

Desarrollo de un apósito tipo hidrogel de plasma pobre en plaquetas y colágeno extraído de piel de tilapia con potencial uso para el tratamiento de úlceras crónicas de pie diabético

Presentado por:

Luis David Rojas Cárdenas

Código:

U00109328

Director:

Víctor Alfonso Solarte David

Co – director:

Silvia Milena Becerra Bayona

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

Inicialmente, quiero agradecer a Dios por proporcionarme una segunda oportunidad de vida, por darme salud, fortaleza y sabiduría; permitiéndome culminar mis estudios universitarios de manera satisfactoria.

A mis padres, Luis Emilio y Martha Inés, por brindarme tanto apoyo y mucho amor en mi vida, quienes me dieron las fuerzas para superar toda adversidad que se presentara en el camino. A mi hermano, Emilio José, le agradezco por acompañarme de manera incondicional. Fueron ustedes quienes me han formado como la persona que soy ahora y por eso les dedico este nuevo logro en mi vida. También agradezco a Estefanía, por su amor, tiempo y paciencia en todos estos años, tanto en mi vida personal como en mi vida académica.

A mis directores de tesis, PhD. Víctor Alfonso Solarte David y PhD. Silvia Milena Becerra Bayona, por el apoyo, acompañamiento y orientación brindados para llevar a cabo el proyecto. Les agradezco, además, por el compromiso que tuvieron con mi aprendizaje, para ser un buen futuro profesional, así como todos los consejos que me dieron para crecer como persona. De igual forma quiero agradecer al cuerpo directivo, docente y administrativo del programa de Ingeniería Biomédica, quienes me apoyaron y acompañaron desde mi primer hasta el último día de la carrera.

Resumen

La diabetes mellitus es una enfermedad que en la actualidad se considera un problema de salud pública y se estima que afecte a más de 700 millones de personas adultas en los años venideros. Una de sus principales complicaciones son las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD), lesiones cutáneas que en la actualidad no tienen tratamientos 100% efectivos y que afectan de manera significativa la calidad de vida de quienes la padecen, lo que ha incrementado la necesidad de encontrar tratamientos que mejoren el proceso de cicatrización de este tipo de heridas. Por lo anterior, en el presente proyecto se ha sido utilizado piel de tilapia roja, un desecho de la industria acuícola, para extraer colágeno y con este elaborar hidrogeles, los cuales se reticularon con plasma pobre en plaquetas (PPP), una fracción de la sangre que no ha sido frecuentemente utilizada para la investigación. El proceso de extracción de colágeno ácido soluble permitió obtener un rendimiento en base seca cercano al 40%, y a partir de este, fabricar los hidrogeles y reticularlos con el PPP, obteniendo una dinámica adecuada en cuanto a la liberación de proteínas. Estos hidrogeles se sometieron a diferentes ensayos con el fin de determinar sus propiedades mecánicas y físicas, encontrando módulos de compresión similares a los de las capas internas de la piel, así como una capacidad de hinchamiento óptima, lo que les permitiría entregar la humedad necesaria a la herida durante el proceso de cicatrización. Finalmente, a partir de pruebas *in vitro*, se determinó que el lixiviado producido por los hidrogeles mantiene la viabilidad celular en un periodo de 48 horas, al permitir la proliferación de fibroblastos de la línea celular HT1080. Estos resultados indican que los hidrogeles fabricados en el presente estudio podrían ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de las UCPD.

Palabras clave: colágeno, citotoxicidad, fibroblastos, hidrogeles, plasma pobre en plaquetas.

Abstract

Diabetes mellitus is a disease that is currently considered a public health problem and is estimated to affect more than 700 million adults in the coming years. One of its main complications are chronic diabetic foot ulcers, skin lesions that currently do not have 100% effective treatments and that significantly affect the quality of life of those who suffer it, which has increased the need to find treatments that improve the healing process of this type of wounds. Therefore, in the present project red tilapia skin, a waste from the aquaculture industry, has been used to extract collagen and with this to elaborate hydrogels, which were cross-linked with platelet-poor plasma (PPP), a fraction of the blood that has not been frequently used for research. The soluble acid collagen extraction process allowed to obtain a dry base yield close to 40%, and from this, to manufacture the hydrogels and cross-link them with the PPP, obtaining an adequate dynamic in terms of protein release. These hydrogels were subjected to different tests to determine their mechanical and physical properties, finding compression modules like those of the inner layers of the skin, as well as an optimal swelling capacity, which would allow them to deliver the necessary moisture to the wound during the healing process. Finally, from in vitro tests, it was determined that the leachate produced by the hydrogels maintains cell viability in a period of 48 hours, by allowing the proliferation of fibroblasts from the HT1080 cell line. These results indicate that the hydrogels manufactured in the present study could be a therapeutic alternative for the treatment of chronic diabetic foot ulcers.

Keywords: collagen, cytotoxicity, fibroblasts, hydrogels, platelet – poor plasma.

Tabla de contenido

Capítulo 1. Problemática identificada.....	10
Planteamiento del problema.....	10
Justificación.....	11
Pregunta problema.....	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Marco teórico	15
La piel.....	15
<i>Propiedades mecánicas</i>	16
Biomateriales.....	17
El colágeno	18
<i>Estructura del colágeno</i>	19
<i>Propiedades y aplicaciones del colágeno</i>	20
<i>Fuentes y proceso de extracción del colágeno</i>	22
Plasma pobre en plaquetas (PPP).....	25
Hidrogeles	25
Úlceras crónicas de pie diabético (UCPD).....	26
<i>Tratamientos actuales para las UCPD</i>	28
Capítulo 3. Estado del arte	29
Capítulo 4. Metodología	33
Extracción de colágeno a partir de piel de tilapia roja	33
<i>Preparación de la piel de tilapia roja</i>	34
<i>Blanqueamiento de la piel</i>	34
<i>Desengrasado de la piel</i>	34
<i>Hidrólisis básica de la piel</i>	35
<i>Extracción ácida de la piel</i>	35
<i>Salting-out del precipitado</i>	35
<i>Diálisis del colágeno</i>	36
<i>Liofilización del colágeno</i>	36
<i>Rendimiento de extracción de colágeno ácido soluble (ASC)</i>	36

Elaboración de hidrogeles	37
<i>Hidrogeles de colágeno (H_C)</i>	37
<i>Hidrogeles de PPP y colágeno (H_{C+PPP})</i>	38
<i>Hidrogeles de PPP (H_{PPP})</i>	38
<i>Concentración de proteínas en los hidrogeles</i>	39
Pruebas mecánicas.....	40
<i>Prueba mecánica de compresión (PMC)</i>	40
<i>Prueba mecánica de tensión (PMT)</i>	41
<i>Prueba de hinchamiento</i>	41
<i>Prueba de degradación de los hidrogeles</i>	42
Ensayo de citotoxicidad	42
<i>Prueba de proliferación celular con lixiviados de hidrogeles</i>	42
Análisis estadísticos	45
Capítulo 5. Resultados y análisis	46
Extracción de colágeno a partir de piel de tilapia roja	46
Elaboración de hidrogeles de colágeno puro, PPP puro y colágeno + PPP	50
Concentración de proteínas inmovilizadas y liberadas por los hidrogeles.....	52
Caracterización mecánica de los hidrogeles.....	56
<i>Evaluación del módulo de compresión</i>	56
<i>Evaluación del módulo de Young</i>	62
<i>Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles</i>	63
<i>Degradación de los hidrogeles</i>	66
Ensayo de proliferación celular utilizando lixiviados de los hidrogeles	69
Análisis de resultados.....	72
Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones	82
Referencias.....	84
Anexos	96

