang Qianqian y otros investigadores, los hidrogeles a base de colágeno tipo I de PT pueden llegar a presentar una estructura porosa muy similar a la de la matriz extracelular, permitiendo un ambiente óptimo para la proliferación celular durante su aplicación en heridas (Qianqian et al., 2021).

En los últimos años se ha incursionado en el desarrollo de hidrogeles a base de colágeno de PT. En 2020, Ge et al., desarrollaron y evaluaron hidrogeles de colágeno de PT para el tratamiento de úlceras y quemaduras; para esto extrajeron el colágeno por los métodos ASC y PSC, a partir del cual se desarrollaron los hidrogeles que presentaron resultados óptimos en pruebas de citotoxicidad, retención de agua, regeneración tisular (en piel de ratas) y propiedades mecánicas (B. Ge et al., 2020). Por lo tanto, de acuerdo con la información recolectada, es posible identificar que el desarrollo de hidrogeles a base de PT es un tema de actualidad debido a sus características favorables y sus amplias aplicaciones clínicas, como el tratamiento de quemaduras.

Capítulo 4. Metodología

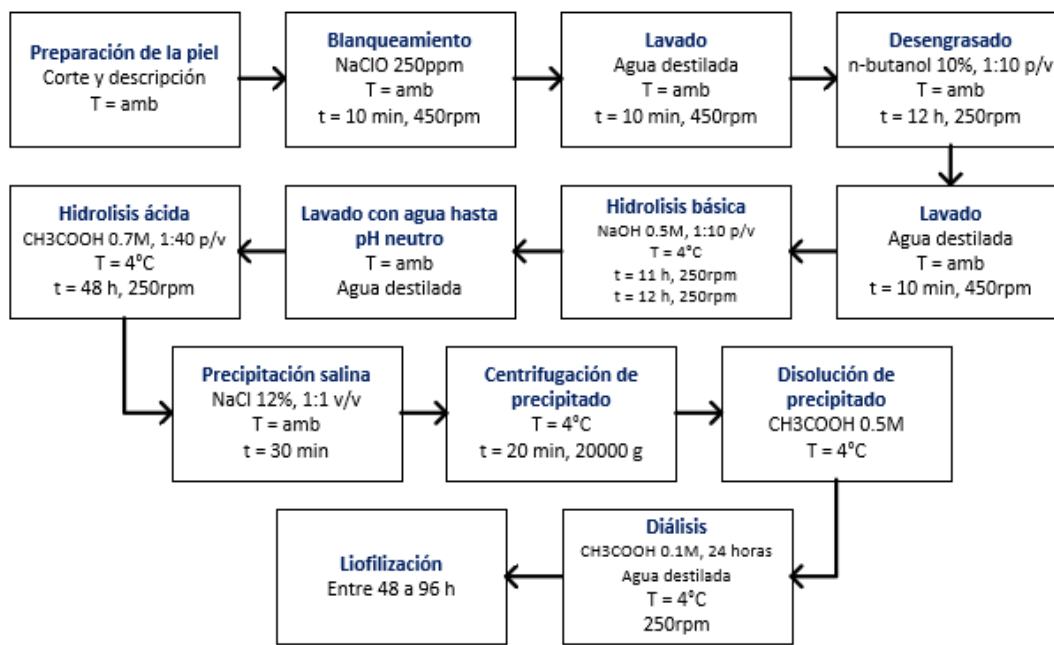
Extracción Del Colágeno De Piel De Tilapia Roja

La tilapia roja se obtuvo de un mercado local de pescado de Bucaramanga, Santander – Colombia, siendo estos peces adultos criados en cautiverio; se realizó el fileteo y retiro de escamas de los peces adquiridos. Posteriormente las pieles se transportaron a bajas temperaturas hasta el laboratorio y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para el proceso de extracción de colágeno con ácido, se tuvo en cuenta el protocolo informado por (Giraldo Ríos, 2019) y (Quintero & Zapata, 2017), y fue estandarizado acorde a las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de tejidos de la Universidad Autónoma de Bucaramanga - UNAB; el protocolo estandarizado resultante de los hallazgos encontrados en la ejecución de múltiples protocolos se detalla en la Figura 6 y en las siguientes subsecciones. A partir de esta sección, cuando se mencione que un proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, se refiere a la del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la UNAB (21°C).

Figura 6

Diagrama de flujo del proceso estandarizado de extracción de colágeno soluble en ácido (ASC) a partir de la piel de tilapia roja.



Nota. T: temperatura; t: tiempo, amb: ambiente.

Preparación De La PT

Las pieles que se utilizaron para el proceso de extracción se descongelaron por 1 h a temperatura ambiente, se retiraron los pedazos de músculo aún adherido a la PT con ayuda de un bisturí y luego se registraron las propiedades físicas de las pieles, aceptando aquellas de apariencia brillante, firmes, elásticas y con olor característico a pescado fresco. Se registra el peso de las pieles aceptadas (peso inicial del proceso, en mg) y se procede a cortar la piel en tamaños de aproximadamente 0.5x0.5 cm.

Nota: Las unidades de las relaciones de peso/volumen (p/v) y volumen/volumen (v/v) en esta investigación se tomaron como miligramos/mililitros y mililitros/mililitros, respectivamente.

Blanqueamiento

El blanqueamiento de las pieles se realizó con hipoclorito de sodio (NaClO) a 250 ppm con agitación constante de 450 rpm por 10 min a temperatura ambiente, después, se realizaron dos lavados con agua destilada a una relación 1:30 (p/v) con respecto al peso inicial de las pieles, con agitación constante de 450 rpm por 5 min cada lavado a temperatura ambiente, esto con el objetivo de eliminar el NaClO presente en las pieles.

Desengrasado

El desengrasado se realizó utilizando n-Butanol al 10% en proporción 1:10 (p/v) con respecto al peso inicial de las pieles por 12 h a 450 rpm y temperatura ambiente. Luego, para retirar el n-Butanol que podría haber quedado en las pieles, se realizaron dos lavados con agua destilada a las mismas condiciones de los lavados anteriores.

Hidrólisis Básica

Las pieles sin grasa se sometieron a un tratamiento con NaOH al 0.5 M en una relación 1:10 (p/v) con respecto al peso inicial, realizando dos fases: la primera durante 11 h a 4°C con agitación constante de 450 rpm y la segunda durante 12 h con las mismas condiciones cambiando la solución, esto con la finalidad de eliminar las proteínas no colágenas de las pieles. Luego, para eliminar los restos de NaOH que pudieron haber quedado en las pieles, se realizó un lavado con agua destilada a una relación 1:100 (p/v) con respecto al peso inicial de las pieles a temperatura ambiente con agitación constante de 450 rpm, con cambios de agua cada 10 min hasta obtener un pH neutro (entre 6.8 a 7.2).

Extracción Ácida

En el proceso de extracción, las pieles se trataron con ácido acético (CH_3COOH) al 0.7 M a una relación 1:40 (p/v) con respecto al peso inicial de las pieles por 48 h, a 4°C con agitación

constante de 450 rpm, luego fueron filtradas utilizando tul (tejido ligero con estructura abierta) para eliminar los componentes sólidos que pudiera presentar la muestra.

Precipitación Salina

A la solución obtenida del filtrado se le agregó NaCl al 12% en una relación 1:1 (v/v) y se agitó a 450 rpm a temperatura ambiente por 10 min, esto formó un precipitado que luego se filtró (utilizando un tul), recolectó y envasó en tubos. Se procedió a centrifugar los precipitados recolectados a 20000 g durante 20 min a 4°C y se envasó los precipitados resultantes, agregando CH_3COOH al 0.5 M en una relación 1:34 (v/v) con respecto al precipitado obtenido, se almacenó a 4°C hasta observar una disolución completa del precipitado, obteniendo así una solución rica en colágeno tipo I acorde a lo reportado por (Giraldo Ríos, 2019; Quintero & Zapata, 2017; Serrano Gaona, 2011).

Diálisis

Una vez obtenida una solución homogénea, se dializó la muestra inicialmente con CH_3COOH al 0.1 M por 24 h con cambio de ácido a las 12 h. Luego se continuó la diálisis con agua destilada con cambios cada 12 h, midiendo el pH en cada cambio de agua hasta alcanzar un pH similar al del agua destilada (entre 6.1 y 6.3, con un aproximado de 6 cambios); este proceso se realizó a 4°C con agitación suave (200 rpm). El producto obtenido de la diálisis se envasó en tubos de tal modo que no superaran 2/3 de la capacidad del tubo, se congelaron inicialmente a -20°C por aproximadamente 12 h y luego a -80°C por 1 h.

Liofilización

Se sacaron las muestras del congelador y sus respectivas tapas fueron reemplazadas por papeles de filtro de 5x5 cm, fijadas con bandas elásticas de caucho, luego se ubicaron en el liofilizador ajustado a una temperatura de -50°C y una presión de vacío inferior a los 0.014 mbar,

llevándose a cabo en el menor tiempo posible para evitar un descongelamiento de las muestras. Las muestras se liofilizaron hasta no observar líquido en su interior (aproximadamente 3 días). Se pesó el producto liofilizado y posteriormente se guardó a -80°C hasta su uso, agregando Parafilm alrededor de la tapa para evitar entradas indeseadas de agua al interior del tubo.

Caracterización Del Colágeno Extraído De La PT

Rendimiento De Extracción De Colágeno Solubilizado En Ácido (ASC)

El rendimiento de extracción de ASC fue calculado en:

Base húmeda. Relacionando el peso del colágeno liofilizado (W_1) por el peso húmedo de la piel utilizada en el inicio de la extracción (W_2) según ecuación 1 (Menezes, Ribeiro, Abreu, Feitosa, & Filho, 2020)

$$R_{Base\ húmeda} = \frac{W_1}{W_2} \times 100, (1)$$

Base seca. Relacionando el peso del colágeno liofilizado (W_1) por el peso liofilizado de la piel utilizada en el inicio de la extracción (W_3) según ecuación 2 (Wang, Pei, Liu, & Zhou, 2018); para esto se liofilizaron pieles provenientes del mismo pescado utilizado en el proceso de extracción.

$$R_{Base\ seca} = \frac{W_1}{W_3} \times 100, (2)$$

Espectro De Absorción Ultravioleta (UV-VIS)

Para realizar las pruebas de absorbancia se preparó una solución stock de 8 mg/ml de colágeno liofilizado disuelto en ácido acético (CH_3COOH) al 0.02 M. Para preparar el stock, se descongeló el colágeno liofilizado a temperatura ambiente por aproximadamente 40 min y se agregó el CH_3COOH ; esta mezcla se mantuvo a 4°C , realizando agitaciones manuales suaves cada 10 min. Una vez el stock se homogeneizó, se centrifugó a 1200 g por 15 min a 4°C para eliminar burbujas y se utilizó junto con el ácido acético (CH_3COOH) al 0.02 M para preparar 100 μl de

muestras de colágeno a 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mg/ml. Por último, se empleó el espectrofotómetro para medir el espectro de absorción ultravioleta de las muestras, tomando como blanco (lectura de referencia) el agua destilada. Los datos obtenidos se extrajeron del equipo para su posterior análisis.

Espectroscopia Infrarroja Por Transformada De Fourier Con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Se pesaron aproximadamente 5 mg de colágeno liofilizado previamente descongelado (a temperatura ambiente durante 1 h) para utilizar como muestra de la prueba, la cual se depositó sobre el cristal ATR (ver Figura 7), sin ningún tratamiento o aditivo previo. La prueba de FTIR-ATR se llevó a cabo mediante un espectrómetro FTIR is50 FT-IR Nicolet Thermo Scientific, con las condiciones de adquisición de los espectros FTIR-ATR de la muestra de colágeno descritas en la Tabla 4.

Tabla 4

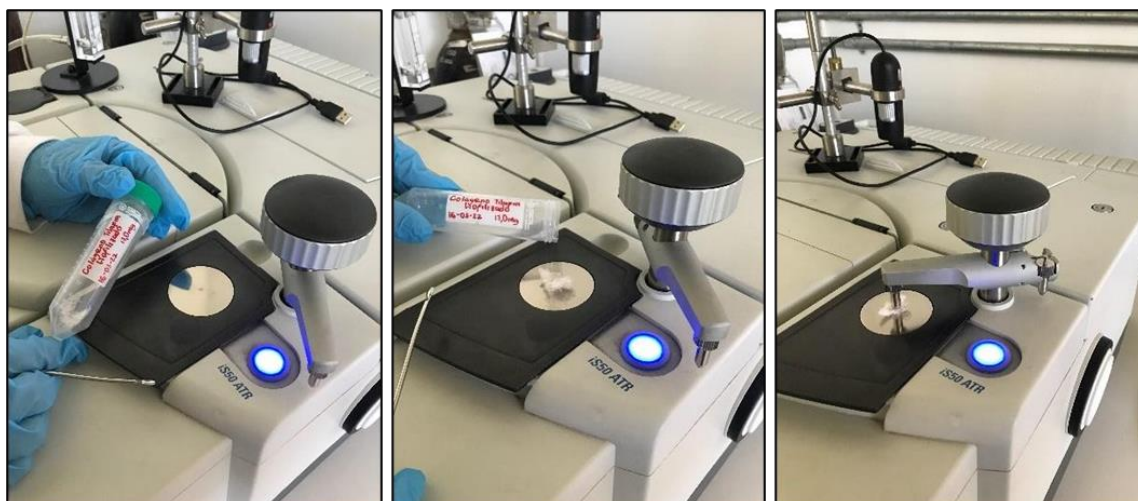
Condiciones experimentales del espectrómetro FTIR para la ejecución de la prueba.

Equipo	is50 FT-IR Nicolet. Thermo Scientific
Rango de Adquisición	4000-400cm ⁻¹
Número de Scans	128
Resolución	4
Velocidad Óptica	0.4747 cm/s
Modo	Transmitancia
Apertura	100
Software	OMNIC

Las señales del espectro FTIR-ATR obtenidas fueron comparadas con lecturas de bases de datos (como BIORAD) y artículos de investigación para su posterior análisis.

Figura 7

Fotografías representativas del montaje y la realización de la prueba FTIR-ATR.



Preparación De Hidrogeles

La preparación de los hidrogeles de colágeno de PT se realizó tomando como referencia la metodología reportada por Munoz Dany et al (Munoz-Pinto, Jimenez-Vergara, Gharat, & Hahn, 2015). A continuación, se presentan los cálculos realizados para la adición de cada componente para la formación de cada grupo de hidrogeles.

Cálculos Previos

Inicialmente, fue necesario realizar la solución stock de colágeno, empleando la misma metodología presentada en la sección de metodología UV-VIS. Posteriormente, se prepararon hidrogeles de colágeno a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml con un volumen de 400 μl , teniendo en cuenta las ecuaciones 3 a 6 para el cálculo de componentes a agregar (solución tamponada de fosfato (PBS) 10X, la solución stock de colágeno, NaOH 0.1N y agua destilada).

$$V_{PBS10X} = \frac{V_{FH}}{10}, (3)$$

$$V_{col} = \frac{V_{FH} * C_H}{S_C}, (4)$$

$$V_{NaOH} = V_{col} * 0.023, (5)$$

$$V_{dH_2O} = V_{fH} - V_{col} - V_{PBS10X} - V_{NaOH\ 0.1N}, (6)$$

Donde V_{PBS10X} es volumen de PBS 10X para formar un hidrogel, V_{fH} es volumen final del hidrogel, V_{col} es volumen de solución de colágeno para formar un hidrogel, C_H es concentración del hidrogel, S_c es solución stock de colágeno, V_{NaOH} es volumen de NaOH al 0.1 N para formar un hidrogel y V_{dH_2O} es volumen de agua destilada para formar un hidrogel.

Proceso De Preparación De Hidrogeles

La solución stock de colágeno se disolvió en ácido para su preparación, por lo que se neutralizó con NaOH y adicionalmente se le agregó PBS para proporcionar un ambiente óptimo para la formación del hidrogel.

Con base en lo calculado en las ecuaciones 3 a 6, se agregó el volumen de cada componente, en el siguiente orden: PBS 10X, NaOH al 1 N, agua destilada y por último el colágeno disuelto en ácido acético (0.02 N); este proceso se realizó en una cama fría (mediante el uso de dos pilas de agua congelada a -20°C). Al obtener una mezcla homogénea, se depositaron en una placa de 48 pozos y se incubaron a 37°C por 1 h. Luego se sumergieron en 1 ml de PBS 1X durante 30 min para retirar residuos no reticulados.

Pruebas Mecánicas

Se prepararon hidrogeles en forma de disco de aproximadamente 8 mm de diámetro y 3.5 mm de alto (o grosor). Para realizar las pruebas mecánicas de compresión (PMC) se hizo uso del banco de carga ElectroForce 3500 Serie 3, equipado con una celda de carga de 2.5 N. En estas pruebas se utilizaron los hidrogeles en forma de discos y se comprimieron hasta el 50% de su altura, con una velocidad de deformación de 0.05 mm/s. En estas pruebas se implementaron dos

patos de compresión propios del banco de carga (ver Figura 8), uno inferior inmóvil en el que se ubicaban los hidrogeles en forma de discos y uno superior que se encargaba de comprimirlos.

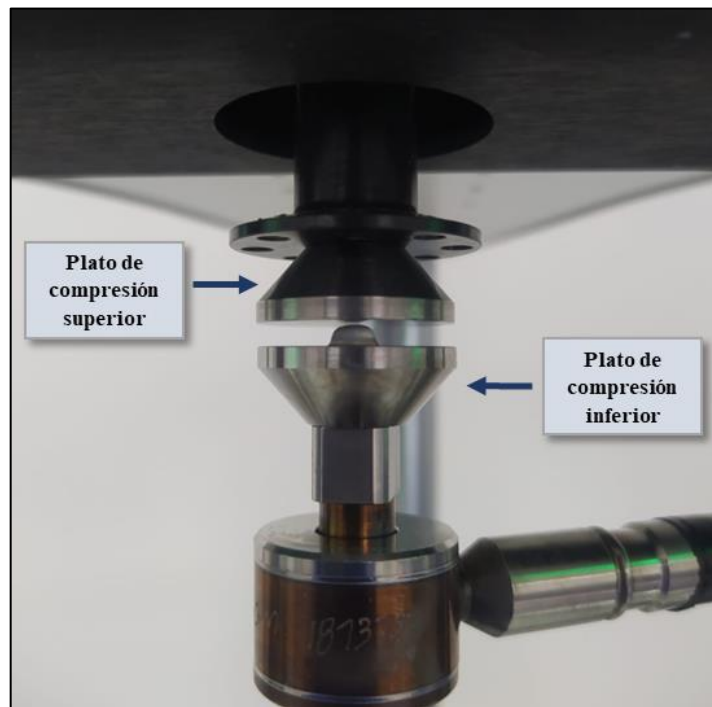
Con los datos obtenidos en cada una de las pruebas se calculó el esfuerzo aplicado (σ) como:

$$\sigma = \frac{F}{At}, (7)$$

Donde F es la fuerza o carga medida y At es el área transversal de la muestra. Por otro lado, la deformación se calculó como la diferencia entre el desplazamiento final del plato de compresión superior del equipo y la altura inicial de la muestra (hidrogel en prueba). Finalmente, el módulo de compresión se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva de esfuerzo vs deformación; esta porción de la curva corresponde a la región de deformación elástica.

Figura 8

Platos de compresión utilizados en el banco de carga ElectroForce 3500 Serie 3 para las PMC.