Lista de figuras

Figura 1	Representación de las capas de la piel y su espesor	16
Figura 2	Estructura del colágeno	20
Figura 3	Proceso estandarizado para la extracción de colágeno soluble en ácido (ASC por sus siglas en inglés) a partir de la piel de tilapia roja.....	22
Figura 4	Diagrama de flujo del proceso para la extracción de colágeno ASC a partir de la piel de tilapia roja	33
Figura 5	Curva Esfuerzo vs Deformación	41
Figura 6	Distribución de pozos para las células y tratamientos en la prueba de lixiviados.....	44
Figura 7	Muestras de piel utilizadas para la extracción de colágeno.....	46
Figura 8	Resultados de los diferentes procesos del protocolo	47
Figura 9	Muestra de PTR liofilizada.....	49
Figura 10	Rendimiento de la extracción de colágeno ácido soluble.....	50
Figura 11	Hidrogeles fabricados de colágeno puro, colágeno + PPP y PPP puro	51
Figura 12	Concentración de proteínas retenidos en los hidrogeles post fabricación.....	53
Figura 13	Concentración de proteínas en los hidrogeles tras 7 días de incubación.....	54
Figura 14	Liberación de proteínas en el tiempo por los hidrogeles.....	55
Figura 15	Proceso de la PMC	57
Figura 16	Módulos de compresión de los hidrogeles	59
Figura 17	Estado de los hidrogeles al finalizar la PMC	61
Figura 18	Montaje de la PMT.....	62
Figura 19	Relación de hinchamiento de los hidrogeles	64
Figura 20	Contenido de agua y de proteínas en los hidrogeles	66
Figura 21	Cambio del peso de los hidrogeles en el tiempo	68
Figura 22	Porcentaje de viabilidad celular para los lixiviados	70

Lista de tablas

Tabla 1 Mediciones <i>in vivo</i> para el módulo de Young en la piel.....	17
Tabla 2 Ejemplos de tipos de colágeno presentes en el cuerpo humano	19
Tabla 3 Aplicaciones médicas del colágeno	21
Tabla 4 Sistema de clasificación de úlceras de Meggitt – Wagner.....	27
Tabla 5 Pesos húmedos y secos de las PTR utilizadas en cada proceso de extracción	49
Tabla 6 Dimensiones de los hidrogeles luego del hinchamiento para la PMC.....	57
Tabla 7 Dimensiones de los hidrogeles tras la prueba de compresión.....	60
Tabla 8 Dimensiones de los hidrogeles tras el rehinchamiento	61
Tabla 9 Medición de masa (mg) de los hidrogeles en los seis días	67
Tabla 10 Viabilidad celular con los tratamientos de lixiviado de hidrogeles	70

Lista de ecuaciones

(1) Cálculo del rendimiento en base seca	36
(2) Cálculo del rendimiento en base húmeda.....	37
(3) Volumen de PBS necesario para la solución de hidrogeles de colágeno	37
(4) Volumen de solución stock de colágeno necesaria para solución de hidrogeles de colágeno	37
(5) Volumen de hidróxido de sodio necesario para la solución de hidrogeles de colágeno	37
(6) Volumen de agua destilada necesaria para la solución de hidrogeles de colágeno.....	37
(7) Cálculo de la relación de hinchamiento	42
(8) Cálculo del contenido de agua	42
(9) Cálculo del contenido de proteínas	42
(10) Cálculo del cambio de peso en un momento determinado.....	42
(11) Cálculo de la viabilidad celular.....	44

Capítulo 1. Problemática identificada

Planteamiento del problema

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se presenta cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, ya sea debido a la deficiencia o resistencia de insulina pancreática o porque el cuerpo no hace buen uso de esta hormona (World Health Organization, 2021). Para el 2021 aproximadamente 537 millones de personas entre 20 y 79 años padecían esta enfermedad. Se estima que para los años 2030 y 2045 el número de afectados se incrementará hasta alcanzar los 643 y 783 millones de personas afectadas respectivamente, convirtiéndose en un serio problema de salud pública. En Colombia, para el año 2021, se diagnosticaron 3.4 millones de casos, siendo así el segundo país con la mayor cantidad de personas enfermas, tan solo por detrás de los 15.7 millones de enfermos que tuvo Brasil en ese mismo año (International Diabetes Federation, 2021). En el departamento de Santander la diabetes ha tenido una tendencia bastante variable, donde para el año 2015 la tasa de mortalidad por la enfermedad se reportó del 23.2%, cifra que disminuyó en menos del 2% para el 2017, donde la tasa de mortalidad alcanzó el 21.43% (Aguilar Hurtado, 2020).

Cuando una persona sufre de diabetes se ven comprometidos órganos y sistemas, ocasionando complicaciones incapacitantes y potencialmente mortales. El sufrir de diabetes hace susceptible a las personas de presentar ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de miembros (World Health Organization, 2021), situaciones que pueden llevar a desenlaces mortales para los pacientes. Una de las complicaciones más frecuentes derivada de la diabetes es el pie diabético, desencadenada por neuropatías y vasculopatías periféricas (Afonso et al., 2021), que llevan a ulceraciones generalmente crónicas, lo que da paso a infecciones. Se estima que aproximadamente el 25% de los pacientes diabéticos desarrollarán

úlceras en sus pies en algún momento de su vida, situación que aumenta ocho veces la probabilidad de la amputación no traumática del miembro. Asimismo, pasados cinco años de la amputación del miembro, la mortalidad de los pacientes varía entre el 39 y 80% (Pereira C. et al., 2018).

El tratamiento tradicional de las úlceras del pie diabético se enfoca principalmente en la prevención mediante la educación del paciente y cuidador, así como el control de la glicemia; el desbridamiento de la herida, el tratamiento de cualquier infección y la liberación de presión en la úlcera. También se tienen en cuenta ciertos procedimientos tales como la revascularización y la cirugía reconstructiva, siempre y cuando sean indicados por el profesional. De igual forma existen otros tratamientos alternativos que son beneficiosos, como lo es el uso de cámaras hiperbáricas y la terapia de heridas con presión negativa (Khan et al., 2017). No obstante, a la fecha, el manejo de úlceras de pie diabético es aún un desafío, dado que solo es efectivo en aproximadamente el 50% de pacientes tratados (Snyder & Hanft, 2009), lo cual implica graves consecuencias en la calidad de vida de estos, además de altos costos al sistema de salud por su carácter crónico. Por lo tanto, es importante el desarrollo de alternativas terapéuticas que permitan un tratamiento efectivo para las úlceras de pie diabético, lo cual a su vez implica mejorar la calidad de vida de los pacientes, minimizando la carga asistencial y el costo al sector salud (Pereira C. et al., 2018).

Justificación

En la actualidad existen métodos de tratamiento, tanto tradicionales como alternativos, que ayudan en el proceso de cicatrización de las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD). Sin embargo, estos no son 100% efectivos, razón por la cual la necesidad de desarrollar nuevos métodos terapéuticos que permitan una correcta cicatrización de este tipo de heridas, es una necesidad que ha aumentado en los últimos años (Snyder & Hanft, 2009). Es por esto que han surgido métodos novedosos, donde se destacan aquellas terapias cuya base es la ingeniería de

tejidos, que busca manejar el proceso de cicatrización mediante el uso de andamios, biomoléculas y células. Los apósitos, productos sanitarios destinados a cubrir y proteger heridas, constituyen una parte importante del tratamiento de estas úlceras, existiendo un amplio abanico de opciones para los pacientes (Rosendo Fernández & Pérez Zarauza, 2016). Entre los apósitos más avanzados que se encuentran disponibles están los hidrogeles, los cuales se caracterizan por estar compuestos principalmente por agua, lo que les permite mantener las condiciones de humedad necesarias durante el proceso de cicatrización. Adicionalmente, estos pueden ser funcionalizados con biomoléculas, lo que mejora las condiciones de la cicatrización tras promover procesos como la proliferación y migración de células, mediante factores de crecimiento y componentes naturales de matriz extracelular (Martínez-Correa et al., 2020).