Pruebas De Hinchamiento

Para las pruebas de hinchamiento se midió el peso de los hidrogeles al retirarlos de la placa de pozos (peso hinchado), se liofilizaron durante 48 h y se volvieron a pesar (peso seco). A partir de los datos antes mencionados y teniendo en cuenta las ecuaciones 8 a 10, se calculó la relación de hinchamiento, el contenido de agua y el contenido de proteínas presentes en los hidrogeles.

$$RH = \frac{P_H}{P_S}, (8)$$

$$C_{H_2O} = \frac{P_H - P_S}{P_H} * 100, (9)$$

$$C_P = \frac{P_S}{P_H} * 100, (10)$$

Donde RH es relación de hinchamiento, C_{H_2O} capacidad de retención de agua, C_P contenido de proteínas, P_H peso hinchado y P_S peso seco.

Pruebas De Contracción

Se fabricaron hidrogeles de colágeno de PT con concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml siguiendo el procedimiento reportado en la sección preparación de hidrogeles del presente documento. Se retiró con una servilleta el agua de la superficie de los hidrogeles para luego registrar las dimensiones y el peso de estos, estos se tomaron como datos iniciales (tiempo 0). Se ubicaron los hidrogeles en una placa de 24 pozos con 500 μ L de PBS 1X y se llevaron a incubación a 37°C. Se realizó un seguimiento de las dimensiones y los pesos de los hidrogeles cada 12 h, con un total de 7 registros, midiéndolos con un pie de rey y pesándolos en la balanza. El porcentaje de cambio de volumen y peso a través del tiempo con respecto al volumen inicial se calcularon con las ecuaciones 11 y 12.

$$\Delta V(t) = \frac{V_0 - V(t)}{V_0} * 100\%, (11)$$

Donde $\Delta V(t)$ es el cambio de volumen para un instante t , V_0 es el volumen inicial del hidrogel (tiempo 0) y $V(t)$ es el volumen para el tiempo t .

$$\Delta P(t) = \frac{P_0 - P(t)}{P_0} * 100\%, (12)$$

Donde $\Delta P(t)$ es el cambio de peso para un instante t , P_0 es el peso inicial del hidrogel (tiempo 0) y $P(t)$ es el peso para el tiempo t .

Prueba de Citotoxicidad

Con el fin de establecer si el colágeno extraído y los hidrogeles desarrollados en el presente estudio eran biocompatibles a nivel in vitro, en el presente estudio se realizaron dos pruebas de citotoxicidad, en una (denominada prueba de recubrimiento) se evaluó la biocompatibilidad del colágeno extraído de la PT diluido en ácido acético al 0.02 N a una concentración de 3.5 mg/ml y en la otra (prueba de lixiviado) se evaluó la biocompatibilidad del lixiviado generado por hidrogeles a base de colágeno de PT a una concentración de 3 mg/ml.

Prueba De Proliferación De Fibroblastos

La prueba de recubrimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo informado por (Trintinaglia et al., 2015), con algunas modificaciones. Inicialmente, fue necesario realizar una solución de colágeno a una concentración de 3.5 mg/ml, diluyendo el colágeno liofilizado en ácido acético al 0.02 N y eliminando burbujas al centrifugar por 15 min a 1200 g a 4 °C.

Se distribuyó una placa de 96 pozos como se observa en la Figura 9, en la cual, se tuvieron 12 pozos para el grupo experimental, 12 para el grupo control y 12 para el blanco.

Figura 9

Distribución de los grupos de las pruebas de citotoxicidad en una placa de 96 pozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●		●	●	●	●			
B	■	■	■	■		■	■	■	■			
C	×	×	×	×		×	×	×	×			
D												
E	●	●	●	●								
F	■	■	■	■								
G	×	×	×	×								
H												

Nota: las celdas con el símbolo ● corresponden al grupo experimental, ■ grupo control, × grupo blanco. Las celdas de color azul, naranja y verde corresponden a los grupos evaluados a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente

A partir de la anterior organización, se realizaron los siguientes tratamientos a los pozos:

- A los pozos del grupo experimental se les agregó 100 μl /pozo de solución de colágeno a una concentración de 3.5 mg/ml y se mantuvieron en un cuarto oscuro, protegida de la luz durante 16 h a 4°C. Luego se les retiró el colágeno sobrenadante de cada pozo para un posterior lavado con PBS 1X durante 5 min, repitiendo dos veces este proceso. Después, con el fin de bloquear las zonas en que no se adhirió el colágeno, se agregaron 200 μl de albúmina de suero bovino (BSA) al 2%, se protegió de la luz y se incubó a 37°C durante 1 h. Luego se realizaron dos nuevos lavados con PBS 1X para eliminar el BSA sobrante.
- A los pozos del grupo control se les realizaron dos lavados con PBS 1X durante 5 min.
- A los pozos del grupo blanco se les realizó el mismo tratamiento que a los pozos del grupo experimental, solo que se omitió el paso de agregación de colágeno.

A continuación, a los tres grupos se les agregó 7000 *células/cm²* de fibroblastos HT1080, junto con 200 μ l de medio de cultivo DMEM suplementado con SFB 10% y antibiótico 1X, luego se llevaron a la incubadora a 37°C durante 24 h, 48 h y 72h de cultivo continuo. Después de las correspondientes horas de cultivo, se agregó 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-H-tetrazolio, mejor conocido como MTT; se incubó a 37 °C por 4 h. Al finalizar este tiempo se retiró el sobrenadante de cada grupo y se adicionaron 120 μ l de DMSO a cada pozo, para una posterior incubación por 10 min, bajo las mismas condiciones de temperatura. Al finalizar se retiró el sobrenadante de cada pozo, transfiriendo 100 μ l a otra placa de 96 pozos, a partir de la que se realizaron las lecturas a 570 nm en un lector de microplacas. Se calculó el porcentaje de células viables mediante la ecuación 12.

$$V_C = \frac{G_E - G}{G_C - G} * 100, (13)$$

En donde V_C es viabilidad Celular, G_E es grupo experimental, G es grupo control y G_C es grupo de control.

Prueba De Lixiviado

La prueba de la citotoxicidad del lixiviado producido por los hidrogeles de colágeno se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por (B. Ge et al., 2020), con algunas modificaciones. Inicialmente, se prepararon hidrogeles de colágeno de PT a una concentración de 3 mg/ml como se reporta previamente en este documento, luego se sumergieron en PBS 1X durante 30 min para eliminar los componentes no reticulados. Se retiró el PBS y se agregó DMEM 1X durante 64 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se recolectó el sobrenadante y se filtró con una jeringa de 5 ml y un filtro de 0.22 μ m en la cabina de flujo laminar. Se distribuyó una placa de 96 pozos como se observa en la Figura 9, en la cual, se tuvieron 12 pozos para el grupo experimental, 12 para el grupo control y 12 para el blanco.

En los pozos de los dos grupos experimentales y control se sembraron 7000 *células/cm*² con DMEM suplementado. Tras 24h de cultivo, se reemplazó el medio de cultivo de la siguiente manera:

- A los pozos del grupo experimental, se les agregó 100 µl de DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) y 100 µl del lixiviado recolectado anteriormente.
- A los pozos del grupo control, se les agregó 100 µl de DMEM suplementado con SFB y 100 µl de DMEM 1x.

Luego se llevaron a la incubadora a 37°C durante 24 h, 48 h y 72 h de cultivo continuo. Después de las correspondientes horas de cultivo, se agregó 200 µl dimetilsulfóxido (DMSO) a 4 pozos del grupo blanco. A continuación, se les agregó 10 µl de MTT a los tres grupos correspondientes al tiempo de estudio y se incubó la placa por 4 h a 37°C. Al finalizar este tiempo se retiró el sobrenadante de cada grupo y se adicionaron 120 µl de DMSO a cada pozo, para una posterior incubación por 10 min, bajo las mismas condiciones de temperatura. Al finalizar se retiró el sobrenadante de cada pozo, transfiriendo 100 µl a otra placa de 96 pozos, a partir de la que se realizaron las lecturas a 570 nm en un lector de microplacas. La viabilidad celular se calculó con la ecuación 12.

Análisis Estadísticos

Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada una de las pruebas, estos fueron graficados como la media aritmética \pm errores estándar y posteriormente comparados entre sus grupos de estudio utilizando análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA), según fuera el caso. Se tuvieron en cuenta si los datos eran normales o no para ejecutar pruebas paramétricas o, en su defecto, no paramétricas, para asegurar un mayor nivel de confianza en los resultados. Para todos los análisis estadísticos realizados se

consideraron significativos valores de $p < 0.05$ y cantidad de réplicas por experimento mayores o iguales a 3 ($n \geq 3$) para comprobar la reproducibilidad de los resultados.

Capítulo 5. Resultados Y Análisis De Resultados

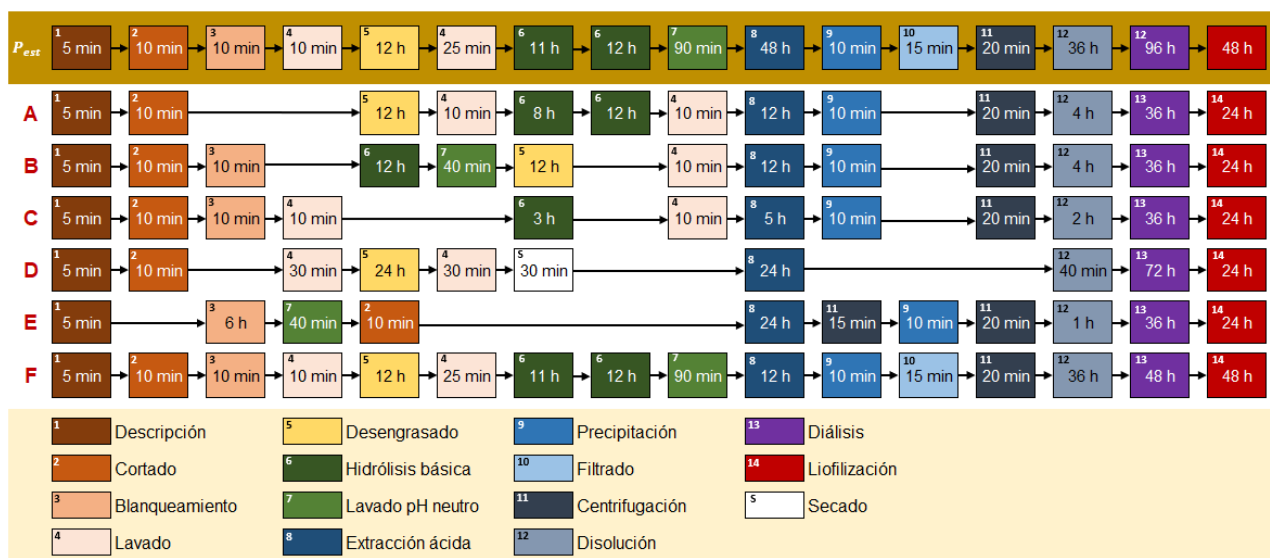
Resultados

Extracción De Colágeno De La Piel De Tilapia Roja

Con el fin de estandarizar el proceso de extracción de colágeno de piel de la tilapia roja acorde a las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de tejidos de la Universidad Autónoma de Bucaramanga - UNAB, se ejecutaron los protocolos reportados por (Bi et al., 2019; Junde Chen et al., 2016; Giraldo Ríos, 2019; Quintero & Zapata, 2017; Serrano Gaona, 2011) con ligeras modificaciones, mostrados en la Figura 10, en donde se detalla la secuencia metodológica junto con sus respectivos tiempos.

Figura 10

Protocolos de extracción de colágeno de piel de tilapia realizados.

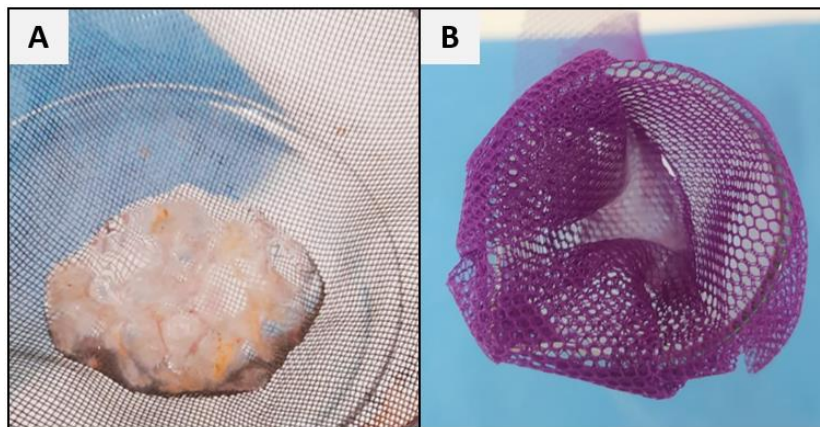


Nota. P_{est} es el protocolo estandarizado para las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la UNAB, Floridablanca.

Cada protocolo se inició con alrededor de 2 g de piel, siendo una cantidad significativamente menor de lo considerado inicialmente (1 kg), esto con el fin de tener una mayor facilidad de procesamiento hasta la estandarización del proceso; este cambio facilitó la búsqueda del insumo, limitándolo a la piel de 5 pescados; igualmente, esta cantidad de piel permitió un mejor procesamiento en el laboratorio, dada la disponibilidad de equipos (especialmente para el proceso de diálisis). El tamaño de las muestras se definió en 0.5x0.5 cm al permitir un mayor recubrimiento del reactivo a las pieles en cada uno de los procesos de extracción, igualmente este tamaño facilitó la disolución de las pieles en el ácido durante la extracción ácida evitando pérdida de piel en el filtrado como se observa en la Figura 11. Cabe resaltar que se cambió el instrumento de filtrado del colador a tela tul con dos dobleces.

Figura 11

Comparación del filtrado luego de la extracción ácida para 2 tamaños de piel.



Nota. (A) Piel cortada a 5x5cm, filtrada con colador (B) Piel cortada a 0.5x0.5 cm, filtrada con tul.

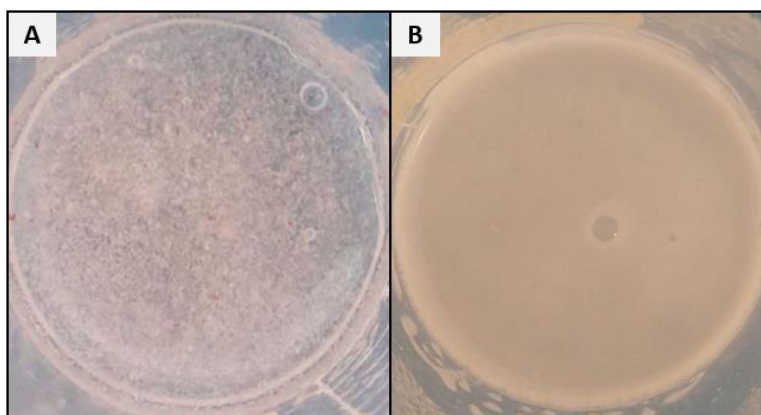
En el proceso de blanqueamiento se definió que la concentración de la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) es de 250 ppm, este cambio fue fundamentado con lo reportado por Quintero et al. (Quintero & Zapata, 2017).

Se decidió agregar un desengrasado de las pieles con n-butanol al 10% como lo reportan varios autores luego del proceso de blanqueamiento para eliminar la grasa presente (Giraldo Ríos, 2019; Nagai, Araki, & Suzuki, 2002; Quintero & Zapata, 2017; Tian et al., 2021; Zeng et al., 2009), esto permite obtener un colágeno final con niveles menores de grasa. En la hidrolisis básica se aumentó la concentración del reactivo (NaOH y la duración del proceso a 0.5 M y 23 h (con un cambio de reactivo a medio proceso), respectivamente; esto con el fin de obtener un mayor efecto de la base, retirando mayores cantidades de proteínas no colágenas de las pieles (Quintero & Zapata, 2017). Igualmente se modificó la temperatura con la que se realiza este proceso, pasando de altas a bajas temperaturas (35°C a 4 °C), como lo reportan varios autores en sus respectivos artículos (Junde Chen et al., 2016; Potaros et al., 2009; Sun et al., 2017; Zeng et al., 2009).

Se decidió incluir un lavado hasta pH neutro con agua destilada entre los pasos de hidrolisis básica y extracción ácida para asegurar el efecto del ácido en las pieles luego de pasar por un reactivo básico como el NaOH, evitando así lo ocurrido en algunos protocolos, en los que se daba la neutralización de la solución ácida por los restos de base presentes en las pieles. Este lavado evitó la presencia de residuos de piel luego de la extracción ácida como se observa en la Figura 12.

Figura 12

Comparación de las muestras luego de la extracción para cuando el pH se neutralizó o no.

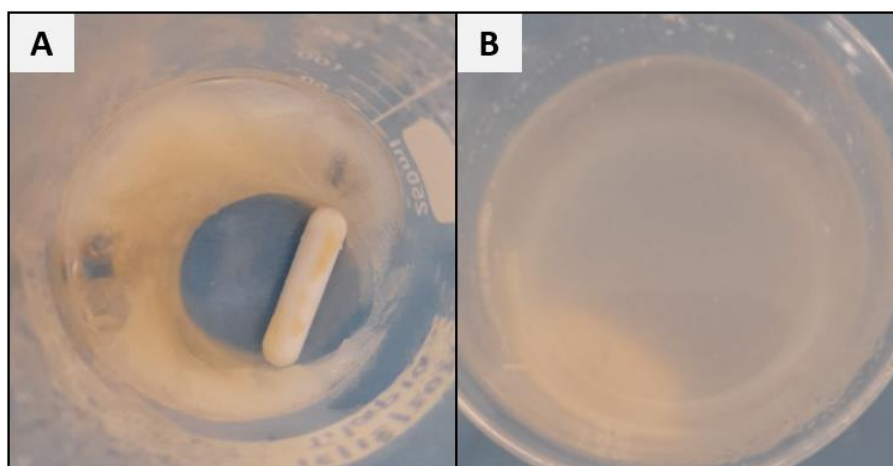


Nota: (A) Muestra no neutralizada antes de extracción ácida; (B) piel neutralizada antes de extracción ácida.

Para el paso de extracción ácida, se ajustó la relación de piel: ácido a 1:40 (mg/ml) para evitar la formación de un coloide en el proceso de extracción ácida observado en los protocolos A a F (foto representativa en la Figura 13), este cambio se fundamentó con el artículo de Zeng et al. garantizando una cobertura total y agitación constante de las pieles durante este proceso, logrando una desintegración total de las mismas (Figura 13). Se aumentó la concentración del reactivo (CH_3COOH) a 0.7 M como lo reporta Quintero et al., en donde se indica que con esta concentración se obtiene un mayor porcentaje de obtención de colágeno al finalizar el proceso (Quintero & Zapata, 2017); igualmente se aumentó la duración del proceso a 48 h para promover el efecto del ácido en las pieles como lo reporta Reátegui et al. (Reátegui-Pinedo et al., 2022).

Figura 13

Comparación entre dos relaciones de ácido/piel para el proceso de extracción ácida.



Nota: (A) relación de 1:10 (g/ml) de piel: ácido acético, (B) relación de 1:40 (g/ml) de piel: ácido acético.

La cantidad de NaCl al 12% se estableció mediante una prueba de salting out al adicionar en diferentes relaciones (2:1, 1:1, 1:2 y 1:3) la sal en la muestra acidificada (Tabla 5), logrando evidenciar que con una relación 1:1 (v/v) disminuía de mayor manera la solubilidad de la proteína, generando una cantidad mayor de precipitado.

Tabla 5

Comparación entre el peso de los precipitados obtenidos tras diferentes concentraciones de NaCl al 12%.