Por otra parte, se han identificado diferentes elementos que de manera individual mejoran el proceso de cicatrización, pero que al combinarlos potencian sus propiedades para este fin, los cuales además pueden ser usados para la elaboración de apósitos bioactivos. Por un lado, está el colágeno, que es la proteína más abundante en el tejido conectivo del ser humano y que puede ser extraída de diversas fuentes, como por ejemplo la piel de la tilapia, subproducto de la industria acuícola que por lo general es vertido en afluentes de agua o destinado a aplicaciones de bajo valor añadido (Meisenberg & Simmons, 2018; Quintero & Zapata, 2017). Esta proteína tiene un papel fundamental en la cicatrización de heridas, pues permite mantener la estructura tisular al promover la migración y proliferación celular, induciendo la remodelación de la matriz extracelular. La utilización de este material para la creación de apósitos es ventajosa por sus propiedades mecánicas, pues otorga resistencia y se adapta fácil y rápido al tejido gracias a su estructura entrelazada. El colágeno como base para la fabricación de apósitos se constituye como una alternativa eficaz para la curación de heridas del pie diabético (Holmes et al., 2013). Por otro lado,

se encuentran los factores de crecimiento, factores de coagulación y proteínas asociadas a la formación del coágulo, que son importantes en la fase de hemostasia porque proveen una matriz provisional para la migración celular, y son una buena fuente de mediadores necesarios para la inflamación (Cruz, 2003). Una fuente prometedora de estos componentes es el plasma pobre en plaquetas (PPP), generalmente descartado, que ha demostrado alto potencial en capacidades regenerativas y posee un alto contenido en proteínas de matriz (Chisini et al., 2017). Los estudios que se han realizado con el PPP son escasos y existe una gran oportunidad en utilizarlo.

Con lo anterior en mente, se puede afirmar que la piel de tilapia es una fuente sostenible para la extracción del colágeno, además de ser una alternativa innovadora en cuanto a tratamientos. De igual forma el utilizar el PPP implica el uso de un elemento que por lo general es desechado, aun cuando sus propiedades significan beneficios. Es por eso por lo que se presenta la posibilidad de combinar el PPP con colágeno extraído a partir de piel de tilapia, para elaborar un material cuyas propiedades mecánicas y actividad citotóxica sean adecuadas para favorecer el proceso de recuperación y cicatrización de las UCPD.

Pregunta problema

¿Cuáles son las concentraciones de colágeno extraído de la piel de tilapia y de PPP que permiten la fabricación de un hidrogel con potencial aplicación para el tratamiento de UCPD?

Objetivo general

Desarrollar un apósito tipo hidrogel de PPP y colágeno extraído de piel de tilapia con potencial uso para el tratamiento de UCPD.

Objetivos específicos

1. Evaluar la formación de hidrogeles a partir de la reticulación de PPP con colágeno.

2. Caracterizar los hidrogeles fabricados a partir de sus propiedades mecánicas e hinchamiento.
3. Establecer el efecto citotóxico de los hidrogeles en un modelo *in vitro* de fibroblastos humanos.

Capítulo 2. Marco teórico

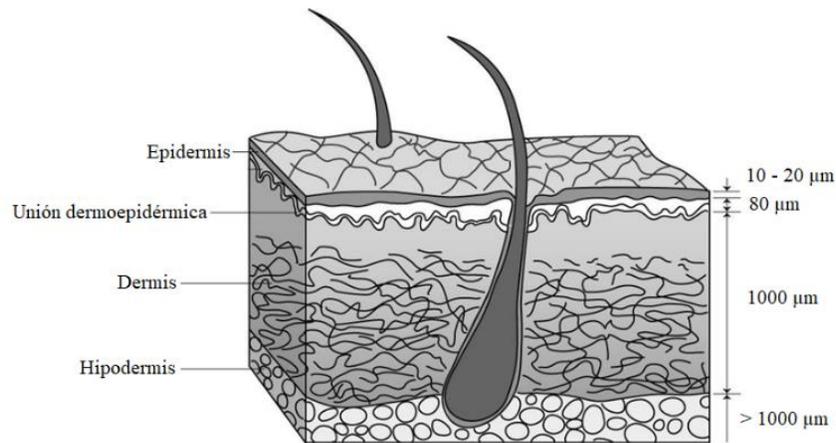
La piel

La piel es el órgano más grande en el ser humano, tanto por su superficie como por su peso y cumple con una amplia variedad de funciones (Hyland, 2007). Actúa como interfaz entre el medio ambiente y el cuerpo, constituyéndose como una barrera protectora contra los microbios, las toxinas y la radiación ultravioleta, mientras que previene la pérdida de agua. De igual forma la piel permite regular la temperatura por medio de la transpiración. Las funciones de este órgano, tanto pasivas como activas, son llevadas a cabo por células especializadas que se ubican en sus dos capas principales, la epidermis y la dermis (Figura 1) (Falanga, 2020).

De acuerdo con Falanga (2020), las relaciones funcionales entre estas dos capas mantienen normales las propiedades de la piel. La epidermis es la capa más externa de la piel y es la primera barrera que otorga resistencia tanto mecánica, física como química. Esta capa se compone principalmente de queratinocitos y melanocitos. La dermis es prácticamente acelular y se compone de fibroblastos y una matriz con colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas. Esta capa más profunda proporciona a la piel fuerza, flexibilidad y elasticidad (Falanga, 2020). Existe una tercera capa en la piel llamada hipodermis, cuyo grosor varía a lo largo de la superficie corporal. Se compone principalmente de células adiposas que aíslan el cuerpo y permiten conservar el calor (Joodaki & Panzer, 2018).

Figura 1

Representación de las capas de la piel y su espesor.



Fuente: adaptado de Geerlings, 2010.

Propiedades mecánicas

Desde el punto de vista mecánico la piel es una estructura bastante compleja ya que, aunque se encuentra dividida en capas con características muy diferentes, estas reaccionan como un material homogéneo al someterse a una fuerza. El conocer las características mecánicas de este tejido abre la puerta a diferentes aplicaciones (Pawlaczyk et al., 2013). De las propiedades mecánicas de la piel se destacan las siguientes:

Elasticidad de la piel. La piel puede tanto estirarse como comprimirse, manteniendo su estructura sin importar la fuerza a la que se somete, lo que la convierte en un material perfectamente elástico. El módulo de Young de la piel varía según el tipo de prueba que se le realiza y el área analizada, además de ser una variable dependiente de la edad, tal y como se observa en la Tabla 1.

Elasticidad lineal. Durante el estiramiento de la piel, esta se prolonga en dirección de la fuerza, provocando que la distancia entre sus componentes aumente y el grosor se reduzca,

Asimismo, al realizar fuerzas de compresión esta distancia disminuye y el grosor de la piel aumenta.

Anisotropía. Es una variable que aumenta con la edad. La piel presenta un comportamiento anisotrópico porque puede estirarse y contraerse, y los valores varían según la dirección en que ocurra la deformación.

Tabla 1

Mediciones in vivo para el módulo de Young en la piel.

Módulo de Young	Dependencia de la edad	Área corporal de medición	Técnica
18 – 57 MPa	Aumenta de 20 a 70 años	Antebrazo	Succión
0.02 a 0.11 MPa	Disminuye entre los 6 y 60 años	Antebrazo dorsal	Torsión
140 – 200 Pa	Disminuye de 6 a 25 años	Antebrazo	Succión
320 – 540 Pa	Aumenta después de los 25 años		
0.42 MPa	Antes de los 40 años	Antebrazo dorsal	Torsión
0.85 MPa	Después de los 40 años		
1.1 – 1.32 MPa	Aumenta repentinamente después de los 65 años	Antebrazo ventral	Torsión
0.15 MPa	Antes de los 25 años	Antebrazo	Succión
0.25 MPa	Después de los 60 años		
0.08 – 0.26 MPa	Desde los 6 meses hasta los 90 años	Antebrazo ventral	Succión

Fuente: adaptado de Diridollou et al., 2001.