Relación – Muestra acidificada: NaCl 12%	Peso del precipitado [mg]
2:1	39.97
1:1	63.76
1:2	44.35
1:3	40.14

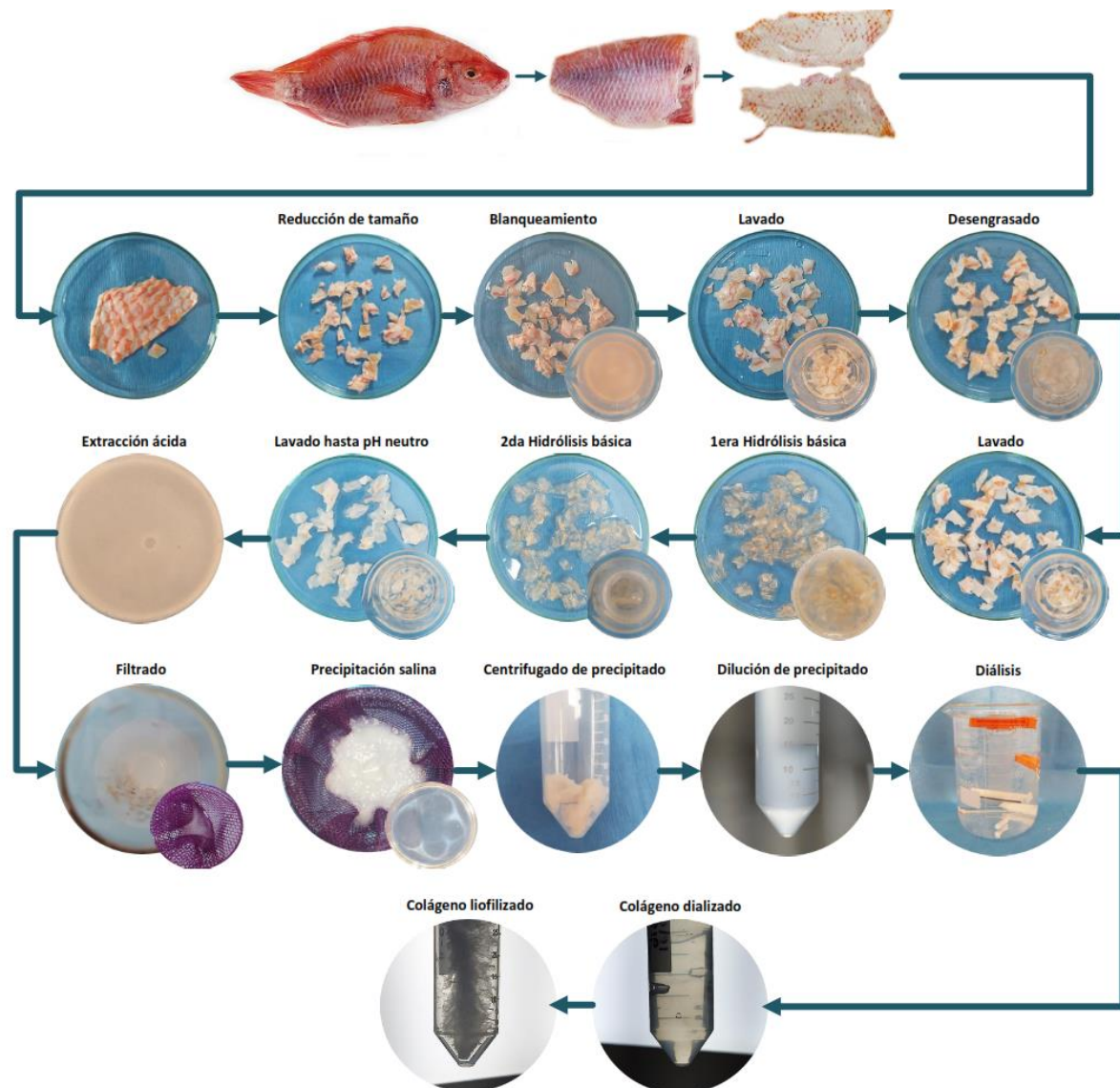
Con la finalidad de eliminar los residuos de la solución salina en las muestras, se adicionó una centrifugación del precipitado obtenido a 20000 gravedades durante 15 min a 4°C como lo reporta (Junde Chen et al., 2016). Se definió que el precipitado se diluye en ácido acético al 0.5 M a 4°C en reposo constante, evitando las agitaciones fuertes realizadas en algunos de los protocolos que pueden afectar la estructura del colágeno presente en la muestra. Debido a la nula agitación mecánica, el proceso tiene una duración aproximada de 48 h, tiempo para el cual hay una disolución completa del precipitado en el ácido.

Las muestras dializadas con los tiempos de los protocolos A, B, C, E y F presentaron un pH ácido. Con la finalidad de garantizar una mayor pureza del producto y una protección al filtro del liofilizador, se decidió modificar la duración de la diálisis hasta que el agua presentara un pH cercano a 6.2 (pH del agua destilada manejada en el laboratorio), con una duración promedio de 4 días, en los que se hicieron cambios cada 12 horas de ácido o agua.

Una vez con el protocolo estandarizado acorde a las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de tejidos de la universidad, descrito en la sección metodológica del presente documento, se obtuvo lo evidenciado en la Figura 14, en donde se incluye registro fotográfico de la apariencia de las pieles y el reactivo utilizado luego de pasar por cada uno de los procesos, denotando un cambio en cuanto a color y estado físico. Cabe recalcar la gama de olores presentes en el proceso, entre los que se incluyen fuertes olores a pescado, alcohol y ácido.

Figura 14

Proceso de extracción de colágeno de la piel de tilapia roja.



Nota. La imagen principal de cada paso representa la apariencia de las pieles o muestras al finalizar el proceso, mientras que la imagen de menor tamaño que acompaña a ciertos procesos representa la apariencia del reactivo al finalizar el respectivo proceso.

Se liofilizaron las muestras de piel del pescado utilizado en cada repetición del proceso de extracción de colágeno, con la finalidad de conocer el peso seco de la piel para los cálculos de rendimiento de extracción de colágeno, las pieles liofilizadas se muestran en la Figura 15 y sus respectivos pesos se registran en la Tabla 6.

Figura 15

Pieles de tilapia roja húmedas y liofilizadas.

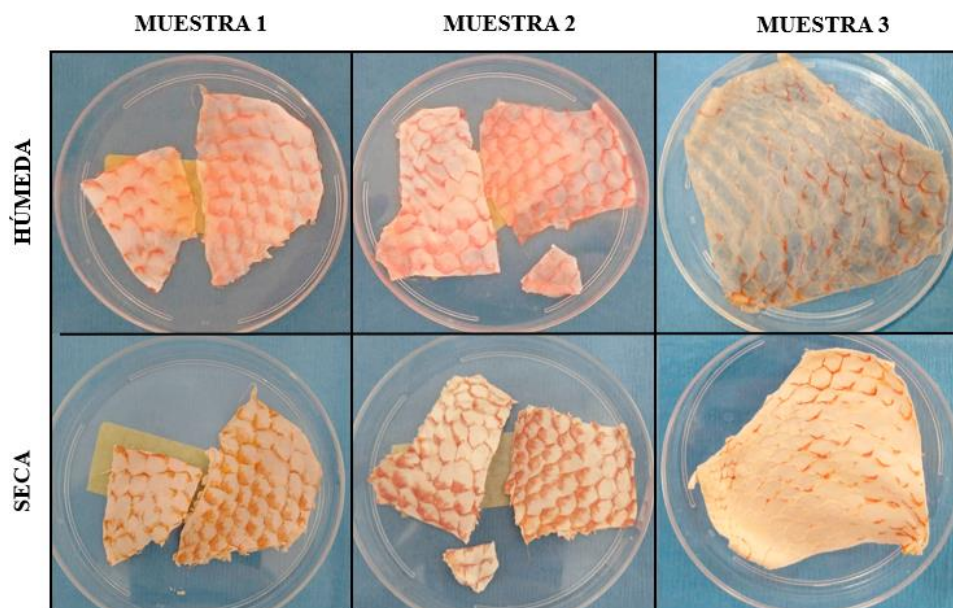


Tabla 6

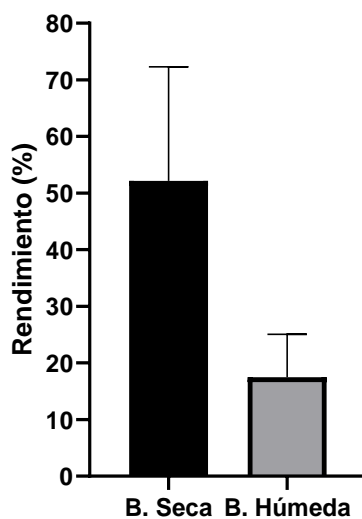
Peso húmedo y seco de pieles de tilapia roja.

MUESTRA	PESO HÚMEDO (g)	PESO SECO (g)
1	2.02	0.642
2	2.64	0.872
3	2.50	0.871

Se realizaron tres repeticiones del proceso estandarizado de extracción de colágeno, iniciando con alrededor de 2 gramos de piel en cada una de ellas. El producto final del proceso de extracción de colágeno tuvo una apariencia algodonosa, inolora y tuvo una alta estática. Con el peso de este producto obtenido se calculó el rendimiento de extracción de colágeno en base húmeda (relacionando el peso del colágeno liofilizado con la piel húmeda) y en base seca (relacionando el peso del colágeno liofilizado y una muestra de piel liofilizada del mismo pescado utilizado en el proceso de extracción), utilizando las ecuaciones 1 y 2, respectivamente, obteniendo un rendimiento de extracción en base seca de $52.157\% \pm 20.164$ y en base húmeda de $17.493\% \pm 7.555$ como se observa en la Figura 16.

Figura 16

Rendimiento de extracción de colágeno de piel de tilapia roja.



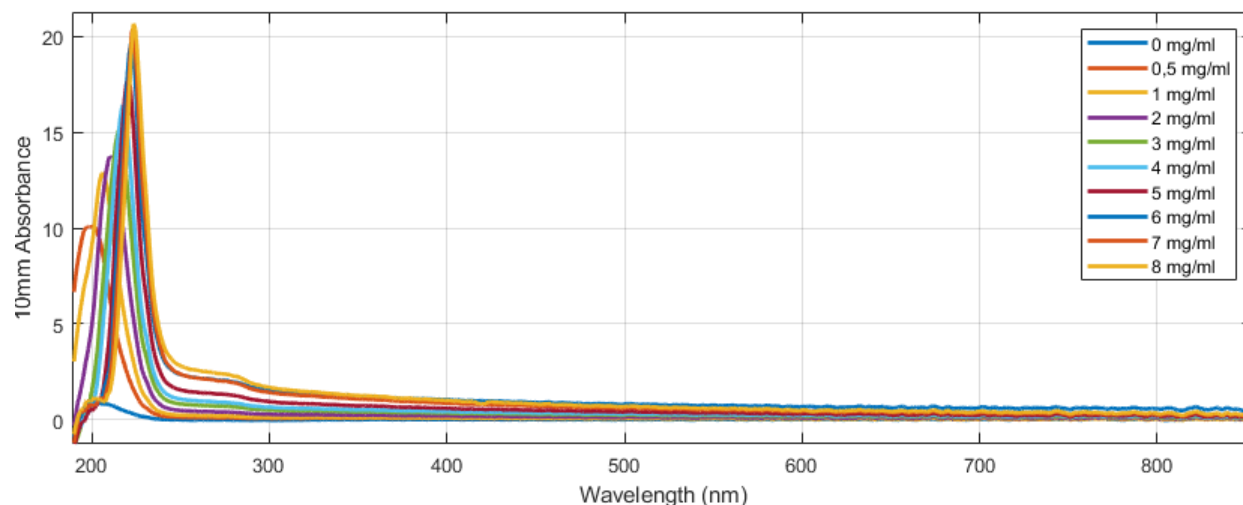
Nota. B. Seca significa el rendimiento de extracción en base seca y B. Húmeda significa el rendimiento de extracción en base húmeda.

Espectro De Absorción Ultravioleta (UV-VIS)

Con el objetivo de identificar el nivel de pureza del producto obtenido del proceso de extracción de colágeno de PT, se realizó la prueba de espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) para las soluciones de colágeno en diferentes concentraciones. Se obtuvo el espectro a un intervalo de frecuencias de onda de 190 a 900 nm (Figura 17) en donde se observan picos de absorbancia (reconocimiento de componentes) únicamente en los rangos 190 a 240 nm aproximadamente, denotando que la muestra no posee elementos que tengan su mayor pico de absorbancia en otras longitudes de onda, es decir, el colágeno obtenido tiene un alto nivel de pureza.

Figura 17

Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS) del colágeno obtenido.

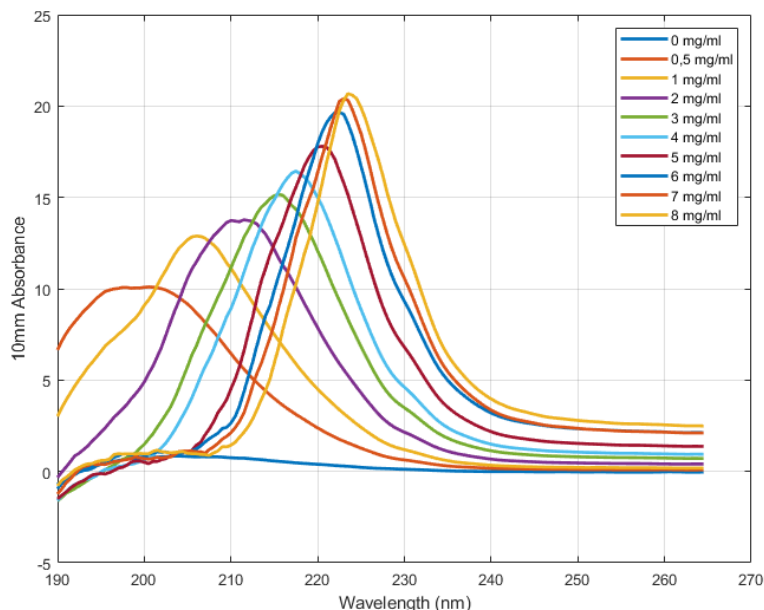


Para una mayor visualización de la información encontrada en las frecuencias 190 a 240 nm se realiza una nueva gráfica (Figura 18), en esta se puede evidenciar que se cumple con la ley de Lambert-Beer, en donde al aumentar la concentración de la muestra, aumentará la absorbancia de la misma. En cuanto a las frecuencias de onda, existen picos máximos de absorción desde 204

a 223.75 nm, siendo un valor similar al teórico de 222 nm para colágeno de piel de tilapia extraído con el método de colágeno solubilizado en ácido (B. Ge et al., 2020).

Figura 18

Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS) del colágeno obtenido para las frecuencias de onda de 190 a 260 nm.



Espectroscopia Infrarroja Por Transformada De Fourier Con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Adicional a la prueba UV-VIS, se llevó a cabo la prueba de FTIR-ATR para la caracterización fisicoquímica de la estructura y composición del producto extraído de la PT, con el fin de determinar el nivel de pureza o la calidad de dicho producto. Como resultado, se obtuvo el espectro FTIR-ATR a un intervalo de números de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , tal como se evidencia en la Figura 19. Cada pico en el espectro FTIR-ATR correspondió a la vibración de los grupos funcionales de la molécula de la muestra que se analizó, los cuales se identificaron mediante la base de datos del software OMNIC. Dicha muestra (colágeno liofilizado) exhibió principalmente cinco picos de transmitancia, los cuales correspondieron a los cinco enlaces

amídicos principales (ver Tabla 7) que representan la composición de aminoácidos de la molécula de colágeno (B. Ge et al., 2020).

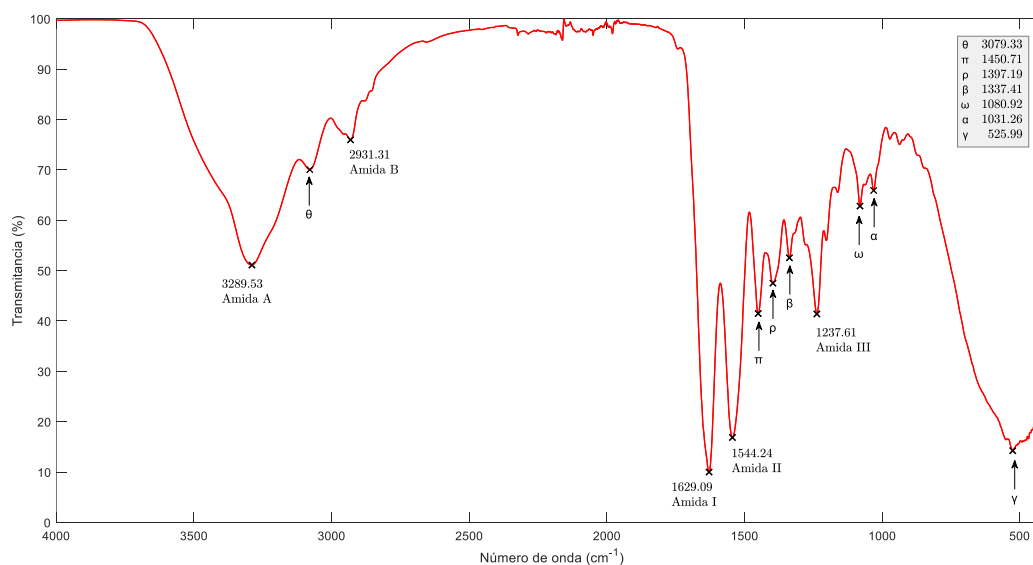
Tabla 7

Localización de los picos principales del espectro FTIR-ATR del colágeno liofilizado.

Región	Principales números de onda pico (cm^{-1})	Asignación (vibración y enlace)
Amida A	3289.53	Estiramiento de N–H
Amida B	2931.31	Estiramiento asimétrico y simétrico de CH ₂
Amida I	1629.09	Estiramiento de C=O
Amida II	1544.24	Curvatura de N–H
Amida III	1237.61	Estiramiento de C–N

Figura 19

Espectro FTIR-ATR del colágeno liofilizado extraído de la PT.



Nota. En la presente gráfica del espectro FTIR-ATR del colágeno liofilizado, adicional a los picos de interés descritos anteriormente, se identifican y etiquetan otros picos (o señales representativas) mediante letras griegas: θ para 3079.33 cm^{-1} ; π para 1450.71 cm^{-1} ; ρ para 1397.19 cm^{-1} ; β para 1337.41 cm^{-1} ; ω para 1080.92 cm^{-1} ; α para 1031.26 cm^{-1} ; y γ para 525.99 cm^{-1} . Estos

picos permiten identificar las vibraciones que presentaron los enlaces de otros grupos funcionales de la muestra evaluada, para posteriormente ser analizada y comparada con otros espectros FTIR.

Por último, el espectro FTIR de la muestra analizada (colágeno liofilizado) se comparó con múltiples espectros FTIR de la base de datos BioRad, la cual encontró un porcentaje de similitud superior al 96.21% con el espectro FTIR del HIPURE LIQUID GELATIN (HLG); esta base de datos reportó una descripción química como gelatina de teleósteos extraída de la piel de peces de agua fría; en la Figura 20 se presenta el espectro FTIR del HLG de BioRad y del colágeno liofilizado (muestra analizada), mientras que en la Tabla 8 se presentan los números de onda pico de interés de dichos espectros. Estos resultados, junto con los de UV-VIS, sustentaron que el producto extraído de PT en la presente investigación es principalmente colágeno.

Figura 20

Resultado de la búsqueda en la base de datos de BioRad para la identificación de la muestra analizada (colágeno liofilizado).

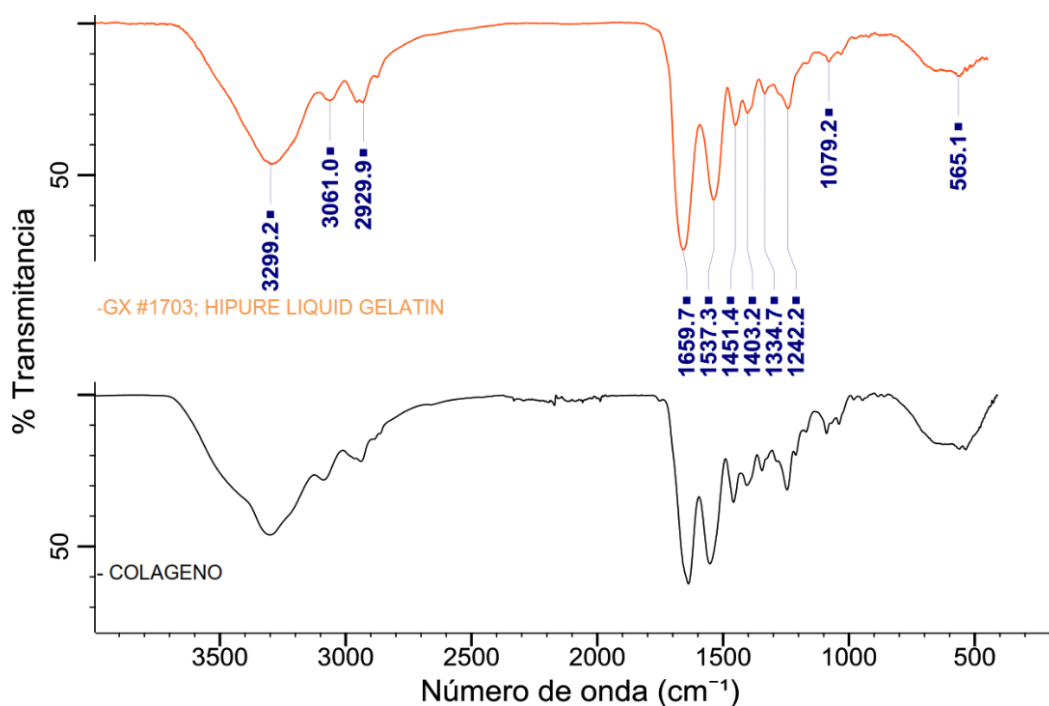


Tabla 8

Comparación entre los números de onda pico observados en el espectro FTIR del HLG de BioRad y en el espectro FTIR del colágeno liofilizado.

Señales	Regiones	Números de onda pico de interés (cm^{-1})	
		HLG	Muestra de colágeno liofilizado
A	Amida A	3299.2	3289.53
B	-	3061	3079.33
C	Amida B	2929.9	2931.31
D	Amida I	1659.7	1629.09
E	Amida II	1537.3	1544.24
F	-	1451.4	1450.71
G	-	1403.2	1397.19
H	-	1334.7	1337.41
I	Amida III	1242.2	1237.61
J	-	1079.2	1080.92
K	-	-	1031.26
L	-	565.1	525.99

Nota. Las señales mencionadas (de A – L) representan el orden (de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) en el que se identificaron los números de onda pico en los espectros FTIR. Las celdas vacías con un guion (-) indican que a los picos observados no se les asignó ninguna región, o que el espectro correspondiente no presentó una señal o pico representativo.

Síntesis Y Fabricación De Los Hidrogeles De Colágeno

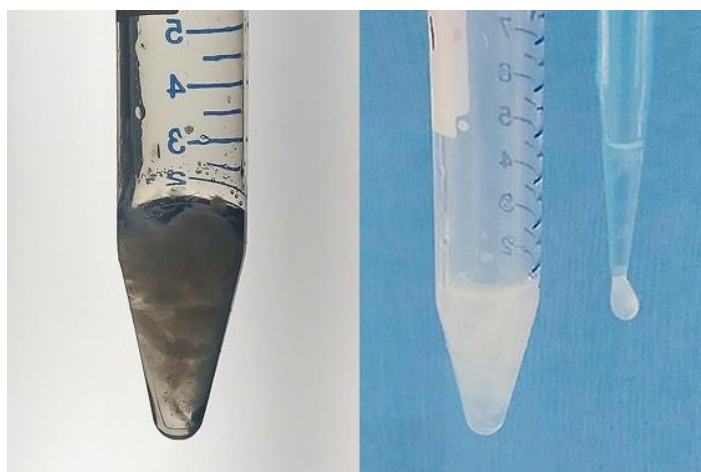
Inicialmente se realizó el proceso, preparando una solución stock para cada grupo de hidrogeles por separado, es decir, se preparó una solución stock de colágeno a 1.5, 3 y 5 mg/ml; para diluir y neutralizar el colágeno de cada concentración, se agregó NaOH, PBS y agua destilada, luego la mezcla obtenida se agregó a los platos de 48 pozos y se incubó a 37°C por 1 h.

Para la formación de los hidrogeles se agregó la solución stock de 8 mg/ml junto con el PBS, el NaOH y el agua destilada; cuando el proceso se realizó a temperatura ambiente, se

observó precipitación en la solución a modo de gelación, por lo que el colágeno no se mezcló con los otros componentes, dificultando su pipeteo por la obstrucción que se generaba en la boquilla (Figura 21) lo que no permitía agregarla en el plato para la formación de los hidrogeles. Con el fin de solventar la gelación prematura, la mezcla se realizó en una cama fría con dos pilas de agua previamente congeladas a -20°C y los componentes como el PBS, NaOH y agua destilada, se mantuvieron, previamente a su uso, a 4°C , sin embargo, dado que el proceso de gelación del colágeno se daba de manera instantánea, fue necesario añadir cada uno de los componentes rápidamente, con el fin de evitar la reticulación del colágeno presente en la mezcla, antes de su adición en cada uno de los platos de 48 pozos y se llevaron a incubar a 37°C con CO_2 del 5%, al igual que lo sugerido por otros autores (El-Rashidy et al., 2015; Grønlien, Pedersen, Rønning, Solberg, & Tønnesen, 2022; Osidak et al., 2020). Finalmente, se obtuvieron los hidrogeles presentados en la Figura 22 y Figura 23

Figura 21

Solución realizada a temperatura ambiente. Mezcla de colágeno, NaOH, PBS y agua destilada.



Nota. En la imagen de la izquierda se presenta la forma de visualización del colágeno precipitado; en la imagen de la derecha se presenta la obstaculización de la boquilla de la micropipeta durante el pipeteo de la muestra colapsada.

Figura 22

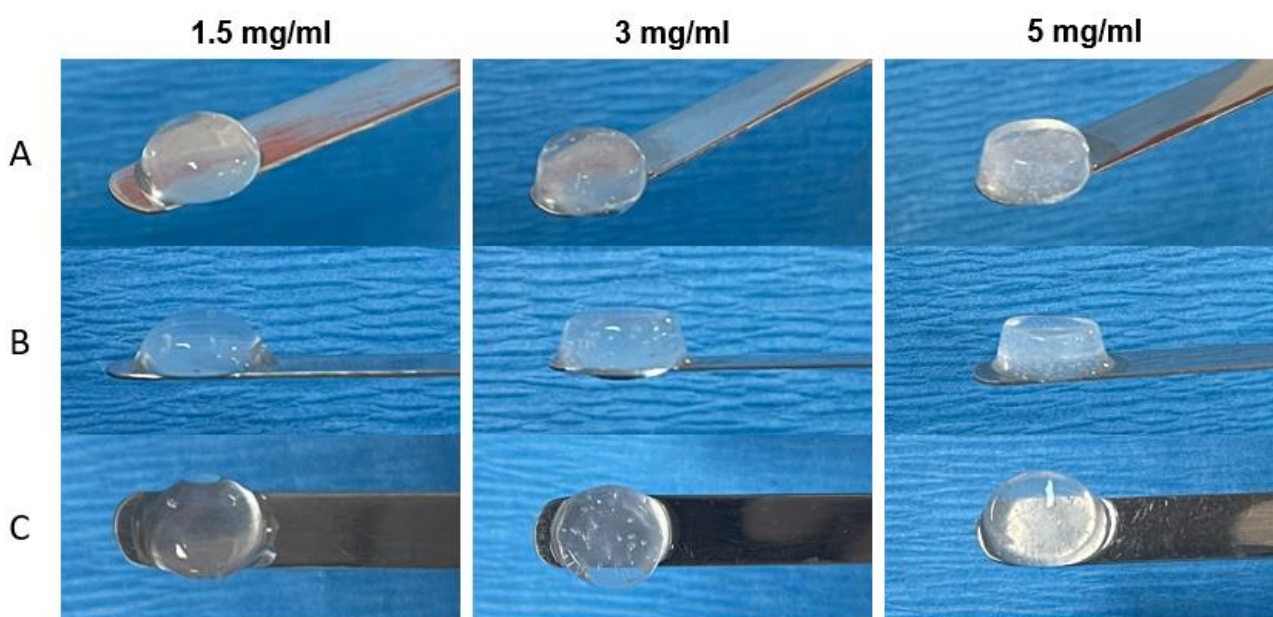
Hidrogeles de 1.5, 3 y 5 mg/ml en placa de 48 pozos.



Nota. En la primera fila de la primera a la quinta columna se encuentran los hidrogeles de 1.5 mg/ml; en la segunda fila, desde la primera hasta la quinta columna se encuentran los hidrogeles de 3 mg/ml; en la tercera fila, desde la primera hasta la cuarta fila se encuentran los hidrogeles de 5 mg/ml.

Figura 23

Hidrogeles de colágeno a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml.



Nota. Vista isométrica (A), lateral (B) y superior (C).

Es importante resaltar que los hidrogeles obtenidos presentaron una gran cantidad de microburbujas después de la incubación (Figura 22), por lo que se hicieron diferentes repeticiones realizando el proceso meticulosamente y centrifugando la solución stock de colágeno antes de la formación de los hidrogeles, de forma que la centrifugación facilitó el pipeteo de la misma y no se observaron microburbujas durante la mezcla de los componentes, sin embargo, al finalizar la incubación, sí se presentaron estas microburbujas en cada uno de los grupos de hidrogeles.

Caracterización Mecánica De Los Hidrogeles De Colágeno

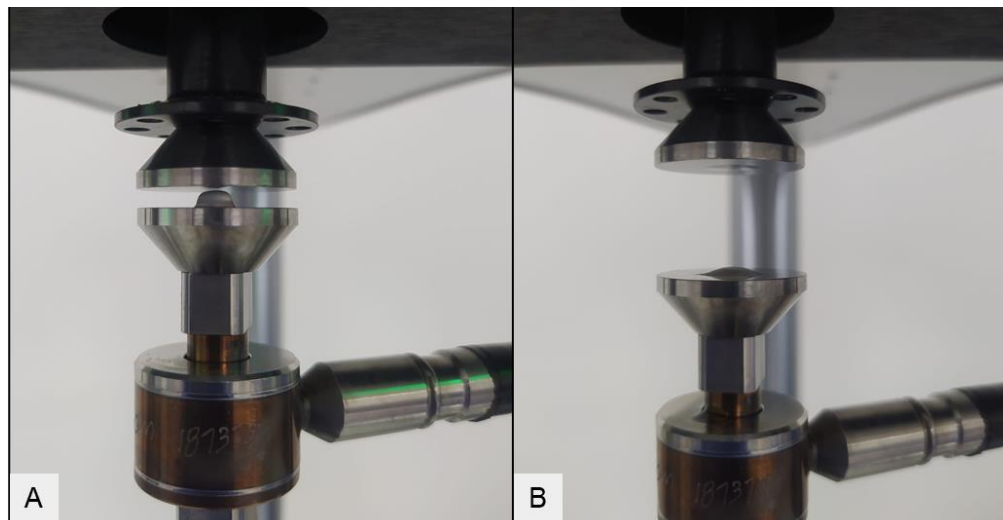
En esta sección se presentan los resultados obtenidos en las pruebas mecánicas de compresión (PMC) realizadas, con un total de tres repeticiones. En cada repetición se fabricaron tres grupos de hidrogeles de colágeno en forma de discos (de aproximadamente 8 mm de diámetro y 3.5 mm de grosor), que corresponden a las tres concentraciones definidas en secciones anteriores: 1.5, 3 y 5 mg/ml; en promedio, se fabricaron seis muestras independientes por concentración. Los hidrogeles fabricados se sumergieron en 1X PBS durante 30 min para eliminar el exceso de moléculas libres no reticuladas, tiempo considerablemente menor al definido inicialmente (24 h), el cual se adaptó del artículo (Raub et al., 2007), dado que los hidrogeles (para las tres concentraciones) se contraían en vez de hincharse, lo cual los hacía no aptos para las PMC.

Los ensayos de compresión se realizaron con el banco de carga ElectroForce 3500 Serie 3 equipado con una celda de carga de 2.5 N, hasta una compresión del 50% de la altura de los hidrogeles, con una velocidad de deformación de 0.05 mm/s. Al finalizar las pruebas, el banco de carga proporcionó los datos de carga (o fuerza) y desplazamiento, con los cuales se hizo el análisis y cálculos para obtener los valores de esfuerzo y deformación para cada hidrogel evaluado.

Mediante las PMC los hidrogeles de colágeno se caracterizaron mecánicamente, evaluando su capacidad de compresión a diferentes concentraciones, al ser sometidos a una fuerza de compresión. En la Figura 24 se presentan fotografías representativas del montaje de las PMC.

Figura 24

Fotografías representativas del montaje y la realización de las PMC.



Nota. (A) Fotografía antes de la ejecución de la PMC; (B) Fotografía posterior a la ejecución de la PMC.

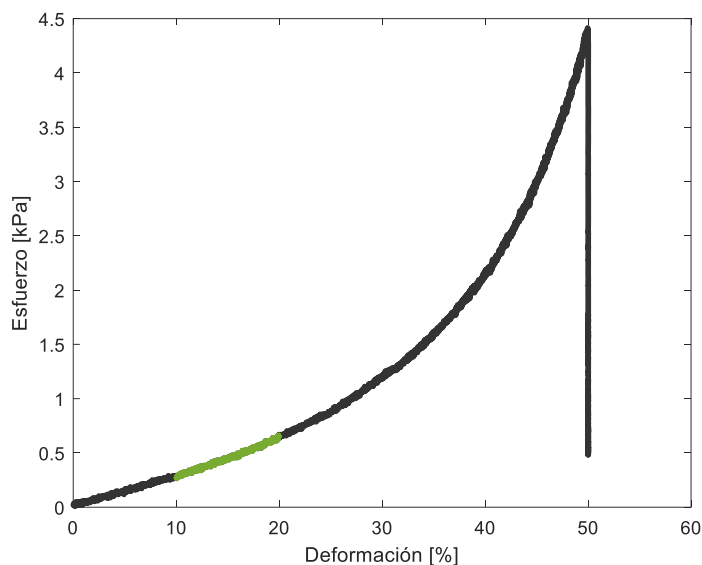
Al finalizar los ensayos de compresión, de manera cualitativa, los hidrogeles presentaban una consistencia semilíquida y endeble, siendo estas características inversamente proporcionales a la concentración del hidrogel, es decir, a menor concentración, el hidrogel presentaba una consistencia semilíquida y endeble aún mayor. Esto se produjo debido a la gran pérdida de agua que sufrieron los hidrogeles durante los ensayos de compresión.

En la Figura 25 se presenta una gráfica representativa de la curva de esfuerzo vs deformación para un hidrogel de colágeno obtenida a partir de las PMC. Esta gráfica representativa muestra el comportamiento que tuvieron los hidrogeles de colágeno al ser

sometidos a una fuerza de compresión hasta el 50% de deformación, evidenciándose dos regiones de deformación, una elástica y una plástica.

Figura 25

Gráfica de esfuerzo vs deformación representativa para un hidrogel de colágeno.



Nota. La presente gráfica es una curva representativa de los resultados obtenidos en las PMC. El segmento de la curva que está subrayado en color verde representa la porción lineal (de la región de deformación elástica) de la gráfica a la cual se le halló la pendiente para determinar el módulo de compresión. Las PMC se realizaron con una deformación por compresión del 50% y una velocidad de deformación de 0.05 mm/s e implementando una celda de carga de 2.5 N.

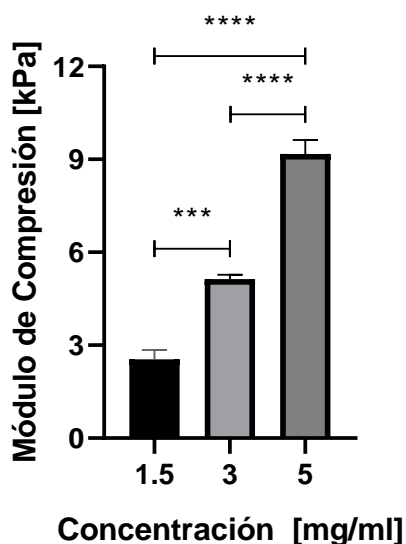
Asimismo, en la Figura 25 se evidenció que la rigidez de los hidrogeles aumentaba con la deformación (puesto que se presentaba un aumento gradual del esfuerzo), es decir, los hidrogeles oponían una mayor resistencia a medida que se deformaban, lo cual se traduce en un incremento del módulo de compresión. Para los tres ensayos realizados, el módulo de compresión se calculó analizando el intervalo del 10 al 20% de deformación (que corresponde a la región de

deformación elástica) de las curvas de esfuerzo vs deformación obtenidas para cada uno de los hidrogeles evaluados.

En la Figura 26 se muestran los módulos de compresión obtenidos para los hidrogeles de colágeno de 1.5, 3 y 5 mg/ml. Se observó que el módulo de compresión de los hidrogeles incrementaba a mayor concentración de colágeno, siendo los hidrogeles de 5 mg/ml los que presentaron el mayor módulo de compresión (equivalente a 9.174 kPa), los cuales mostraron una diferencia significativa respecto a los hidrogeles de 1.5 y 3 mg/ml ($p < 0.0001$, para ambas comparaciones). Adicionalmente, los hidrogeles de 5 mg/ml presentaron un módulo de compresión aproximadamente de 1.6 veces mayor que el obtenido para los hidrogeles de 3 mg/ml (5.13 kPa). Conjuntamente, se observó que los hidrogeles de 3 mg/ml presentaron un incremento de aproximadamente el doble en su módulo de compresión en comparación con los hidrogeles de 1.5 mg/ml (2.542 kPa, $p < 0.001$). Con estos resultados se logró determinar que es posible modular las propiedades mecánicas (módulo de compresión) de los hidrogeles de colágeno variando sus concentraciones.

Figura 26

Módulo de compresión de los hidrogeles de colágeno a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml



Nota. En la figura se presenta el módulo de compresión de los hidrogeles de colágeno para cada una de las concentraciones definidas: 1.5, 3 y 5 mg/ml. Los datos fueron reportados para $n = 5$ muestras independientes por concentración. Las diferencias estadísticas entre los grupos se representan como: *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Finalmente, se realizaron pruebas mecánicas de tensión (PMT) preliminares, pero se determinó que eran inviables, puesto que los hidrogeles de colágeno (de 1.5, 3 y 5 mg/ml) en forma de anillos presentaban una estructura bastante débil, no mantenían su forma, no eran consistentes y eran difíciles de manipular (ver Figura 28) ; esto impedía que el banco de carga realizara correctamente los ensayos de tensión con dichos hidrogeles, generándose bastante ruido en los datos obtenidos (ver Figura 27). Dicho ruido o dispersión de los datos representan altas variaciones en la fuerza que la celda de carga medía debido a la inestabilidad de los hidrogeles.

Figura 27

Gráfica representativa de la curva de esfuerzo vs deformación para las PMT.