Biomateriales

Los biomateriales se agrupan en tres categorías según su enlace químico: polímeros, cerámicos y metales. También se han tenido en cuenta los *composites*, que son materiales compuestos por moléculas de elementos variados, y los materiales naturales. De esta clasificación se consideran inorgánicos los materiales metálicos y cerámicos, mientras que los polímeros naturales son considerados orgánicos (Kiran & Ramakrishna, 2021). Las estructuras de los materiales varían de acuerdo con la naturaleza de los enlaces, lo que les confiere diferentes propiedades y usos. Por ejemplo, los polímeros se utilizan cuando se requiere flexibilidad, los

metales cuando se debe soportar grandes cargas mecánicas y los composites para mejorar la interacción entre tejidos (Sáenz Ramírez, 2004). Los materiales naturales son aquellos con mayor aplicación en la ingeniería de tejidos, principalmente por sus características de biocompatibilidad, baja antigenicidad y biodegradabilidad. Algunos ejemplos de los materiales naturales más utilizados son el colágeno, la albúmina, la celulosa y la quitina (Kiran & Ramakrishna, 2021).

El colágeno

El colágeno es una molécula de proteína formada por aminoácidos, comprende un tercio de la proteína total del cuerpo y representa las tres cuartas partes del peso seco de la piel humana (Shoulders & Raines, 2009). Es el principal componente de la mayoría de los tejidos blandos, provee soporte estructural, rigidez y resistencia al estiramiento, constituyéndose como la matriz perfecta para la piel, tendones, huesos y ligamentos. Además, las interacciones que ocurren entre el colágeno y las células son vitales para procesos de cicatrización y diferenciación celular. Se han descubierto alrededor de 29 tipos de colágeno (ver Tabla 2), siendo el tipo I el más abundante, pues comprende más del 90% del colágeno en el cuerpo humano (Dinescu et al., 2019; Wu et al., 2022). Esta molécula usada como biomaterial aporta un alto contenido proteico y propiedades funcionales, permitiendo la absorción de agua o la formación de geles. Otro aspecto para tener en cuenta es que es de fácil obtención, pudiendo extraerse de la piel, tendones, cartílagos y huesos de diferentes especies animales, entre ellas las aves y los peces (Karami et al., 2019). Es por esto que, como material, el colágeno, es una apuesta importante en el campo de los biomateriales. Una de las aplicaciones más frecuentes de este polímero natural en forma de apósitos, es decir, en forma de hidrogeles de colágeno, destinados al tratamiento de heridas en la piel y otras aplicaciones biomédicas (Dinescu et al., 2019).

Tabla 2

Ejemplos de tipos de colágeno presentes en el cuerpo humano.

Tipo	Clase	Localización
I	Fibrilar	Piel, huesos, tendones, cornea
II	Fibrilar	Cartilago, cuerpo vítreo
III	Fibrilar	Piel, vasos, intestino, útero
IV	No fibrilar: de membrana basal	Membrana basal, capilares
V	Fibrilar	Piel, huesos, córnea, placenta
VI	No fibrilar: para microfibras	Huesos, vasos, piel, córnea, cartilago
VII	No fibrilar: de anclaje	Mucosas, piel, vejiga, cordón umbilical, líquido amniótico
XII	No fibrilar: asociado a fibrillas con hélices triples interrumpidas	Cartilago, tendones y piel
XIII	No fibrilar: asociado a la membrana con hélices triples interrumpidas	Músculos esqueléticos, corazón, ojo, piel, células endoteliales
XIV	Fibrilar y no fibrilar: asociado a fibrillas con hélices triples interrumpidas	Vasos, ojo, nervios, tendones, huesos, piel, cartilago
XVIII	No fibrilar: múltiples dominios de triple hélice e interrupciones	Pulmones, riñones e hígado
XIX	No fibrilar: asociado a fibrillas con hélices triples interrumpidas	Piel, riñones, hígado, placenta, bazo, próstata
XX	No fibrilar: asociado a fibrillas con hélices triples interrumpidas	Epitelio corneal
XXI	No fibrilar: asociado a fibrillas con hélices triples interrumpidas	Estómago, riñones, vasos, corazón, placenta, músculos esqueléticos
XXVII	Fibrilar	Cartilago
XXVIII	No fibrilar: para microfibras	Células del sistema nervioso
XXIX	No fibrilar: para microfibras	Piel

Fuente: adaptado de Owczarzy et al., 2020.

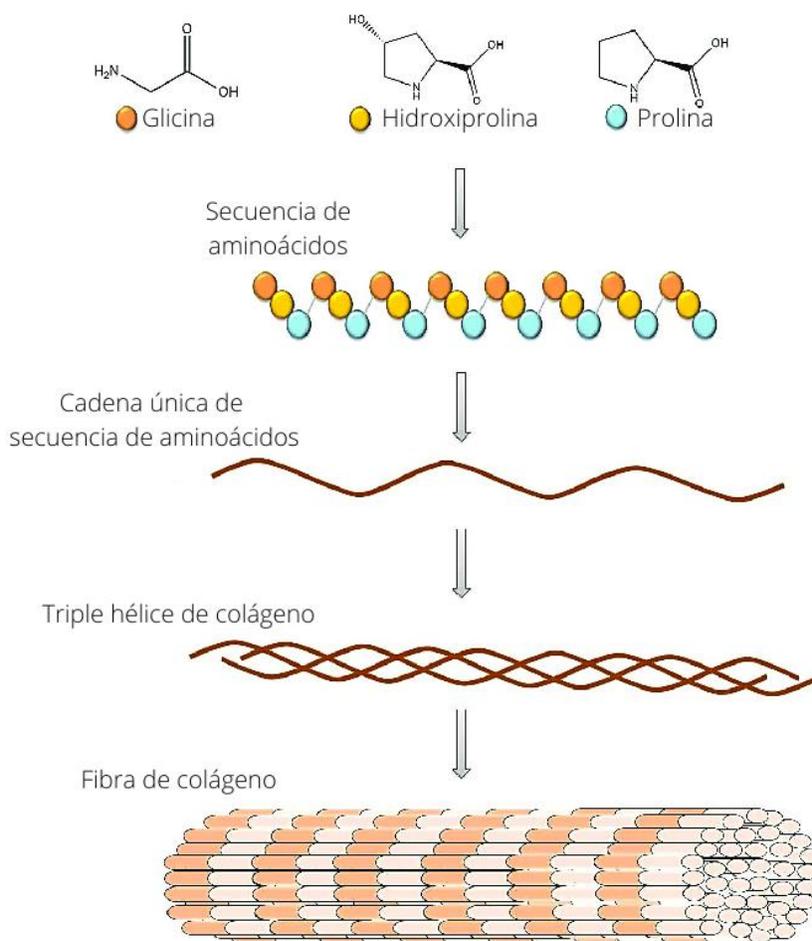
Estructura del colágeno

La unidad estructural básica de las fibras de colágeno es el tropocolágeno, una molécula de triple hélice α con unos 1400 aminoácidos cada una. La glicina (Gly) constituye la tercera parte de cada una de las tres cadenas que forman las fibras de colágeno, formadas por tripletes Gly-X-Y, donde X por lo general es prolina (Pro) y la Y hidroxiprolina (Hyp) o lisina (Lis). A partir de la agregación de estas estructuras mediante enlaces laterales se forman las fibras de colágeno, tal y como se representa en la Figura 2. Los diferentes tipos de colágeno que existen se reúnen en dos grupos principales, el colágeno fibrilar y el no fibrilar. El primero de estos se encarga de formar

fibrillas y constituye alrededor del 90% del colágeno del cuerpo. El no fibrilar, aunque menos abundante, es parte vital de muchos órganos (Owczarzy et al., 2020).

Figura 2

Estructura del colágeno.



Fuente: adaptado de Sobczak-Kupiec et al., 2021.

Propiedades y aplicaciones del colágeno

El colágeno es responsable de conferir a los tejidos características mecánicas como resistencia a la tracción, lo que permite mantener la estructura de la matriz frente a deformaciones y esfuerzos exógenos, además de otorgar estabilidad térmica. Debido a que presenta diferentes dominios de unión a matriz, posee la capacidad de reticularse con otras proteínas de la matriz. Otra

propiedad importante es su capacidad de retener agua, lo que lo hace soluble en agua y resistente a moléculas como la tripsina (Owczarzy et al., 2020). Otras propiedades importantes del colágeno es que presenta excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y antigenicidad débil (Tian et al., 2021).

El colágeno suele utilizarse como la base para la creación de distintos tipos de biomateriales, siendo estos claves para la reparación de tejidos y curación de heridas (Jafari et al., 2020). También se destacan aplicaciones en cirugía dental, oftalmología, ortopedia y medicina estética. Algunas de las aplicaciones más frecuentes del colágeno como material se reportan en la Tabla 3.

Tabla 3

Aplicaciones médicas del colágeno.

Área	Aplicación
Regeneración de piel	Reproducción de defectos de la piel.
	Reconstrucción de piel <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
	Entrega de fármacos para cicatrización.
	Tratamiento de quemaduras graves y escaras.
Cirugía dental e implantología	Regeneración de la piel post-implante, cierre de fístulas sinusales, corrección de defectos del tejido óseo y cartilaginoso.
Oftalmología	Tratamiento de defectos corneales, reconstrucción del epitelio corneal después de la extirpación quirúrgica, suministro de fármacos a la superficie del globo ocular.
Urología y ginecología	Cirugía plástica de vejiga, tratamiento de estenosis uretral.
Ortopedia	Tratamiento de vértebras y meniscos.
Laringología	Tratamiento de cuerdas vocales y epiglotis.
Neurología	Regeneración de nervios periféricos (experimental).
Medicina estética	Relleno de arrugas, regeneración de cicatrices, mejora del contorno facial, mejora general de la piel.

Fuente: adaptado de Owczarzy et al., 2020.

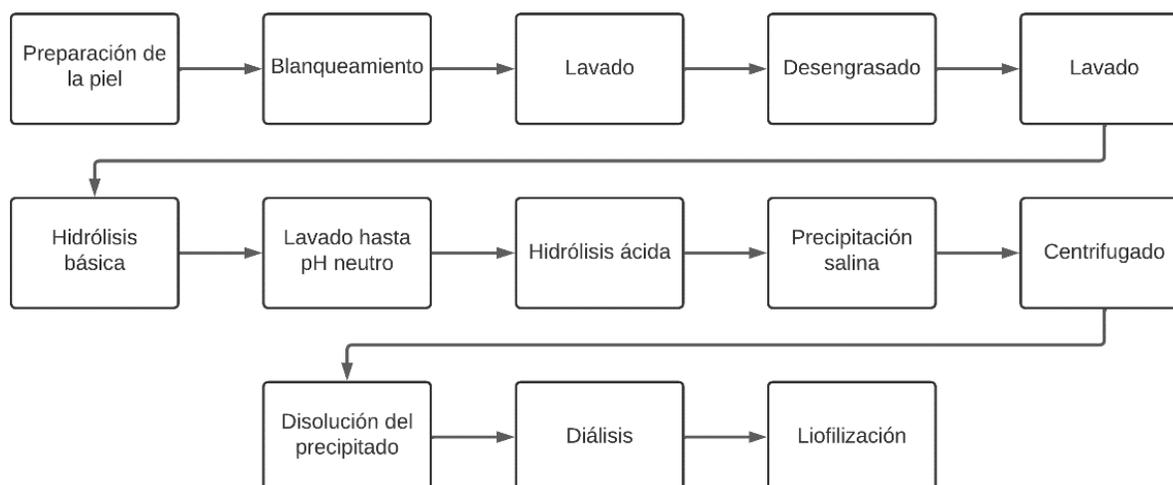
Fuentes y proceso de extracción del colágeno

El colágeno se puede extraer de los tendones, cartílagos, huesos y la piel de diferentes animales como bovinos y porcinos, así como de la cola de rata. También existen alternativas en los que el colágeno es extraído de aves y peces (Karami et al., 2019; Techatanawat et al., 2011). Algunos estudios han caracterizado tanto a aves como a peces como fuentes importantes del colágeno. La tilapia hace parte de la producción acuícola con mayor crecimiento en la última década (MinAgricultura - SIOC, 2020), pero sus subproductos por lo general son desechados o destinados a usos de bajo valor agregado. Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de la piel de esta especie se consolida como una fuente promisoría para la obtención de colágeno.

Cuando el proceso de extracción de colágeno utiliza como materia prima la piel de tilapia, por lo general el proceso consta de ocho etapas principales, los cuales se pueden ver en la Figura 3.

Figura 3

Proceso estandarizado para la extracción de colágeno soluble en ácido (ASC por sus siglas en inglés) a partir de la piel de tilapia roja.



Fuente: elaboración propia. Adaptado de Ramírez et al., 2022.

A continuación, se explican cada una de las etapas principales del proceso:

Preparación de la piel. La piel debe permanecer congelada hasta su uso. Al iniciar el proceso se deben registrar las características de la piel, tales como color, tamaño, textura; esto con el fin de conocer detalladamente la materia prima inicial. De igual forma se debe tener en cuenta la cantidad de piel con la que inicia el proceso, así como si ésta será cortada o trabajada completa, de acuerdo con las condiciones disponibles en el área de trabajo (Zeng et al., 2009).

Blanqueamiento. Mediante este proceso se busca aclarar la piel de la tilapia, eliminando los pigmentos presentes en ella. De esta forma, la tonalidad del producto final será blanquecina y no grisácea. Para este fin se hace uso de agentes blanqueadores, como por ejemplo hipoclorito de sodio (cuya fórmula química es NaClO), compuesto más conocido como cloro o lejía. Este compuesto químico es el de uso más común ya que es fácil de eliminar con el uso de agua destilada y además tiene propiedades desinfectantes, por lo que también se están eliminando de la piel microorganismos que pudieran afectar el producto final (Quintero & Zapata, 2017).

Desengrasado. Esta etapa, también conocida en la literatura como la eliminación del extracto etéreo, es llevado a cabo en la mayoría de los estudios que utilizan subproductos de mar. De esta manera se elimina la grasa presente en la muestra, asegurando su no presencia en el producto final. El compuesto de uso frecuente para este fin es el disolvente conocido como n – butanol, un tipo de alcohol butílico. Finalizado este proceso se debe retirar el compuesto de las muestras para no afectar la calidad del producto final.

Hidrólisis básica. Mediante este proceso se busca eliminar toda molécula no colágena que se encuentre presente en la muestra. Para esto se suele tratar la muestra con soluciones alcalinas como el hidróxido de sodio (NaOH), teniendo en cuenta que la concentración de este compuesto no puede ser muy alta, ya que podría afectarse el colágeno. De acuerdo con las investigaciones

encontradas, este proceso es efectivo cuando se realiza a bajas temperaturas. Finalizado este proceso se debe asegurar llevar la muestra de piel a un pH neutro para no interferir con las etapas subsiguientes (Zeng et al., 2009).

Hidrólisis ácida. Teniendo en cuenta que la muestra solo cuenta con moléculas de colágeno, el objetivo de esta etapa es disolverlas. Para ello se trata la piel de la tilapia con soluciones ácidas, donde la de uso más común de acuerdo con la literatura es el ácido acético (CH_3COOH), a concentraciones más altas que en la etapa anterior. Este proceso nuevamente se debe realizar a una baja temperatura, por lo general a 4 °C.