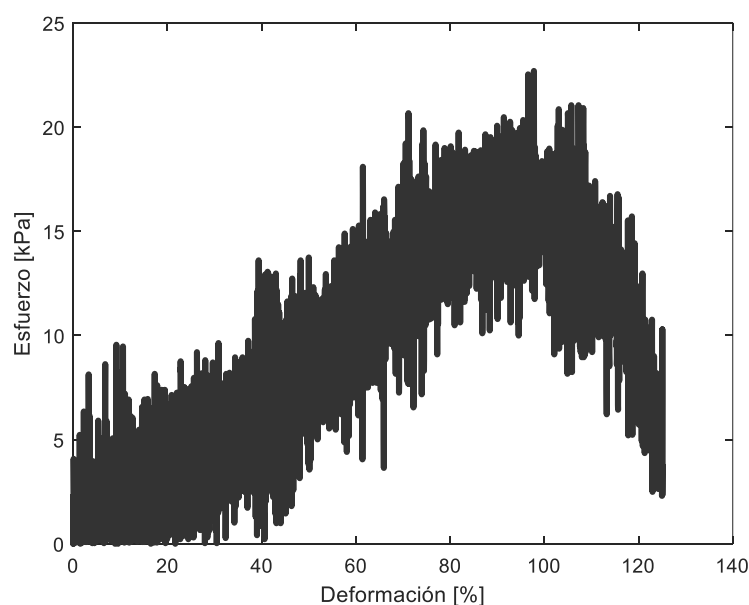
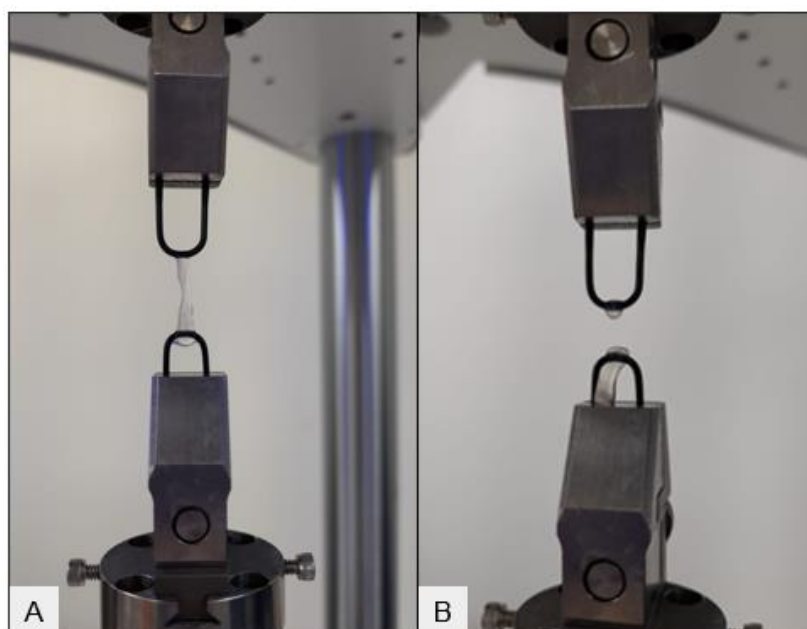


Figura 28

Fotografía representativa del montaje y la realización de las PMT.



Nota. (A) Fotografía antes de la ejecución de la PMT; (B) Fotografía posterior a la ejecución de la PMC.

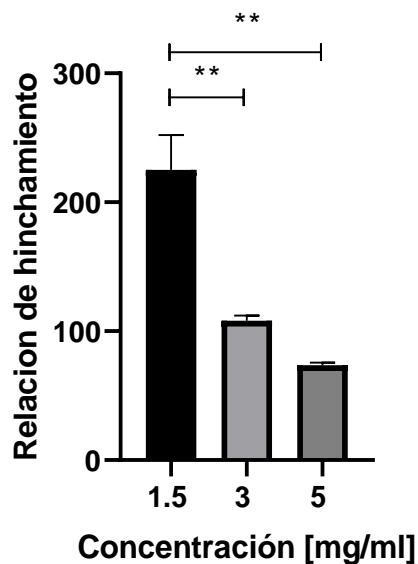
Evaluación De La Capacidad De Hinchamiento De Los Hidrogeles De Colágeno De PT

Para evaluar la capacidad de hinchamiento, se optó por analizar la relación de masa; entre la masa húmeda y la masa seca del hidrogel (ecuación 7), así como el contenido de agua (ecuación 8) y proteínas (ecuación 9) de los mismos. Por lo antes mencionado, los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Relación de hinchamiento. La relación de hinchamiento es la relación entre la cantidad de líquido que puede absorber el hidrogel y su peso seco. Se calculó esta relación con los pesos del hidrogel en estado hinchado y en estado seco, teniendo en cuenta la ecuación 7. Los resultados se reportan por concentración en la Figura 29.

Figura 29

Relación de hinchamiento de hidrogeles de colágeno.



Nota. En la figura se presenta la relación de hinchamiento (en gramos) de los hidrogeles de colágeno para cada una de las concentraciones definidas (1.5, 3 y 5 mg/ml). Las diferencias estadísticas entre los grupos se representan como: ** para $p < 0.01$.

Se obtuvo una relación de hinchamiento (en gramos) para los hidrogeles de 1.5, 3 y 5 mg/ml de 225.2 ± 46.81 , 108.04 ± 6.92 y 73.696 ± 3.43 , respectivamente. Al comparar por concentración, se observó una disminución en la relación de hinchamiento a medida que aumentaba la concentración de los hidrogeles, es decir, la mayor relación de hinchamiento se dio en los hidrogeles de 1.5 mg/ml, los cuales tuvieron una diferencia significativa con los hidrogeles de 3 y 5 mg/ml, en los que se observó que la relación de hinchamiento fue casi la mitad en los hidrogeles de 3 mg/ml ($p < 0.01$) y casi tres veces menor en los hidrogeles de 5 mg/ml ($p < 0.01$). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre los hidrogeles de 3 y 5 mg/ml ($p=0.341$).

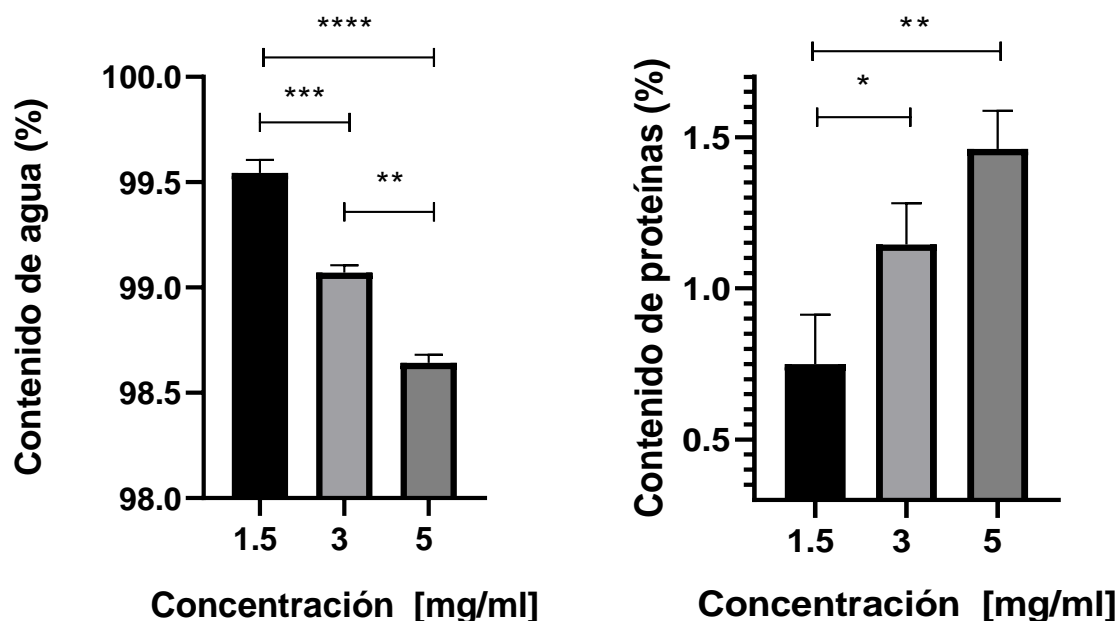
Capacidad de hinchamiento. Para evaluar la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de colágeno de PT se realizaron los cálculos del contenido de agua y el contenido de proteínas, de acuerdo con las ecuaciones 9 y 10.

Los resultados del contenido de agua (en gramos) de los hidrogeles, de acuerdo con la concentración de colágeno, se presentan en la Figura 30, en donde se pudo observar que los hidrogeles de 1.5, 3 y 5 mg/ml tuvieron un contenido de agua alrededor de $99.543\% \pm 0.1\%$, $99.07\% \pm 0.06\%$ y $98.643\% \pm 0.06\%$, respectivamente. Esto indica que el contenido de agua fue significativamente mayor en los hidrogeles de 1.5 mg/ml que en los de 5 mg/ml ($p < 0.0001$) y en los de 3 mg/ml ($p < 0.001$); también, al comparar los hidrogeles de 3 y 5 mg/ml, se observó una diferencia significativa entre los mismos ($p < 0.01$). Esta disminución en el contenido de agua a medida que se aumentaba la concentración de los hidrogeles se pudo dar por la formación de una red entrecruzada más densa, con mayor número de enlaces y entrecruzamiento.

Por otro lado, los resultados del contenido de proteínas (en gramos) de los hidrogeles de colágeno se presentan en la Figura 30, en donde se observó que los hidrogeles de 1.5, 3 y 5 g/ml tuvieron un contenido de proteínas de 0.785 ± 0.16 g, 1.145 ± 0.13 g y 1.461 ± 0.12 g, respectivamente. Se observó una tendencia de aumento ligada a la concentración, por lo que el mayor contenido de proteínas se obtuvo en los hidrogeles de 5 mg/ml, los cuales, al compararlos con los hidrogeles de 1.5 y 3 mg/ml, presentaron una diferencia significativa con los primeros ($p < 0.01$) pero no con los segundos ($p = 0.077$), también, al comparar el contenido de proteínas entre los hidrogeles de 1.5 y 3 mg/ml, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Figura 30

Contenido de agua y proteínas de los hidrogeles de colágeno.

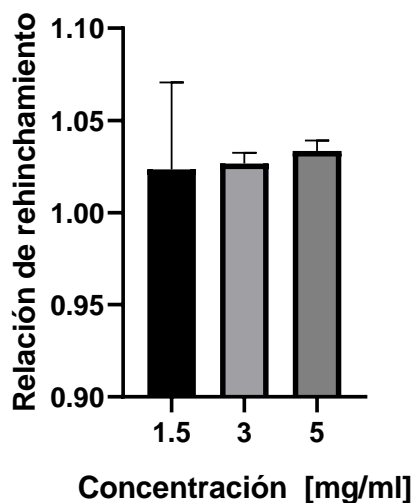


Nota. En la figura se presenta el (A) Contenido de agua y (B) Contenido de proteínas de los hidrogeles de colágeno para cada una de las concentraciones definidas (1.5, 3 y 5 mg/ml). Las diferencias estadísticas entre los grupos se representan como: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

En adición, se evaluó la capacidad de rehinchamiento de los hidrogeles de colágeno, con el fin de conocer la capacidad del hidrogel para absorber líquido después de ser liofilizados, sin embargo, los valores de rehinchamiento estuvieron en el rango entre 1 y 1.2, con una relación en gramos, por lo que es posible concluir que los hidrogeles no tuvieron la capacidad de reabsorber agua, ni de recuperar su peso inicial (Figura 31).

Figura 31

Relación de rehinchamiento de los hidrogeles de colágeno.

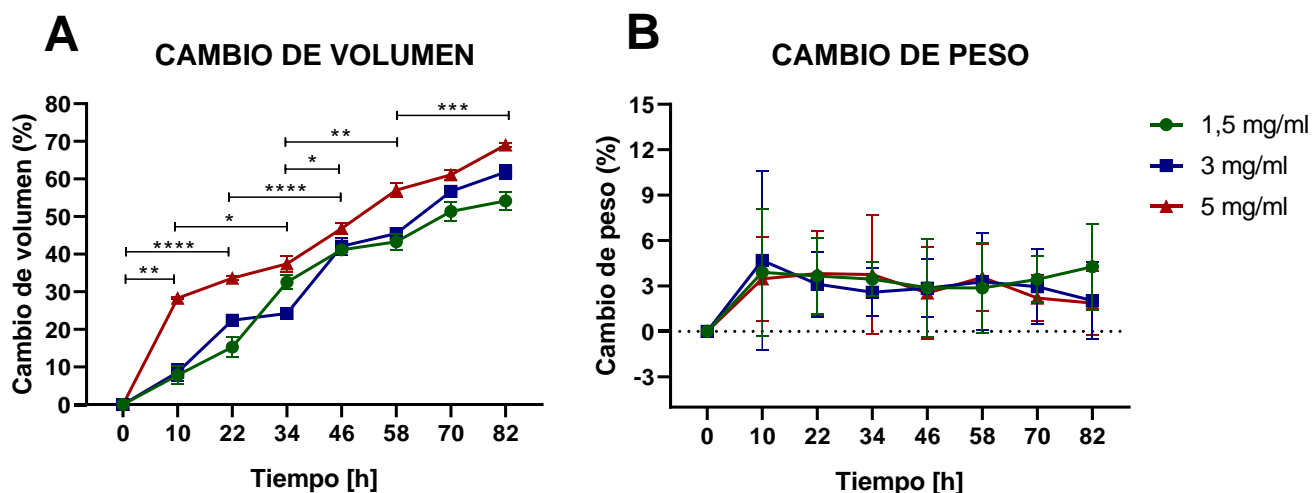


Contracción De Los Hidrogeles De Colágeno

En la prueba de contracción se evaluó el cambio de las propiedades de volumen y peso de los hidrogeles al aumentar el tiempo de incubación, se hizo un seguimiento de las propiedades en lapsos aproximados de 12 h hasta completar 82 h. Luego se calculó el cambio de volumen y peso utilizando las ecuaciones 11 y 12, respectivamente, obteniendo las gráficas de la Figura 32.

Figura 32

Prueba de contracción: cambios de volumen (A) y peso (B).



Nota. Los datos fueron reportados para $n = 4$ muestras independientes por tiempo de estudio. Las diferencias estadísticas entre los grupos se representan como: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

A partir de los resultados obtenidos, se evidencia en la Figura 32 que los hidrogeles disminuyeron su tamaño al aumentar el tiempo de incubación, reduciéndose a más de la mitad de su volumen inicial. Al comparar por concentración, se observó una tendencia de disminución de volumen a medida que aumentaba la concentración de colágeno en los hidrogeles, siendo los hidrogeles de 5 mg/ml los que presentaron una mayor reducción de volumen, llegando hasta una reducción de casi el 70% con respecto a su volumen inicial; y siendo los de 1.5 mg/ml los que menos se contrajeron llegando hasta una reducción de casi el 50% con respecto a su volumen inicial. Se presentaron diferencias significativas en el cambio de volumen de los hidrogeles cada dos lecturas para las tres concentraciones ($p < 0.0001$).

En cuanto al cambio de peso, se evidencia un aumento considerable en los hidrogeles en el intervalo del tiempo 0 al tiempo 1 (10 horas) debido a la adición de PBS en el medio de incubación, haciendo que los hidrogeles absorban este líquido e incrementen su peso. En los demás seguimientos no se apreció una diferencia significativa entre los pesos de los hidrogeles. Al comparar por concentración, no se presentó una diferencia significativa entre el cambio de peso con la concentración de colágeno en los hidrogeles.

Evaluación De La Viabilidad Celular En Productos Derivados Del Colágeno De PT

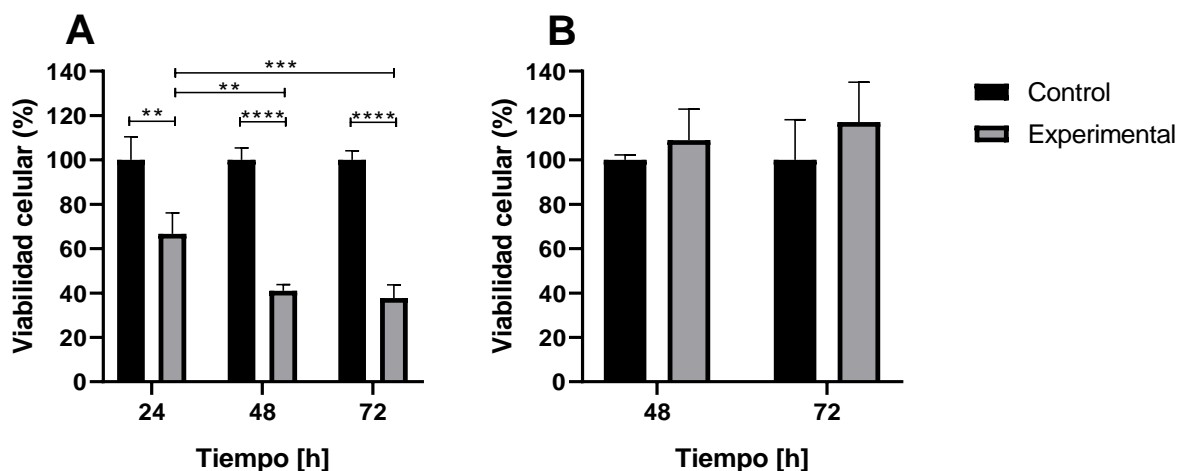
Como se mencionó en la sección metodológica del presente estudio, se realizaron pruebas de citotoxicidad para dos productos derivados del colágeno extraído de la PT, siendo estos el colágeno de PT diluido en ácido acético al 0.02 N y el lixiviado de los hidrogeles de colágeno de PT, los resultados de estas pruebas se presentan en la Figura 33. El porcentaje de viabilidad

celular obtenido en la prueba de recubrimiento para tiempos de cultivo continuo de 24, 48 y 72 h, se presenta en la Figura 33, en donde se observó que a comparación del grupo control, la cantidad de células vivas en el grupo experimental es considerablemente menor ($p < 0.01$) en los tres tiempos de estudio (siendo $66.667\% \pm 18.89$ para 24 h, $40.973\% \pm 5.756$ para 48 h y $37.710\% \pm 11.850$ para 72 h), especialmente desde el segundo día de cultivo en donde se presentó una reducción de la población celular mayor al 50%. Dando seguimiento al grupo experimental se observó que hay una diferencia significativa entre el primer y segundo día de cultivo ($p < 0.01$) pero no entre el segundo y el tercero ($p = 0.9743$).

Por otro lado, aunque la Figura 33 parece indicar que la viabilidad celular del grupo experimental en la prueba con el lixiviado del hidrogel es ligeramente mayor al grupo control (con $114.941\% \pm 8.566$ para 48 h y $123.022\% \pm 16.504$ para 72 h), no se presentó ninguna diferencia significativa ($p > 0.9999$) entre estos ni entre los tiempos de estudio para cada grupo. Cabe destacar que para esta prueba no se agregaron los resultados correspondientes al tiempo de cultivo de 24 h debido a que se catalogaron como valores atípicos acorde al criterio de Chauvenet, esto pudo deberse a errores en la ejecución del protocolo.

Figura 33

Viabilidad celular del lixiviado de hidrogeles de PT y del colágeno de PT diluido en ácido.