Precipitación salina. Su nombre en inglés es *salting out* y es una técnica de purificación que utiliza la concentración salina del medio para precipitar solutos como proteínas o polímeros, esto debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas (Riera et al., 2010). El proceso suele llevarse a cabo utilizando solución de NaCl a bajas temperaturas. Una vez se tiene el precipitado, este debe centrifugarse para separar las soluciones, tanto ácidas como salinas, de la muestra de colágeno.

Diálisis. Esta etapa se realiza con el fin de eliminar los residuos de iones de sal y ácido que aún permanecen en el colágeno extraído, disminuyendo el pH de este. Para poder llevar a cabo el proceso, el colágeno que se ha obtenido hasta este punto debe ser disuelto en una solución ácida, donde nuevamente se utiliza el ácido acético. Esta solución se deposita en membranas, las cuales se sumergen en ácido acético a una concentración menor, lo que permite la migración de iones y disminución del pH. Se utilizan dos medios para la diálisis: inicialmente se hace con ácido acético cuya concentración será menor a la del ácido utilizado para disolver el colágeno y después el ácido debe reemplazarse con agua destilada para evitar desnaturalizar el colágeno obtenido (Ramírez et al., 2022).

Liofilización. Finalmente, y para que sea posible almacenar el colágeno hasta su uso, este debe ser liofilizado, con el fin de conservar la estabilidad de la proteína.

Plasma pobre en plaquetas (PPP)

La cantidad de plaquetas en sangre oscila entre 150.000 y 450.000 plaquetas por microlitro de sangre. El PPP es un derivado del plasma cuyos niveles de plaquetas se encuentran muy por debajo de los niveles basales en sangre total, puesto que su concentración es de apenas 50.000 plaquetas/ μ L (Chellini et al., 2019; Zhang et al., 2020). Los principales componentes del PPP son el fibrinógeno, la fibronectina y la trombina y de sus características se destaca su participación en los procesos de la hemostasia y la coagulación. Se ha demostrado que puede mantener el crecimiento y supervivencia celular, ya que promueve la proliferación de fibroblastos y células epiteliales, siendo determinante en procesos asociados a la cicatrización de heridas (Zhang et al., 2020).

Hidrogeles

Son estructuras de red tridimensional compuestas principalmente por macromoléculas hidrofílicas reticuladas, las cuales pueden ser naturales o sintéticas. Su principal característica es la capacidad de absorber agua, soluciones acuosas o fluidos fisiológicos, pero a pesar de ello conservarse insolubles. Esto les permite imitar con facilidad la matriz extracelular de los tejidos naturales, facilitando su uso en la renovación de tejido tridimensional. Entre las diferentes aplicaciones de los hidrogeles se encuentran la administración controlada de fármacos, elaboración de lentes de contacto, revestimiento de órganos y desarrollo de membranas para biosensores (Peppas et al., 2012).

Las diferentes formas de fabricar un hidrogel se agrupan en dos categorías principales: entrecruzamiento químico y entrecruzamiento físico. Los métodos pertenecientes al grupo del

entrecruzamiento químico, que produce enlaces covalentes, incluyen la polimerización por radicales, la química clic, termogelificación y el entrecruzamiento por radiación (Catoira et al., 2019). El agente más comúnmente utilizado para el entrecruzamiento químico es el glutaraldehído, aunque su uso es aún controvertido debido a su citotoxicidad. Otras alternativas propuestas incluyen derivados de aldehídos sintéticos y naturales, ácido algínico y polifenoles naturales entre otros (Gu et al., 2019). El entrecruzamiento físico es utilizado principalmente para la elaboración de hidrogeles naturales, y abarca métodos como la reticulación iónica, interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno (Catoira et al., 2019). Generalmente, las técnicas físicas son consideradas simples y seguras, así como menos citotóxicas comparadas con los métodos químicos. Un tipo de entrecruzamiento que ha despertado particular interés en los últimos años es el de tipo enzimático, debido a su excelente especificidad y cinética precisa en la reacción (Gu et al., 2019). Cuando se habla de enlaces físicos se hace referencia a enlaces no covalentes, mientras que los enlaces químicos por lo general se refieren a enlaces covalentes. Las propiedades de un hidrogel, dadas por el grado de entrecruzamiento, juegan un papel importante en cuán adecuado es para una aplicación determinada (Peppas et al., 2012).

Úlceras crónicas de pie diabético (UCPD)

Las UCPD son una de las principales consecuencias de la diabetes, y se dan por factores como la pérdida del control glucémico, la neuropatía periférica, la enfermedad vascular periférica y la inmunosupresión (Aumiller & Dollahite, 2015). La aparición de estas heridas se da usualmente en aquellos puntos de mayor presión en los pies, como por ejemplo en los talones. Es muy frecuente el que los pacientes desconozcan que han desarrollado una úlcera debido a los defectos causados por la neuropatía sensorial (Chiang et al., 2018). La escala de Meggitt-Wagner evalúa la

profundidad de la úlcera y la presencia de osteomielitis o gangrena mediante el uso de los grados que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4

Sistema de clasificación de úlceras de Meggitt – Wagner.

Grado de la úlcera	Características
0	Sin lesión abierta o lesión preulcerosa: puede haber deformidad o celulitis.
1	Úlcera de espesor parcial o total (superficial).
2	Úlcera profunda extendida a ligamento, tendón, cápsula articular, hueso o fascia profunda, sin absceso ni osteomielitis.
3	Absceso profundo, osteomielitis o sepsis articular.
4	Gangrena parcial del pie.
5	Gangrena total del pie.

Fuente: adaptado de Monteiro-Soares et al., 2020.

La fisiopatología de las UCPD se explica por la neuropatía, la enfermedad arterial oclusiva y la infección (Bandyk, 2018). El daño neurológico afecta fibras de tipo motoras, sensitivas y autonómicas, que cuando fallan producen atrofia muscular, que a su vez lleva a la aparición de puntos de alta presión en la superficie plantar. La neuropatía autonómica simpática provoca vasodilatación y disminuye la sudoración, lo que genera un ambiente propicio para las heridas (Bandyk, 2018; Pereira C. et al., 2018). La enfermedad arterial oclusiva o isquemia es el resultado de un fallo de las arterias femorales, poplíteas, tibiales, peroneas y pedias. Aunque esta enfermedad no se encuentra directamente relacionada con la presencia de UCPD, sí es la principal causa evitable de amputación del miembro (Pereira C. et al., 2018). Hablar de infección en las UCPD puede abarcar desde la celulitis no complicada hasta la fascitis necrosante, amenazando con la vida del paciente (Bandyk, 2018).

Tratamientos actuales para las UCPD

Son muy utilizados los apósitos, los cuales actúan como protección y barrera con fuerzas externas contaminantes, a la vez que promueven la absorción del exudado alrededor de la úlcera. Los apósitos actuales cuentan cada vez con métodos más avanzados para promover la cicatrización de las heridas. Entre estos se encuentran los alginatos, apósitos de espuma, hidrocoloides, hidrogeles, compuestos yodados, apósitos de baja adherencia y apósitos impregnados de plata (Lim et al., 2017).

Apósitos de colágeno. Se componen principalmente de colágeno tipo I extraído de diversas fuentes animales como bovinos y porcinos (Silvipriya et al., 2015). En la actualidad son utilizados en el tratamiento de lesiones de la piel, tales como las quemaduras y las UCPD. Una gran ventaja al usar este tipo de apósitos es la capacidad de proliferación celular, especialmente de fibroblastos. De igual forma, el colágeno propicia un ambiente adecuado en cuanto a temperatura y propiedades químicas en las heridas, además de inhibir el exceso de metaloproteinasas, enzimas que dificultan el proceso de cicatrización (Fleck & Simman, 2010).

Hidrogeles de colágeno. La matriz extracelular (MEC) cumple un papel fundamental en procesos clave de la biología celular, contrario a lo que se creía hace un par de décadas. En la mayoría de los tejidos, el componente más abundante de la MEC es el colágeno tipo I. Por lo tanto, fabricar hidrogeles que tienen como base este tipo de colágeno es ventajoso para el cultivo celular, ya que imitan de manera adecuada el tejido nativo, y además por las características propias del polímero. Sin embargo, la mayor desventaja que presentan estas estructuras radica en sus propiedades mecánicas, pues son tan bajas que no proporcionan soporte estructural alguno (Osidak et al., 2021).

Capítulo 3. Estado del arte

Desde épocas antiguas el hombre y las civilizaciones han utilizado materiales para reparar y solucionar problemas corporales. Por ejemplo, el hombre Neandertal utilizaba madera para implantes dentales y en el antiguo Egipto se manipulaban los tendones de animales como suturas. De igual forma se ha registrado que en la Europa del siglo XVI se comenzó a utilizar el oro y la plata para reparaciones dentales, así como hilos de hierro para la inmovilización de fracturas (Vallet-Regí, 2022). Solo en los últimos 50 años se estandarizó el uso de materiales naturales como productos médicos gracias al desarrollo de tecnologías de limpieza y procesos de esterilización. Es por ello que muchos estudios recientes han resumido las diferentes aplicaciones del colágeno como material (Meyer, 2019). De igual forma en la última década el interés por el uso de sustancias bioactivas en aplicaciones médicas ha aumentado de forma importante. Se ha demostrado que el uso de factores de crecimiento influye en procesos como la quimiotaxis, la diferenciación y proliferación celular y además potencian los procesos de cicatrización (Cheng et al., 2010).

El rápido avance en los métodos de ingeniería de tejidos estimuló el desarrollo de tecnologías y enfoques para la fabricación de apósitos utilizando materiales naturales como el colágeno. Teniendo en cuenta lo ventajosas que son las propiedades del colágeno para la elaboración de hidrogeles, así como la facilidad en la obtención del material, se ha convertido en una herramienta frecuentemente utilizada en diferentes estudios (Osidak et al., 2021). En el año 2012 se llevó a cabo una investigación por parte de Grover et al. donde se compararon las propiedades físicas de hidrogeles de colágeno tipo I puro, hidrogeles de gelatina pura e hidrogeles donde se mezclaban estos componentes con elastina o entre ellos, con el fin de obtener propiedades físicas similares a las del miocardio. Se estableció que la utilización de andamios con base de colágeno o gelatina, junto con la utilización de distintos métodos de reticulación, permite mejores

propiedades mecánicas, y a su vez, propiedades físicas que coinciden con el tejido nativo, por lo que son buena alternativa para su uso aplicaciones de tejidos blandos. Sin embargo, tanto el material utilizado como base del andamio, así como el método de reticulación empelado, dependen de la aplicación para la cual sea destinado el hidrogel. Por ejemplo, el usar gelatina como proteína base produce un hidrogel con menor rigidez y rápida degradación, por lo que su uso en lugar del colágeno debe ser enfocado en aplicaciones que requieran baja resistencia a la degradación y baja resistencia mecánica. Otro estudio se encargó de destacar las propiedades de diferenciación celular del colágeno. Este se llevó a cabo por Carretero Villanueva (2014) quien propuso la elaboración de un andamio con capacidad osteoconductiva, combinando alcohol polivinílico (PVA), colágeno tipo I y apatita carbonatada (CAp). El utilizar PVA en una proporción 6:94, Colágeno tipo I a una concentración del 0.8% y CAp cuya concentración sea del 0.6%, permitió obtener un hidrogel con el tamaño de poro adecuado, condición que estimuló la adhesión y proliferación de células de médula ósea y otras líneas celulares. Por lo anterior se sugirió que el compuesto podía tener potencial osteoconductivo, puesto que indujeron la diferenciación osteoblástica y se logró evidenciar depósitos de calcio en la matriz extracelular. Sin embargo, en el estudio no se tuvo en cuenta el estudio de las características mecánicas de los hidrogeles fabricados.

Hace poco más de una década, para el año 2010, Cheng et al., desarrollaron un estudio que buscaba comprobar que componentes del plasma rico en plaquetas (PRP), es decir, plaquetas (PL) y PPP, influyen de manera significativa en la viabilidad y actividad metabólica de las células del ligamento cruzado anterior (LCA), induciendo además la expresión de genes de colágeno para la cicatrización. Para lograr su cometido, elaboraron hidrogeles a base de PPP y colágeno soluble en ácido, el cual se extrajo del tejido capsular de rodilla de bovino. El estudio demostró que el PRP mejoró la viabilidad celular en un cultivo 3D, mientras que el utilizar sus componentes de forma

independiente en los cultivos no tuvo aportes significativos. No hace mucho, en el 2019, Natesan et al., desarrollaron una terapia rentable y clínicamente utilizable a través de la cual, haciendo uso de un hidrogel de plasma libre de plaquetas (PLP) modificado con polietilenglicol, fuese posible tratar quemaduras de tercer grado, también llamadas de quemaduras de espesor total. El andamio fabricado utiliza además células madre derivadas de tejido adiposo humano (ASC). Este estudio realiza importantes aportes en cuanto a la utilización de un derivado del plasma sanguíneo como base para la preparación de hidrogeles. Se concluye que estos andamios de plasma PEGilado combinados con ASC son una potencial terapia para el tratamiento de este tipo de quemaduras. Un par de años más tarde, Montero et al., (2021), utilizaron diferentes concentraciones de fibrina derivada del PPP para elaborar hidrogeles. Estos scaffolds se utilizaron para estudiar cuál sería la concentración adecuada de fibrina que permitiera realizar cultivos de piel in vitro, mejorando su utilidad. Se lograron obtener sistemas que permitieron la prueba de fármacos, cosméticos, productos químicos e inclusive pieles que darían herramientas al especialista para dar al paciente tratamiento óptimo y personalizado.

Conociendo las ventajas que ofrecen tanto el uso del colágeno como material, así como el uso del plasma y sus derivados en diferentes aplicaciones, también se han realizado ensayos donde se combinan estos materiales para fines específicos. Chung et al., (2015) elaboraron hidrogeles de fibrina PEGilada (fibrina-P) como un scaffold portador de ASC para fomentar la angiogénesis local, y compararon el uso y efecto de este hidrogel con el de otro elaborado a partir de colágeno tipo I extraído de cola de rata y fibrina. Los hidrogeles formados por fibrina-P brindan ventajas únicas sobre las matrices de colágeno, en particular al localizar de forma estable y apoyar mecánicamente, mientras que permitieron el reclutamiento de componentes de matriz en el gel y otros tejidos cercanos. En los geles de fibrina-P se formaron redes más alargadas e interconectadas,

además de que se expresaron proteínas de fenotipo angiogénico y endotelial. Para el año 2016, Houdek et al. lograron formar un hidrogel que, combinando colágeno tipo I proveniente de la cola de rata y PRP, tuviera potencial uso para el tratamiento de heridas. El andamio logró una alta tasa de reparación tisular pues tenía la capacidad de reclutar células madre dérmicas del tejido adyacente. Asimismo, este estudio presenta bases para la elaboración de hidrogeles que combinan el colágeno con derivados del plasma, ya sea PRP o PPP. El colágeno y la fibrina, derivado del PPP, tienen la capacidad al combinarse de crear un hidrogel compacto y fuerte, lo que da origen a matrices con buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, modificar los hidrogeles con materiales naturales no siempre conduce al resultado deseado, es decir, un hidrogel mecánicamente estable y biológicamente activo. Si se tienen en cuenta los hidrogeles cuya base son materiales sintéticos, estos no proporcionan sitios de adherencia naturales para las células, dificultando su uso en aplicaciones biomédicas. Como resultado, en la actualidad las combinaciones de polímeros sintéticos y proteínas naturales son una opción atractiva, pues los hidrogeles resultantes presentan una gran resistencia mecánica, son biocompatibles y permiten controlar sus características fisicoquímicas (Schneider-Barthold et al., 2016).