Nota. En la figura se presenta el porcentaje de viabilidad celular con (A) el colágeno de PT diluido en CH_3COOH al 0.02N y (B) el lixiviado del hidrogel de colágeno de PT. Los datos fueron reportados para $n = 4$ muestras independientes por tiempo de estudio. Las diferencias estadísticas entre los grupos se representan como: ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Análisis De Resultados

Uno de los objetivos de la ingeniería de tejidos es la búsqueda de nuevos biomateriales para la implementación en métodos terapéuticos, esto es porque pueden ser utilizados como soporte para el crecimiento y diferenciación celular en la cicatrización de los tejidos de un organismo vivo (Dolcimascolo, Calabrese, Conoci, & Parenti, 2018). Algunas de las características esenciales de los biomateriales es proporcionar estabilidad mecánica durante la regeneración celular y ser biocompatible con el tejido nativo, no obstante, cada biomaterial presenta diferentes propiedades mecánicas y biológicas, por lo que es de vital importancia una caracterización del mismo (Kumar & Sindhu, 2018). En este contexto, en el presente estudio se caracterizaron algunas propiedades mecánicas, físicas y biológicas de los hidrogeles de colágeno extraídos de PT, tales como el módulo de compresión, relación de hinchamiento, contenido de agua, contenido de proteínas, propiedades de contracción y biocompatibilidad de hidrogeles a diferentes concentraciones del colágeno extraído.

Con el protocolo de extracción de colágeno de PT descrito en el presente estudio se obtuvo un rendimiento cercano al 50% (en base seca), siendo mayor que lo reportado por otros autores como Diego Giraldo en Medellín con 20.2% (Giraldo Ríos, 2019); Jenifer Serrano en Bogotá con 33.3% (Serrano Gaona, 2011); Shao-kui Zeng en China con 39.4% (Zeng et al., 2009) y Treessin

Potaros en Tailandia con 38.27% (Potaros et al., 2009). Este colágeno presentó un pico de absorción máxima entre las frecuencias de onda 204 a 223.75 nm para concentraciones de colágeno de 0.5 a 8 mg/ml, lo cual se asemeja a lo reportado por otros autores como Sun et al. con 221 nm y Ge et al. con 222 nm (Baosheng Ge et al., 2020; Sun et al., 2020) esto muestra que el producto obtenido tiene un gran nivel de semejanza a lo reportado en la literatura, como también, presenta el pico de absorción máxima diferente a los 280nm, en el que usualmente lo presentan las proteínas, esto es debido al bajo contenido de tirosina y fenilalanina, características del colágeno, como lo ha reportado por Ge et al. (B. Ge et al., 2020).

Adicionalmente, en las pruebas FTIR-ATR realizadas para una profunda caracterización del colágeno extraído, se obtuvieron e identificaron los cinco principales picos de transmitancia correspondientes a los cinco enlaces amídicos principales: amida A, amida B, amida I, amida II y amida III (ver Figura 19 y Tabla 7), que representan la composición de aminoácidos de la molécula de colágeno (B. Ge et al., 2020). La característica de transmitancia de la banda de la amida A está comúnmente asociada con las vibraciones de estiramiento del N–H que se producen generalmente en el intervalo de $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$. Pero, cuando el grupo N–H participa en enlaces de hidrógeno en el péptido, la posición de la amida A se desplaza a números de onda más bajos, normalmente 3300 cm^{-1} (Liao, Guanghua, Li, Shen, & Li, 2018), lo cual explica el número de onda obtenido en la banda de la amida A (3289.53 cm^{-1} , ver Figura 19). En la banda de la amida B se obtuvo un pico de transmitancia alto en 2931.31 cm^{-1} , lo que indica la vibración de estiramiento asimétrica y simétrica de CH_2 . Las bandas de las amidas I, II y III, conocidas por ser responsables del grado de orden molecular que se encuentra en el colágeno y por participar en la formación de su estructura de triple hélice (Liao et al., 2018; W.-K. Song, Liu, Sun, Li, & Hou, 2019) se atribuyeron a la vibración de estiramiento de C=O, a la vibración de flexión o curvatura

de N–H y a la vibración de estiramiento de C–N, respectivamente. De igual forma, si estos picos principales se desplazaran a números de onda más bajos, indicaría que existen mayores interacciones con enlaces de hidrógeno en el péptido (Tian et al., 2021).

Por otro lado, el espectro FTIR de la muestra analizada (colágeno liofilizado) se comparó con múltiples espectros FTIR de la base de datos BioRad, la cual encontró un porcentaje de coincidencia superior al 96.21% con el espectro FTIR del HLG. Como se mencionó en secciones anteriores, el HLG es gelatina, por lo tanto, este porcentaje de similitud se debió a que la gelatina es un producto derivado de la hidrólisis parcial del colágeno y, consecuentemente, presenta una disminución en la interacción implicada en los enlaces de hidrógeno en su estructura, es decir, la gelatina presenta menos enlaces de hidrógeno en su estructura (Karim & Bhat, 2009); esto explica por qué el espectro FTIR del HLG de BioRad presenta, en la mayoría de sus picos, números de onda más altos a comparación con el espectro FTIR del colágeno liofilizado extraído de PT (ver Figura 19, Figura 20 y Tabla 8).

Adicionalmente, de acuerdo con diferentes artículos de investigación consultados, en los que trabajaron con muestras de colágeno tipo I extraído de PT, reportan espectros FTIR similares al obtenido en la presente investigación (ver desde el Anexo A hasta el Anexo D), evidenciándose números de onda para la amida A, B, I, II y III en intervalos de $3440\text{-}3285\text{ cm}^{-1}$, $2943\text{-}2932\text{ cm}^{-1}$, $1678\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$, $1546\text{-}1554\text{ cm}^{-1}$ y $1244\text{-}1236\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Junde Chen et al., 2016; B. Ge et al., 2020; J. Li et al., 2018; Liao et al., 2018; Menezes et al., 2020; W.-K. Song et al., 2019; Tian et al., 2021). Por lo antes expuesto y en conjunto con los resultados de las pruebas de UV-VIS, es posible dilucidar que el producto extraído de PT en la presente investigación es principalmente colágeno tipo I.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de las PMC, se evidenció que el módulo de compresión y la concentración de los hidrogeles estaban relacionados linealmente, es decir, el módulo de compresión incrementaba linealmente a medida que aumentaba la concentración de los hidrogeles (con diferencias significativas entre todos los grupos de concentraciones). Esta correlación positiva entre la concentración del hidrogel y el módulo de compresión también se presentó en un estudio realizado por Kreger S. T. en 2010, en el que documentaron que el módulo de compresión incrementó (de 5.31 a 42.8 kPa) cuando la concentración de colágeno aumentó de 0.5 a 4 mg/ml, evidenciándose, al igual que en la presente investigación, un comportamiento lineal entre estas variables (Kreger et al., 2010). Por otro lado, en un artículo publicado por Elizabeth E. Antoine en 2015, evidenciaron un incremento en el módulo de compresión (de 1.473 a 5.655 kPa) en hidrogeles de colágeno al aumentar las concentraciones de los mismos (de 4 a 10 mg/ml), aunque no se presentó un comportamiento lineal entre estas variables (Antoine, Vlachos, & Rylander, 2015). Finalmente, de acuerdo con la literatura y con lo obtenido en el presente estudio, se observó que es posible modular las propiedades mecánicas de hidrogeles de colágeno modificando sus concentraciones, tal como se describe en la teoría, puesto que, al aumentar la concentración de colágeno la densidad de las fibrillas aumenta, y, por lo tanto, habrá un mayor número de entrecruzamientos interfibrilares, provocando un aumento en la rigidez del andamio, lo que se traduce en un incremento del módulo de compresión. (Kreger et al., 2010; Sohuts kay, Puls, & Voytik-Harbin, 2020)

En este orden de ideas, conocer las propiedades mecánicas de los andamios (como el módulo de compresión), según su aplicación en la ingeniería de tejidos, es de clave utilidad para regular la respuesta celular, como la adhesión, la diferenciación, la morfología y la migración (Antoine et al., 2015); por tal razón, al diseñar hidrogeles, es importante que sus propiedades

mecánicas sean similares a las del tejido nativo para establecer un entorno favorable para la regeneración del tejido, ya que se proporcionarían las señales adecuadas para impulsar el comportamiento celular (Antoine et al., 2015; Raia, McGill, Marcet, Vidal Yucha, & Kaplan, 2020). En la literatura se han reportado diferentes módulos de Young de la piel humana utilizando una gran variedad de técnicas, tales como tensión, torsión, succión e indentación. En general, se ha encontrado que para los ensayos de torsión el módulo de Young de la piel oscila entre 0.42 y 0.85 MPa; y para los ensayos de succión el módulo de Young fluctúa entre 0.05 y 0.15 MPa (Pawlaczyk, Lelonkiewicz, & Wieczorowski, 2013). Por otro lado, de la técnica por indentación varios autores han reportado módulos de Young similares: Pailler Mattei et al. reportó un módulo de Young entre los 5.4 a 12.3 kPa (que varía con la edad), conferido principalmente a la capa de la dermis de la región anterior del antebrazo (Pailler-Mattei, Debret, Vargiolu, Sommer, & Zahouani, 2013); mientras que Ana Saavedra et al. documentó un módulo entre los 18 a 112 kPa para la capa de la dermis de la región anterior del muslo (Saavedra, Arroyo, Zvietcovich, Lavarello, & Castaneda, 2018). Por lo anterior, es difícil establecer un punto de comparación con los resultados obtenidos de las PMC (de 2.542 a 9.174 kPa) en el presente estudio, dadas las discrepancias entre la metodología implementada para la obtención del módulo de compresión de los hidrogeles del presente estudio y las diferentes técnicas reportadas para la obtención del módulo de Young de la piel. A pesar de eso, si se compara con lo reportado de la técnica de indentación, se podría afirmar que los hidrogeles evaluados en el presente estudio podrían llegar a ser adecuados para tratar quemaduras de primer y/o segundo grado en la región anterior del antebrazo y/o muslo, dado que las propiedades mecánicas obtenidas se asemejan a las de las capas de la piel (de dichas regiones) afectadas por quemaduras de segundo grado.

Los resultados de los ensayos de hinchamiento demostraron que, al aumentar la concentración de los hidrogeles, disminuía la relación de hinchamiento de estos, como se observa en la Figura 29. La relación de hinchamiento para los hidrogeles de 1.5 mg/ml presentó el doble del valor obtenido para los hidrogeles de 3 mg/ml y casi tres veces mayor que el obtenido para los hidrogeles de 5 mg/ml. Según Chuang et al. en su artículo de 2018, reportan que la relación de hinchamiento de los hidrogeles de colágeno funcionalizados con calcio de menor concentración (0.15 %) fue 3.4 veces mayor que la de los hidrogeles de mayor concentración (0.6 %) y Tytgat et al. en su artículo del 2019 reportan una disminución de casi seis veces la relación de hinchamiento entre los hidrogeles de menor concentración (5%) y los hidrogeles de mayor concentración (10%) (Chuang, Lin, Melero-Martin, & Chen, 2018; Tytgat et al., 2019). De acuerdo con lo antes mencionado, los hidrogeles presentados en este estudio se encuentran dentro de lo esperado y reportado en la teoría, dado que, al aumentar la concentración de colágeno, la absorción de agua será menor debido a que el colágeno presente en los hidrogeles aumenta su organización y se agrupa en fibras más cortas y más densas, lo que disminuye el tamaño de los poros y por ende el paso del agua al hidrogel (Chuang et al., 2018); dado que la relación de hinchamiento es la relación entre el contenido de agua y proteínas, esta disminuirá al aumentar la concentración. (Chuang et al., 2018)

También se evaluó el porcentaje de contenido de agua de los hidrogeles, a partir de los cuales fue posible identificar que el mayor valor se obtuvo en los hidrogeles de 1.5 mg/ml con un $99.543\% \pm 0.1\%$, seguido de los hidrogeles de 3 mg/ml con $99.07\% \pm 0.06\%$ y finalmente, los de 5 mg/ml con un $98.643\% \pm 0.06\%$, de lo anterior fue posible establecer que el contenido de agua se mantuvo en un intervalo entre 98.6% y 99.5%. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Baosheng et al en su artículo del 2020 (B. Ge et al., 2020), en donde reportan un contenido de

agua en el intervalo de 98-100% para hidrogeles de colágeno de PT con concentraciones entre 5 y 20 mg/ml, a partir de estos resultados concluyen que estos hidrogeles tienen un adecuado contenido de agua para su aplicación en quemaduras, por lo que, teniendo esto en cuenta y de acuerdo con lo reportado por Ramírez Arnaldo et al, es posible afirmar que los hidrogeles presentados en este estudio pueden imitar de cerca el entorno acuoso de la matriz extracelular (ECM) y son capaces de absorber una gran cantidad de agua, lo cual resulta altamente benéfico, puesto que esta propiedad favorece su biocompatibilidad, permite reducir la irritación producida al contacto del material con los tejidos, así como también disminuye la desnaturalización de proteínas (B. Ge et al., 2020; Ramirez, Benítez, Rojas de Astudillo, & Rojas de Gáscue, 2016) .

Asimismo, se analizó el contenido de proteínas de los hidrogeles de colágeno (observar Figura 30), de forma que, el mayor contenido se dio en los hidrogeles de 5 mg/ml y disminuyó a medida que disminuía la concentración. Aunque se esperaba esta tendencia al agregar una mayor cantidad de solución de colágeno para la preparación de los hidrogeles, también se esperaban valores menores en la teoría (0.68, 1.35 y 2.25 g para los hidrogeles de 1.5, 3 y 5 mg/ml, respectivamente), por lo que es posible inferir que el contenido del peso seco no son solo proteínas. Es posible hipotetizar que este aumento en el contenido de proteínas se dio por el uso de PBS durante el proceso de preparación de la solución para los hidrogeles, dado que el PBS contiene sales que no se eliminan durante el proceso de liofilización, por lo que las mismas pueden influir en el peso seco del hidrogel, generando un aumento en los valores de contenido de proteínas en los hidrogeles.

Por otro lado, la tasa de contracción de los materiales juega un papel importante al utilizarse en la ingeniería de tejidos porque pueden ocasionar algunos problemas graves como la deformación del hidrogel, el colapso o incluso el impedimento de la adhesión y posterior

crecimiento de células, inhabilitando una gran gama de aplicaciones en esta área (Ru et al., 2015). En el presente estudio se observó una reducción de más del 50% del volumen en los hidrogeles de las tres concentraciones de colágeno a las 82 horas (3.4 días) de incubación (Figura 33), lo cual se asemeja al resultado obtenido por Fang et al., quienes reportaron una reducción del volumen del 55% a la semana de incubación y del 85% a la tercera semana (Fang, 2018); Souren et al. afirma que la contracción de las fibras de colágeno se da cuando son expuestas a altas temperaturas (mayores a 35 °C) por un tiempo prolongado, sus puentes de hidrógeno intramolecular se quiebran, produciendo la contracción o reducción y, por ende, haciendo que el hidrogel reduzca su tamaño (Souren, Schneijdenberg, Verkleij, & van Wijk, 1992); el hidrogel al contraerse disminuye sus propiedades mecánicas, reflejándolo en un posterior cambio de forma y tamaño del andamio, afectando el rendimiento que pueda tener en el proceso de regeneración tisular (Roldán Vasco, 2016). No obstante, esta propiedad se puede controlar al adicionar otros componentes como lo demostró Fang et al. en su artículo de 2018, al agregar diferentes concentraciones de polietilenglicol diacrilado (PEGDA) a los hidrogeles de colágeno, logrando una disminución considerable de la tasa de contracción, alcanzando una reducción de volumen del 15% para la primera semana de incubación, permitiendo su uso en aplicaciones como suministro progresivo de medicamentos o la regeneración de tejidos por medio de liberación de nutrientes de manera controlada.

Con el fin de estudiar la viabilidad biológica del colágeno extraído en el presente estudio, se llevó a cabo la prueba de recubrimiento de la superficie de cultivo celular con el colágeno obtenido, en donde se observó, una disminución significativa en la viabilidad celular de los fibroblastos HT1080 en el transcurso del tiempo de cultivo continuo, estos resultados antes mencionados se asemejan con lo reportado en diferentes estudios en los que emplean tanto

colágeno de PT, (por Lifeng Xu et al), como colágeno de piel de pescado (Song W.H. et al), en donde para concentraciones desde 0.0125 hasta 2mg/ml reportan una disminución en el porcentaje de viabilidad, que en algunos de los casos, se reduce desde el 100% hasta un 60%, por lo que conjeturan que, a mayores concentraciones de colágeno, la viabilidad celular disminuye dado que se desencadena un mecanismo de retroalimentación negativa en las células que provoca la supresión de la proliferación (C. Liu & Sun, 2014; Xu et al., 2021), también, los resultados en el presente estudio se asemejan con lo reportado por Song W.H. et al, en donde a concentraciones mayores a 0.08% (hasta 0.2%) y tiempos de cultivo entre 24 y 48 h, a pesar de que se mantiene una viabilidad superior al 100% con el aumento del tiempo, esta disminuye en comparación a la obtenida a una concentración de 0.08% (W. H. Song et al., 2022). Por lo antes mencionado es posible conjeturar que con el aumento de la concentración de colágeno se puede producir una disminución de la viabilidad celular, sin embargo, en la teoría, a pesar de que la viabilidad disminuye, se mantiene en rangos alrededor de 100 y 60%, los resultados del presente estudio se encuentran entre $66.66\% \pm 18.89$ y $40.973\% \pm 5.75$, para tiempos de cultivo entre 24 y 48 h respectivamente. Adicionalmente, es posible que la disminución en la viabilidad se pudiera dar por el uso de ácido acético al 0.02 N al preparar la solución de colágeno para la prueba (ya que en la documentación citada, emplean diferentes componentes como el DMEM), esto dado que es posible que se haya generado un ambiente extracelular ácido causando la activación de algunos genes involucrados con factores pro-metastásicos que favorecen la muerte celular (Jiménez-Delgadillo, Valdés-Rodríguez, Olalde-Portugal, Abraham-Juárez, & García-Hernández, 2018), sin embargo, cabe resaltar que se lavó la superficie de los pozos con PBS para retirar el ácido. También, es posible que, dado que las líneas celulares presentadas en la teoría son diferentes, esto haya influido en la diferencia entre los porcentajes obtenidos en el presente proyecto.

Adicionalmente, se evaluó la citotoxicidad del lixiviado, en la cual, de acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 33), se pudo observar que la viabilidad de los fibroblastos HT1080 tuvo una variación sin una diferencia significativa luego de exponer el lixiviado a las células por 48 y 72 h, con valores alrededor de $114.941\% \pm 8.566$ y $123.022\% \pm 16.504$, respectivamente, siendo similares con lo reportado en son consistentes con lo reportado en diferentes artículos, en que emplean tanto colágeno de PT (Ge et al), como colágeno de escamas de PT (Rashidy A. et al), en donde demostraron que la viabilidad celular del lixiviado de hidrogeles de colágeno, aumentó con el aumento del tiempo (para concentraciones entre 0.3 y 20 mg/ml), obteniendo valores superiores al 120 % en tiempos de 48 a 72h , por lo que concluyen que el lixiviado no presentó un efecto citotóxico, sino una proliferación celular con el aumento del tiempo (El-Rashidy et al., 2015; B. Ge et al., 2020). Por lo antes mencionado, es posible conjeturar que el extracto de los hidrogeles de PT no es citotóxico; al presentar una viabilidad celular superior al 100% (con respecto al grupo control) es posible establecer que promovió la proliferación de los fibroblastos HT1080.

Finalmente, después de realizar el análisis de los datos reportados de la literatura y los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, se puede inferir que los hidrogeles desarrollados a partir del colágeno de PT presentan propiedades mecánicas dentro de un rango adecuado para las capas de la piel afectadas por las quemaduras de primer y segundo grado; además, la relación de hinchamiento y el contenido de agua, indicaron que estos hidrogeles presentan una gran capacidad de retención de agua, lo cual de acuerdo con Ge et al. lo convierte en un apósito ideal para heridas, al mantener un entorno de herida hidratado (B. Ge et al., 2020). A su vez, al no liberar productos tóxicos y permitir la proliferación celular, en este caso de los fibroblastos empleados, podrían favorecer la cicatrización de las heridas como quemaduras de primer y segundo grado, al

facilitar la posible activación de las células inflamatorias (por la liberación de colágeno) (Torra i Bou et al., 2000), actuar como soporte estructural para los fibroblastos y reducir la carga bacteriana de la herida. Sin embargo, los hidrogeles presentaron una tendencia creciente de contracción ante una exposición prolongada a temperaturas cercanas a las corporales, esto afecta directamente a sus propiedades mecánicas y, por ende, a su rendimiento en la zona de aplicación.

Capítulo 6. Conclusiones Y Recomendaciones

En el presente estudio se estandarizó un protocolo de extracción de colágeno de PT bajo las condiciones del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Autónoma de Bucaramanga – UNAB, esto mediante la ejecución y comparación de protocolos reportados por autores nacionales e internacionales; con este protocolo se obtuvo un rendimiento medio de extracción del 52.127 % en base seca, siendo similar a lo reportado por la literatura; igualmente, este producto extraído se caracterizó por técnicas de espectroscopía como UV-VIS y FTIR, en donde se confirmó que el contenido del producto extraído correspondía principalmente a colágeno tipo I, al presentar picos de absorbancia entre los 204 – 223.75 nm y al exhibir cinco picos representativos de transmitancia correspondientes a las cinco bandas amídicas (amida A, B, I, II y III) principales características del colágeno, pudiéndose tratar del tipo I. A partir del colágeno de PT extraído, se fabricaron hidrogeles a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/ml, con los cuales se realizaron diferentes pruebas y se obtuvieron resultados que demuestran que al aumentar la concentración de los hidrogeles se puede obtener un mayor módulo de compresión. Adicionalmente, se presentan resultados de la relación de hinchamiento, el contenido de agua, el contenido de proteínas, propiedades de contracción y biocompatibilidad. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible hipotetizar que los hidrogeles a base de

colágeno de PT podrían tener gran potencial en el tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado, dado que sus propiedades mecánicas (módulo de compresión entre 2.542 y 9.174 kPa) y de hinchamiento (contenido de agua entre 98.6% y 99.5%) se encuentran en un rango adecuado y, pueden favorecer la proliferación celular y presentar bajos niveles de citotoxicidad. Sin embargo, se recomienda para futuras investigaciones variar los parámetros de fabricación de los hidrogeles de colágeno, como la temperatura y pH de reticulación, la concentración de colágeno, los componentes de la solución, los métodos de reticulación, entre otros, para encontrar un punto adecuado que permita obtener hidrogeles con mejores propiedades mecánicas, capaces de soportar pruebas mecánicas de tensión. En cuanto a las microburbujas que se formaron en los hidrogeles de colágeno fabricados, se propone incubar dichos hidrogeles a bajas temperaturas, para retardar el proceso de gelificación y así, posiblemente, reducir o evitar la formación de microburbujas.

Referencias

- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2015). Tunable Collagen I Hydrogels for Engineered Physiological Tissue Micro-Environments. *PLOS ONE*, *10*(3), e0122500. doi:10.1371/journal.pone.0122500
- Azcona Barbed, L. (2004). Quemaduras. *Farmacia Profesional*, *18*(9), 63-67. Retrieved from /02139324/0000001800000009/v0_201305241505/13068673/v0_201305241506/es/main.assetsER
- Bao, W., Li, M., Yang, Y., Wan, Y., Wang, X., Bi, N., & Li, C. (2020). Advancements and Frontiers in the High Performance of Natural Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 53.
- Bao, Z., Sun Y Fau - Rai, K., Rai K Fau - Peng, X., Peng X Fau - Wang, S., Wang S Fau - Nian, R., Nian R Fau - Xian, M., & Xian, M. (2018). The promising indicators of the thermal and mechanical properties of collagen from bass and tilapia: synergistic effects of hydroxyproline and cysteine. *Biomaterials Science*, *11*(2047-4849 (Electronic)).
- Bi, C., Li, X., Xin, Q., Han, W., Shi, C., Guo, R., . . . Zhong, J. (2019). Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *128*(2), 234-240.
- Borges de Miranda, M. J., & Teixeira Brandt, C. (2019). Xenoenxerto (pele da Tilápia-do-Nilo) e hidrofibra com prata no tratamento das queimaduras de II grau em adultos. *Brazilian Journal of Plastic Surgery*, *34*(1).
- Castillo Campo, L. F. (2012). *Tilapia roja 2011: una evolución de 29 años, de la incertidumbre al éxito*: Editorial Académica Española.

- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafoschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *30*(10), 115. doi:10.1007/s10856-019-6318-7
- Chang, S.-W., & Buehler, M. J. (2014). Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today*, *17*(2), 70-76.
- Chen, J., Gao, K., Liu, S., Wang, S., Elango, J., Bao, B., . . . Wu, W. (2019). Fish Collagen Surgical Compress Repairing Characteristics on Wound Healing Process In Vivo. *Marine Drugs*, *17*(1), 33. doi:10.3390/md17010033
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 453-459.
- Chuang, C.-H., Lin, R.-Z., Melero-Martin, J. M., & Chen, Y.-C. (2018). Comparison of covalently and physically cross-linked collagen hydrogels on mediating vascular network formation for engineering adipose tissue. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *46*(sup3), S434-S447. doi:10.1080/21691401.2018.1499660
- Costa, B. A., Lima Júnior, E. M., de Moraes Filho, M. O., Fachine, F. V., de Moraes, M. E. A., Silva Júnior, F. R., . . . Rocha, M. B. S. (2019). Use of Tilapia Skin as a Xenograft for Pediatric Burn Treatment: A Case Report. *J Burn Care Res*, *14*(1559-0488 (Electronic)), 714-717. doi:10.1093/jbcr/irz085
- Dolcimascolo, A., Calabrese, G., Conoci, S., & Parenti, R. (2018). Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*. doi:DOI: 10.5772/intechopen.83839

- El-Rashidy, A. A., Gad, A., Abu-Hussein, A. E.-H. G., Habib, S. I., Badr, N. A., & Hashem, A. A. (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, *79*, 618-626.
- El-Sherbiny, I. M., & Yacoub, M. H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global cardiology science & practice*, *2013*(3), 316-342. doi:10.5339/gcsp.2013.38
- Elliott, D. G. (2011). THE SKIN | Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 476-488). San Diego: Academic Press.
- Fan, Z., Liu, B., Wang, J., Zhang, S., Lin, Q., Gong, P., . . . Yang, S. (2014). A Novel Wound Dressing Based on Ag/Graphene Polymer Hydrogel: Effectively Kill Bacteria and Accelerate Wound Healing. *24*(25), 3933-3943.
- Fang, S. (2018). *Development of collagen-based scaffolds for differentiation of induced pluripotent stem cells*. (87). Binghamton University, Binghamton, USA.
- Fornes Pujalte, B., Palomar Llatas, F., Díez Fornes, P., Muñoz Mañez, V., & Lucha Fernandez, V. (2008). Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas. *Formación dermatológica*(4), 16-19.
- García-Espinoza, J., Aguilar-Aragon, V., Ortiz-Villalobos, E., García-Manzano, R., Barker Antonio, A., Aron, J., & García-Espinoza, J. (2020). Burns: Definition, Classification, Pathophysiology and Initial Approach. *International Journal of General Medicine*, *Volume 5*, 2327-5146. doi:10.4172/2327-5146.1000298
- García Alonso, I. (2017). Quemaduras. Traumatismos por agentes físicos: quemaduras. *1*.

- Ge, B., Wang, H., Li, J., Liu, H., Yin, Y., Zhang, N., & Qin, S. (2020). Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Mar Drugs*, *18*(4). doi:10.3390/md18040178
- Giraldo Ríos, D. E. (2019). *Modelamiento del proceso de extracción de colágeno a partir de subproductos piscícolas mediante el uso de membranas de filtración a flujo cruzado*. (Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Grønlien, K. G., Pedersen, M. E., Rønning, S. B., Solberg, N. T., & Tønnesen, H. H. (2022). Tuning of 2D cultured human fibroblast behavior using lumichrome photocrosslinked collagen hydrogels. *Materials Today Communications*, *31*, 103635.
- Gu, L., Shan, T., Ma, Y.-x., Tay, F. R., & Niu, L. (2019). Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends in Biotechnology*, *37*(5), 464-491.
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., & Landínez-Parra, N. S. (2013). Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas %J Revista de la Facultad de Medicina. *61*, 441-448.
- Hashmi, D. L., & Haith, L. (2019). The Current State of Topical Burn Treatments: a Review. *Current Trauma Reports*, *5*(3), 160-168. doi:10.1007/s40719-019-00170-w
- Heo, J., Koh, R. H., Shim, W., Kim, H. D., Yim, H.-G., & Hwang, N. S. (2016). Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Delivery and Translational Research*, *6*(2), 148-158. doi:10.1007/s13346-015-0224-4
- Ingen-Housz-Oro, S., & Benjoar, M. D. (2010). Quemaduras superficiales: fisiopatología, clínica y tratamiento. *EMC - Tratado de Medicina*, *14*(3), 1-4.

- Jackson, D. M. (1953). The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg*, 40(164), 588-596.
doi:10.1002/bjs.18004016413
- Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M. M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H., & Shavandi, A. (2020). Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. *Polymers*, 12(10). doi:10.3390/polym12102230
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, 36, 256-275.
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
- Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H., & Tamura, K. (2013). Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 367, 33-49. doi:10.1007/82_2012_305
- Kreger, S. T., Bell, B. J., Bailey, J., Stites, E., Kuske, J., Waisner, B., & Voytik-Harbin, S. L. (2010). Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers*, 93(8), 690-707.
- Kumar, P., & Sindhu, A. (2018). Materials for Tissue Engineering. In (pp. 357-370).
- Li, D., Sun, W. Q., Wang, T., Gao, Y., Wu, J., Xie, Z., . . . Mo, X. (2021). Evaluation of a novel tilapia-skin acellular dermis matrix rationally processed for enhanced wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 127, 112202.
- Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its

- potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74, 156-163.
- Liao, W., Guanghua, X., Li, Y., Shen, X. R., & Li, C. (2018). Comparison of characteristics and fibril-forming ability of skin collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 549-559.
- Lima-Junior, E. M., de Moraes Filho, M. O., Costa, B. A., Fachine, F. V., de Moraes, M. E. A., Silva-Junior, F. R., . . . Leontsinis, C. M. P. (2019). Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *J Surg Case Rep*, 2019(6), rjz181. doi:10.1093/jscr/rjz181
- Lima-Verde, M. E. Q., Parthiban, S. P., Junior, A. E. C. F., de Barros Silva, P. G., Junior, E. M. L., de Moraes, M. O., . . . Alves, A. P. N. N. (2020). Nile Tilapia Fish Skin, Scales, and Spine as Naturally Derived Biomaterials for Tissue Regeneration. *Current Oral Health Reports*, 7(4), 335-343. doi:10.1007/s40496-020-00286-y
- Lima Júnior, E. M. (2017). *Avaliação pré-clínica da pele da tilápia (Oreochromis niloticus), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras.*
- Lima Júnior, E. M., Moraes Filho, M. O., Forte, A. J., Costa, B. A., Fachine, F. V., Alves, A., . . . Mathor, M. B. (2020). Pediatric Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft for Superficial Partial-Thickness Wounds: A Pilot Study. *J Burn Care Res*, 41(2), 241-247. doi:10.1093/jbcr/irz149
- Lima Verde, M. E. Q., Ferreira-Júnior, A. E. C., de Barros-Silva, P. G., Miguel, E. d. C., Mathor, M. B., Lima-Júnior, E. M., . . . Alves, A. P. N. N. (2021). Nile tilapia skin (*Oreochromis*

- niloticus) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. *Acta Histochemica*, 123(6), 151762.
- Liñan Cabello, M. A. F. R., Laura A. (2014). Effects and expectations of tilapia as a resource. In *Basic fish skin composition and process* (pp. 11-17): Nova Science Pub Inc.
- Liu, C., & Sun, J. (2014). Potential application of hydrolyzed fish collagen for inducing the multidirectional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, 15(1), 436-443. doi:10.1021/bm401780v
- Liu, D., Zhou, P., Li, T., & Regenstein, J. M. (2014). Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. *Food Hydrocolloids*, 41, 290-297.
- Meisenberg, G. S., W. H. (2017). *Principles of medical biochemistry* (4 ed.): Elsevier Health Sciences.
- Menezes, M. d. L. L. R., Ribeiro, H. L., Abreu, F. d. O. M. d. S., Feitosa, J. P. d. A., & Filho, M. d. S. M. d. S. (2020). Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 189, 110852.
- Miranda Altamirano, A. (2020). Uso de apósitos en quemaduras. *Cirurgía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 46, 31-38.
- Mitura, S., Sionkowska, A., & Jaiswal, A. (2020). Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(6), 50. doi:10.1007/s10856-020-06390-w
- Moctezuma Paz, L. E., Páez Franco, I., Jiménez González, S., Miguel Jaimes, K. D., Foncerrada Ortega, G., Sánchez Flores, A. Y., . . . Nuñez Luna, V. (2015). Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Esp Med Quir*, 20, 78-82.

- Montañez Supela, N. (2014). Materiales de origen natural para uso biomédico. *MÉD.UIS*, 27(1), 35-41.
- Munoz-Pinto, D. J., Jimenez-Vergara, A. C., Gharat, T. P., & Hahn, M. S. (2015). Characterization of sequential collagen-poly(ethylene glycol) diacrylate interpenetrating networks and initial assessment of their potential for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 40, 32-42. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.051
- Nagai, T., Araki, Y., & Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (Takifugu rubripes). *Food Chemistry*, 78(2), 173-177.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), 277-281.
- Ng, H. W., Zhang, Y., Naffa, R., & Prabakar, S. (2020). Monitoring the Degradation of Collagen Hydrogels by Collagenase Clostridium histolyticum. *Gels*, 6(4). doi:10.3390/gels6040046
- Nurilmala, M., Suryamarevita, H., Husein Hizbullah, H., Jacobeb, A. M., & Ochiai, Y. (2021). Fish skin as a biomaterial for halal collagen and gelatin. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- OMS. (2018, 06/03/2018). Quemaduras.
- Osidak, E. O., Kozhukhov, V. I., Osidak, M. S., & Domogatsky, S. P. (2020). Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *International journal of bioprinting*, 6(3), 270-270. doi:10.18063/ijb.v6i3.270
- Osorio González, E. (2020). *Hidrogeles como apósitos para heridas cutáneas*. (Ingeniero Biomédico). Universidad EIA, Envigado.
- Ovington, L. G. (2007). Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 33-38.

- Pailler-Mattei, C., Debret, R., Vargiolu, R., Sommer, P., & Zahouani, H. (2013). In vivo skin biophysical behaviour and surface topography as a function of ageing. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 28, 474-483.
- Palao Doménech, R. (2009). *Quemados. Valoración y criterios de actuación*. Barcelona, España: ICG Marge, SL.
- Pawlaczyk, M., Lelonkiewicz, M., & Wieczorowski, M. (2013). Review papers Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(5), 302-306. doi:10.5114/pdia.2013.38359
- Pérez Boluda, M. T., Martínez Torreblanca, P., Pérez Santos, L., & Cañadas Núñez, F. (2011). *Guía práctica clínica para el cuidado de personas que sufren quemaduras* (S. A. d. S. C. d. S. J. d. Andalucía Ed.). Andalucía, España: Artefacto.
- Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J., & Worawattanamateekul, W. (2009). Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Nat. Sci.*, 43, 584-593.
- Qianqian, O., Songzhi, K., Yongmei, H., Xianghong, J., Sidong, L., Puwang, L., & Hui, L. (2021). Preparation of nano-hydroxyapatite/chitosan/tilapia skin peptides hydrogels and its burn wound treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 369-377.
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta %J Información tecnológica. 28, 109-120.
- Raia, N. R., McGill, M., Marcet, T., Vidal Yucha, S. E., & Kaplan, D. L. (2020). 2.6.8 - Soft Tissue Engineering. In W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, & M. J. Yaszemski (Eds.), *Biomaterials Science (Fourth Edition)* (pp. 1399-1414): Academic Press.

- Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gáscue, B. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36, 108-130.
- Ramírez Blanco, C. E., Ramírez Rivero, C. E., & Díaz Martínez, L. A. (2017). Causas y sobrevida en pacientes quemados en el centro de referencia del nororiente de Colombia. 43(1), 59-67.
- Raub, C. B., Suresh, V., Krasieva, T., Lyubovitsky, J., Mih, J. D., Putnam, A. J., . . . George, S. C. (2007). Noninvasive Assessment of Collagen Gel Microstructure and Mechanics Using Multiphoton Microscopy. *Biophysical Journal*, 92(6), 2212-2222.
- Reátegui-Pinedo, N., Salirrosas, D., Sánchez-Tuesta, L., Quiñones, C., Jáuregui-Rosas, S. R., Barraza, G., . . . Prieto, Z. A. (2022). Characterization of Collagen from Three Genetic Lines (Gray, Red and F1) of *Oreochromis niloticus* (Tilapia) Skin in Young and Old Adults. *Molecules*, 27(3), 1123.
- Riaño Pacanchique, D., Vega Vargas, E. H., & Chirivi Benavides, R. I. (2017). *Evaluar el estudio de factibilidad de producción y comercialización de tilapia roja en el municipio de Barbosa, Santander*. Universidad Católica de Colombia, Bogotá.
- Rittié, L. (2017). Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. (1940-6029 (Electronic)).
- Rodríguez López, V. (2019). *Trabajo fin de grado. Sistemas de liberación de fármacos en implantes óseos*. Universidad Complutense, Madrid, España. (47309445D)
- Roldán Vasco, S., Vargas Isaza, C. A., Mejía, M. L., Zapata Giraldo, J., & Moncada Acevedo, M. E. . (2016). Ingeniería de tejidos. . In *Ingeniería de tejidos y aplicaciones* (Vol. 21, pp. 9-73): Fondo Editorial ITM.

- Ru, C., Wang F Fau - Pang, M., Pang, M., Sun L Fau - Chen, R., Chen, R., & Sun, Y. (2015). Suspended, Shrinkage-Free, Electrospun PLGA Nanofibrous Scaffold for Skin Tissue Engineering. (1944-8252 (Electronic)).
- Saavedra, A. C., Arroyo, J., Zvietcovich, F., Lavarello, R. J., & Castaneda, B. (2018, 18-21 July 2018). *In vivo estimation of the Young's modulus in normal human dermis*. Paper presented at the 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC).
- Sáenz Ramírez, A. (2004). Biomateriales. *Tecnología en marcha*, 17(1), 34-45.
- Sarrigiannidis, S. O., Rey, J. M., Dobre, O., González-García, C., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2021). A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Materials Today Bio*, 10, 100098.
- Serrano Gaona, J. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (Oreochromis sp) y cachama (Piaractus brachyomus)*. (Maestría).
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Sierra, E. M., Espinosa de los Monteros, A., Real, F., Herráez, P., Castro, P., & Fernández, A. (2003). Histología y patología de los peces. Parte I: Biología y necropsia de los peces. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias* (1), 44-51.
- Sohutskay, D. O., Puls, T. J., & Voytik-Harbin, S. L. (2020). Collagen Self-assembly: Biophysics and Biosignaling for Advanced Tissue Generation. In Y. Zhang (Ed.), *Multi-scale Extracellular Matrix Mechanics and Mechanobiology* (pp. 203-245). Cham: Springer International Publishing.

- Song, W.-K., Liu, D., Sun, L.-L., Li, B.-F., & Hou, H. (2019). Physicochemical and Biocompatibility Properties of Type I Collagen from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, *17*(3). doi:10.3390/md17030137
- Song, W. H., Kim, H.-Y., Lim, Y. S., Hwang, S. Y., Lee, C., Lee, D. Y., . . . Yoon, S. (2022). Fish Collagen Peptides Protect against Cisplatin-Induced Cytotoxicity and Oxidative Injury by Inhibiting MAPK Signaling Pathways in Mouse Thymic Epithelial Cells. *Marine Drugs*, *20*(4). doi:10.3390/md20040232
- Souren, J. E. M., Schneijdenberg, C., Verkleij, A. J., & van Wijk, R. (1992). Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *28*(3), 199-204. doi:10.1007/BF02631092
- Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, *99*, 8-14.
- Sun, L., Li, B., Song, W., Zhang, K., Fan, Y., & Hou, H. (2020). Comprehensive assessment of Nile tilapia skin collagen sponges as hemostatic dressings. *Materials Science and Engineering: C*, *109*, 110532.
- Teot, L., Otman, S., Brancati, A., & Mittermayr, R. (2020). Burn Wound Healing: Pathophysiology. In L.-P. Kamolz, M. G. Jeschke, R. Horch, M. Kuntscher, & P. Brychta (Eds.), *Handbook of Burns Volume 2* (Vol. 2, pp. 41-47). Czech Republic: Springer.
- Tian, H., Ren, Z., Shi, L., Hao, G., Chen, J., & Weng, W. (2021). Self-assembly characterization of tilapia skin collagen in simulated body fluid with different salt concentrations. *Process Biochemistry*, *108*, 153-160.

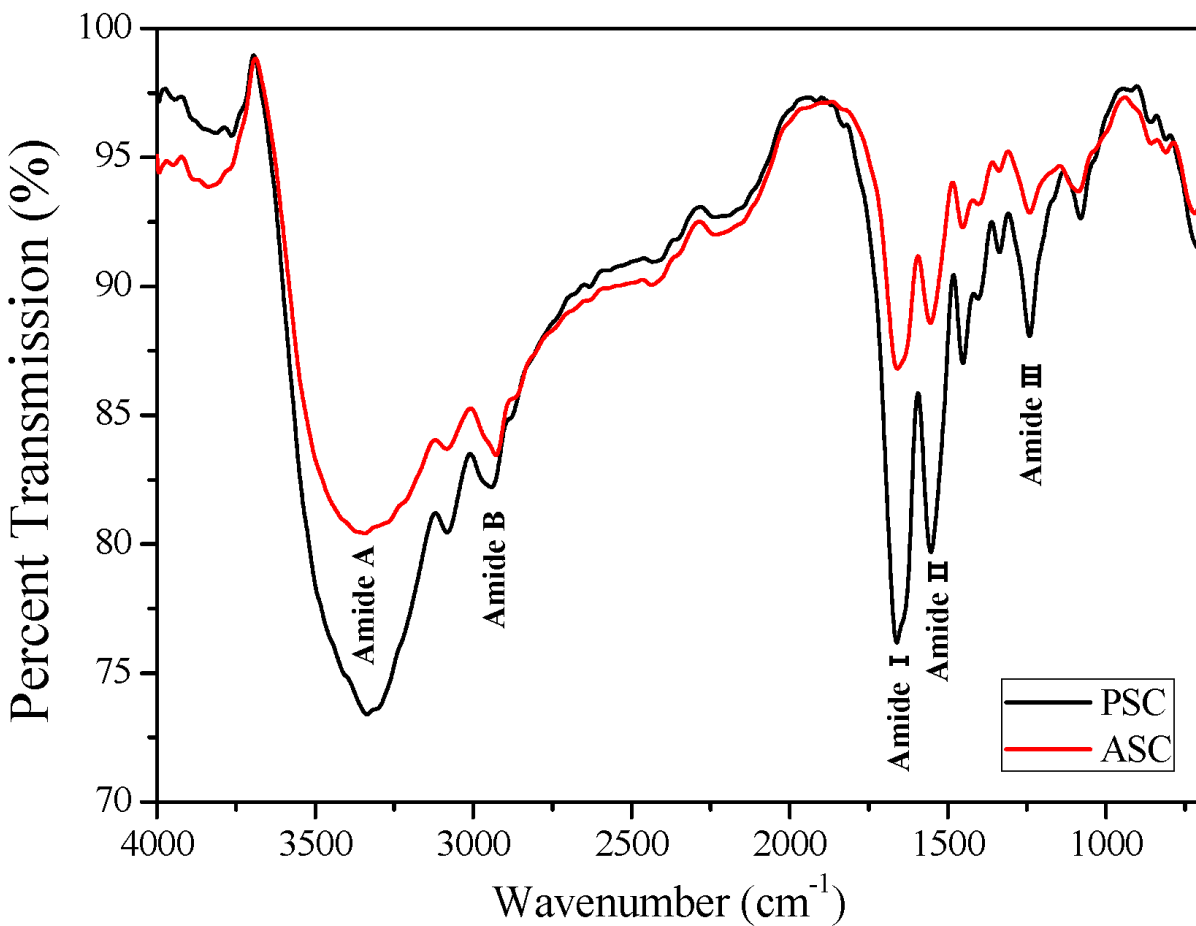
- Tiwari, V. K. (2012). Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 45(2), 364-373. doi:10.4103/0970-0358.101319
- Torra i Bou, J. E., Casaroli Marano, R. P., Martínez Cuervo, F., Reina del Pozo, M., Soldevilla Agreda, J. J., & Vilaró, S. (2000). El uso del colágeno en la cicatrización de las heridas. *ROL. Revista Española de Enfermería*, 23(10), p. 715-722.
- Trintinaglia, L., Bianchi, E., Silva, L. B., Nascimento, C. A., Spilki, F. R., & Ziulkoski, A. L. (2015). Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. *Braz J Biol*, 75(2 Suppl), 75-80. doi:10.1590/1519-6984.0113
- Tytgat, L., Markovic, M., Qazi, T. H., Vagenende, M., Bray, F., Martins, J. C., . . . Van Vlierberghe, S. (2019). Photo-crosslinkable recombinant collagen mimics for tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(19), 3100-3108. doi:10.1039/C8TB03308K
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414-433.
- Ullah, S., & Chen, X. (2020). Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. *Applied Materials Today*, 20, 100656.
- Valencia-Gómez, L. E., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodríguez-González, C. A., & Olivas-Armendariz, I. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 37, 235-249.
- Valenzuela Rojo, R., Lopez-Cervantes, J., & Sánchez-Machado, D. (2018). Tilapia (*Oreochromis aureus*) Collagen for Medical Biomaterials. In.

- Virumbrales-Muñoz, M., Ayuso, J. M., Lacueva, A., Randelovic, T., Livingston, M. K., Beebe, D. J., . . . Ochoa, I. (2019). Enabling cell recovery from 3D cell culture microfluidic devices for tumour microenvironment biomarker profiling. *Scientific Reports*, 9(1), 6199. doi:10.1038/s41598-019-42529-8
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., & Zhou, D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 544-550.
- Westgate, S., Cutting, K., G, D., & Asaad, K. (2012). Collagen dressings made easy. *Wounds UK*, 8, Suppl 1-4.
- Xu, L., Cao, J., Zhong, S., Wang, J., Yang, Y., Gao, Y., & Cui, X. (2021). Photoluminescence of Tilapia skin collagen: Aggregation-induced emission with clustering triggered emission mechanism and its multiple applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1437-1444.
- Zeng, S.-k., Zhang, C.-h., Lin, H., Yang, P., Hong, P.-z., & Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 116(4), 879-883.

Anexos

Anexo A

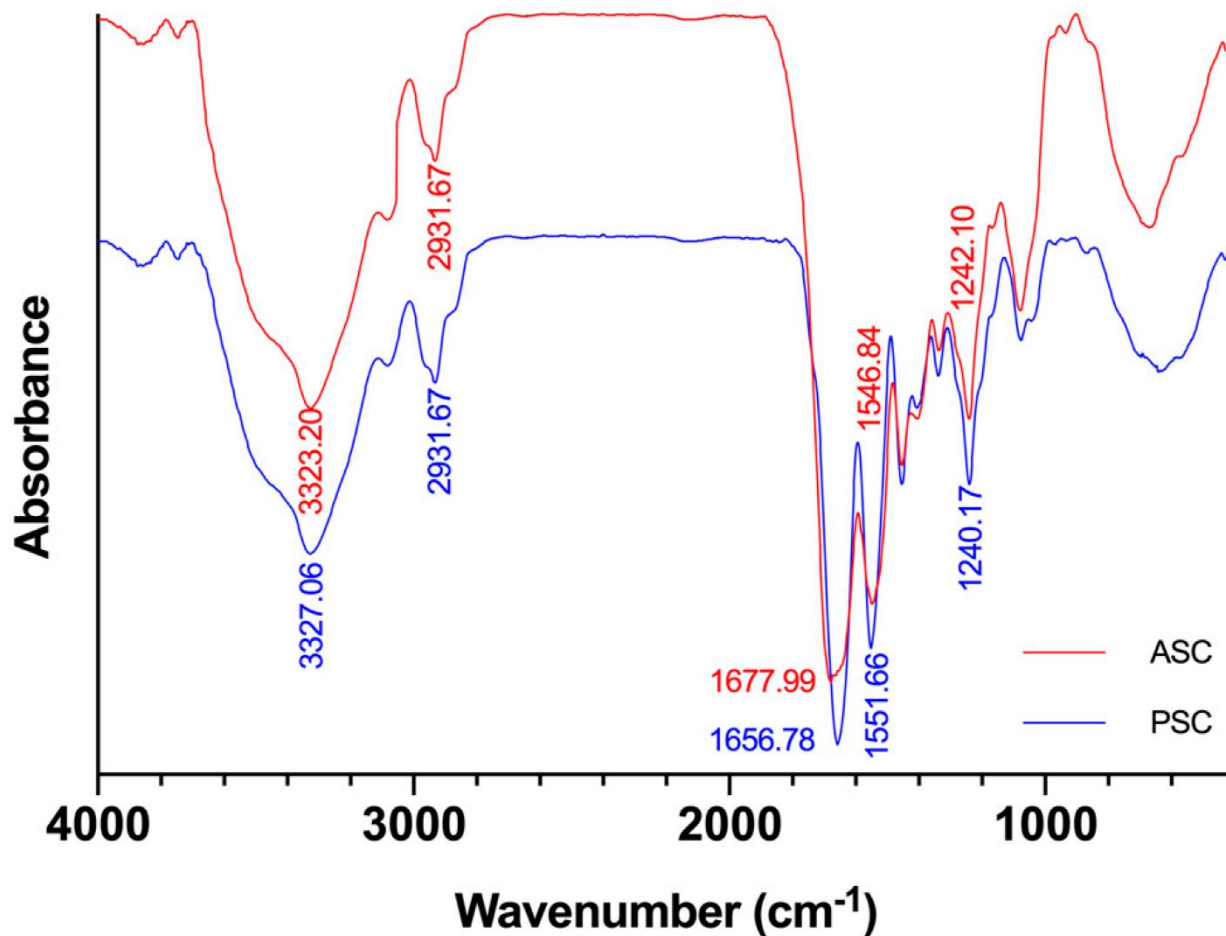
Espectros FTIR de muestras de colágeno tipo I: colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).



Nota. El espectro FTIR del ASC (gráfica roja) es el que se tiene en consideración para comparar con el espectro FTIR obtenido en la presente investigación. Extraído de Ge et al. (B. Ge et al., 2020)

Anexo B

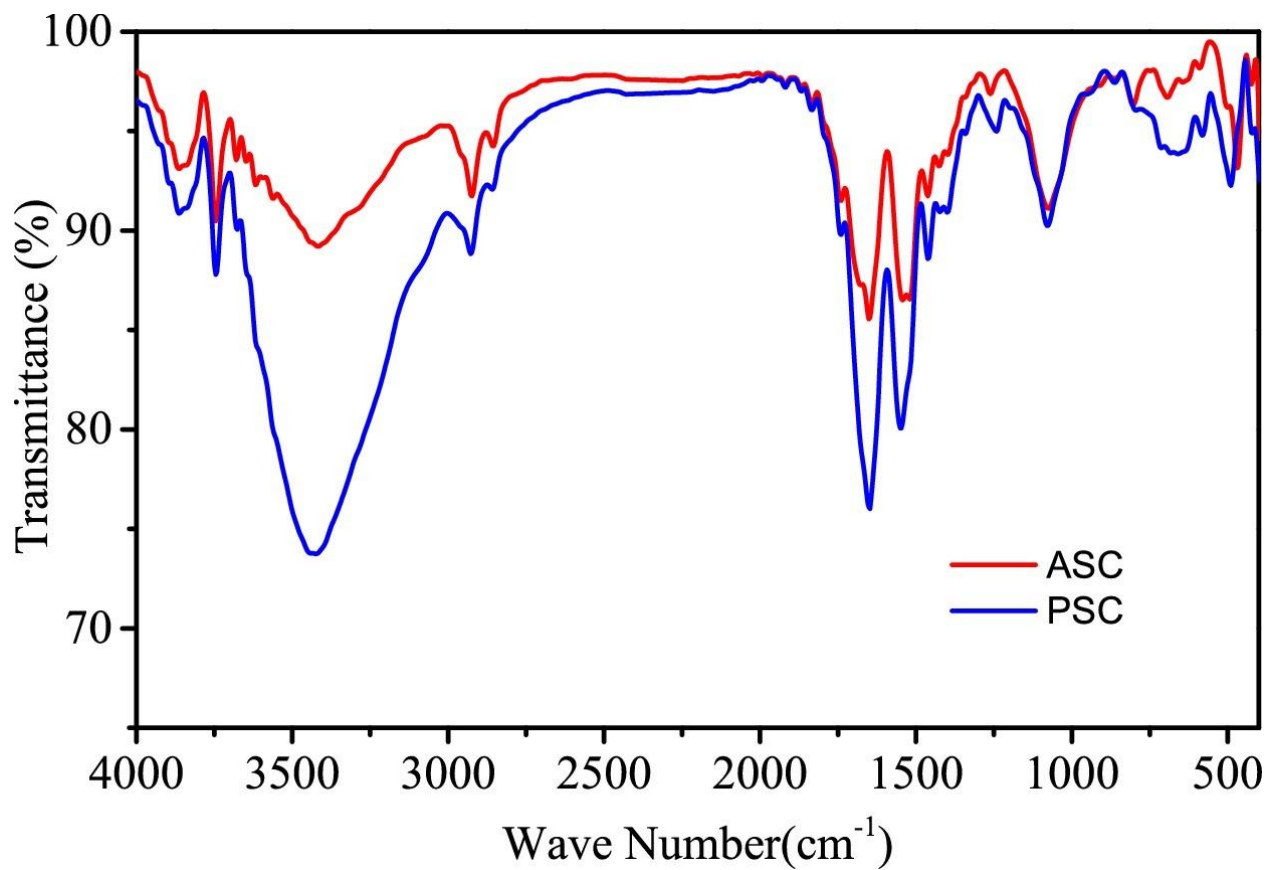
Espectros FTIR de muestras de colágeno tipo I: colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).



Nota. El espectro FTIR del ASC (gráfica roja) es el que se tiene en consideración para comparar con el espectro FTIR obtenido en la presente investigación. Extraído de W. -L Song et al. (W.-K. Song et al., 2019)

Anexo C

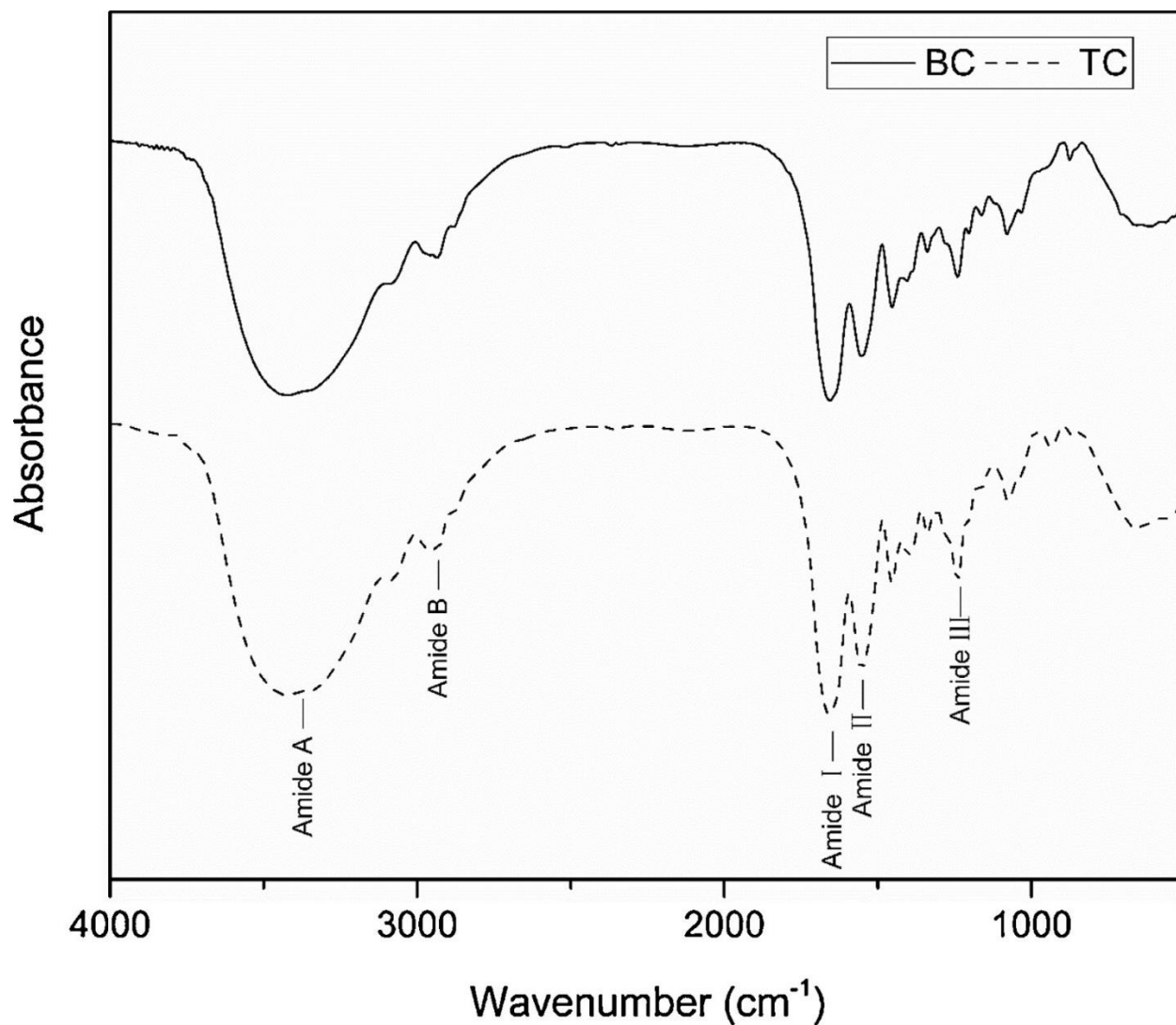
Espectros FTIR de muestras de colágeno tipo I: colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).



Nota. El espectro FTIR del ASC (gráfica roja) es el que se tiene en consideración para comparar con el espectro FTIR obtenido en la presente investigación. Extraído de J. Li et al. (J. Li et al., 2018)

Anexo D

Espectros FTIR de muestras de colágeno tipo I: colágeno de la piel de barramundi (BC) y colágeno de la piel de tilapia (TC).



Nota. El espectro FTIR de TC (gráfica con líneas discontinuas) es el que se tiene en consideración para comparar con el espectro FTIR obtenido en la presente investigación.

Extraído de Liao et al. (Liao et al., 2018)