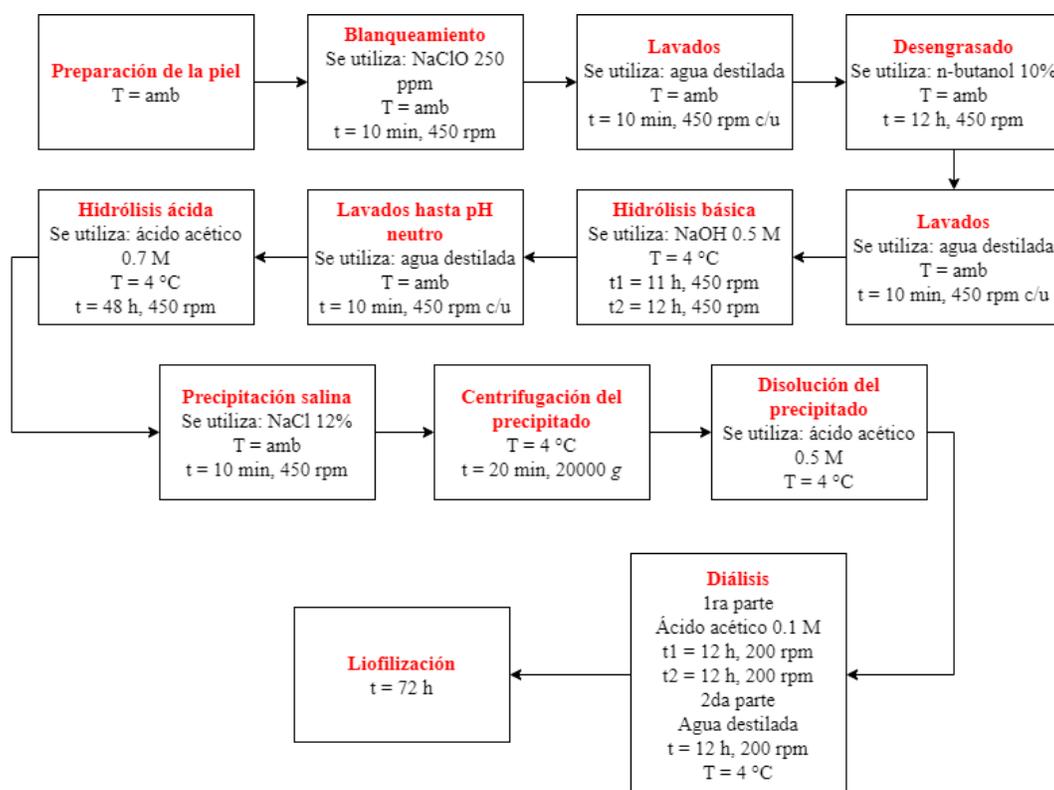
Capítulo 4. Metodología

Extracción de colágeno a partir de piel de tilapia roja

El proceso se realizó teniendo en cuenta el protocolo estandarizado por Ramírez et al. (2022). Los detalles del protocolo se reportan en la Figura 4, teniendo en cuenta que de ahora en adelante cuando se haga referencia a temperatura ambiente (amb) será la del Laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB, es decir, 21 °C. De igual forma, las relaciones peso/volumen (p/v) se expresan en miligramo/mililitro, mientras que las de volumen/volumen (v/v) se expresan en mililitro/mililitro.

Figura 4

Diagrama de flujo del proceso para la extracción de colágeno ASC a partir de la piel de tilapia roja.



Nota: T: temperatura, t: tiempo.

Preparación de la piel de tilapia roja

La piel de tilapia se adquirió en una pescadería ubicada en la plaza de mercado de guarín, en la ciudad de Bucaramanga, Santander. Luego estas se llevaron al laboratorio, donde se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Cuatro horas antes de iniciar el proceso de extracción del colágeno, la piel se trasladó a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, pasado este tiempo, la piel se descongeló por una hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiraron los trozos de músculo y las escamas que seguían adheridas y se registraron las características físicas de la piel, incluyendo la apariencia, el color, la textura y el olor. Para iniciar el proceso se toma un trozo de piel con un peso de aproximadamente 2000 mg y se corta en trozos pequeños, los cuales se vuelven a pesar.

Blanqueamiento de la piel

Este proceso se llevó a cabo utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 250 ppm y a una proporción 1:10 p/v respecto al peso inicial de la piel. Los trozos de piel se depositaron en la solución y se mantuvieron en agitación constante a 450 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el proceso, la piel se lavó en dos ocasiones haciendo uso de agua destilada en una proporción 1:30 p/v respecto al peso inicial, agitando a 450 rpm por cinco minutos y temperatura ambiente cada uno, con el fin de eliminar los rastros de NaClO presentes en la piel.

Desengrasado de la piel

El reactivo utilizado para este proceso es n – butanol al 10%, en una proporción 1:10 v/v respecto al peso inicial de la piel. La piel se depositó en la solución y se mantuvo en agitación constante a 450 rpm por 12 horas a temperatura ambiente. Al igual que en el paso anterior y buscando eliminar el n – butanol de las pieles, se hicieron dos lavados con agua destilada, cada uno bajo las mismas condiciones de los lavados realizados anteriormente.

Hidrólisis básica de la piel

Los trozos de piel se trataron utilizando hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 0.5 M, utilizando un volumen del reactivo 10 veces mayor al peso inicial de piel. El proceso se realizó en dos etapas: en la primera de ellas se agitó a 450 rpm a 4 °C por 11 horas, mientras que en la segunda etapa el proceso se cambió el ácido y se tuvo las mismas condiciones de temperatura y velocidad angular, pero por un periodo de 12 horas. Finalizada la segunda etapa, los trozos de piel se sometieron a lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, es decir, entre 6.8 y 7.2, utilizando 150 mL y agitando a 450 rpm por 5 minutos en cada uno de ellos.

Extracción ácida de la piel

Para llevar a cabo este proceso se utilizó ácido acético (CH₃COOH) a una concentración de 0.7 M, utilizando un volumen 40 veces mayor al de piel inicial. La piel se mantuvo en agitación constante a 450 rpm a 4 °C por un periodo de 48 horas. Finalizada la agitación, los trozos de piel se habían disuelto y la solución resultante se filtró haciendo uso de tul.

Salting-out del precipitado

La solución obtenida luego del filtrado se depositó en un vaso de precipitado junto con cloruro de sodio (NaCl) al 12%, en una proporción 1:1 v/v, y se agitó a 450 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Esto provocó un precipitado, el cual nuevamente se filtró, recolectó y envasó en tubos eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 20000 g por 20 minutos a 4 °C y el precipitado resultante se envasó en tubos falcon de 50 mL, agregando 3 mL del precipitado junto con 50 mL de CH₃COOH 0.5 M. Estos tubos se almacenaron a 4 °C hasta que el precipitado se hubiera disuelto completamente.

Diálisis del colágeno

Una vez que el colágeno se disolvió completamente, este se depositó en membranas de diálisis, las cuales se sumergieron inicialmente en ácido acético 0.1 M por 24 horas, cambiando el ácido pasadas 12 horas. Luego de esto, el ácido se reemplazó con agua destilada, la cual se cambió cada 12 horas hasta conseguir que el pH alcanzara un valor entre 6.1 y 6.3. Todo el proceso se llevó a cabo bajo agitación suave, es decir, 200 rpm a 4 °C. El producto obtenido al finalizar la diálisis se distribuyó en tubos falcon de 50 mL, depositando en cada uno de ellos 35 mL de la solución dializada. Los tubos se congelaron inicialmente por 12 h a -20 °C y luego se trasladaron a -80 °C hasta el siguiente paso.

Liofilización del colágeno

Los tubos se retiraron del congelador y las tapas se reemplazaron con papel filtro, el cual se aseguró con bandas elásticas. Las muestras se liofilizaron utilizando una temperatura inferior a los -50 °C y una presión de vacío inferior a 0.014 mbar por 72 horas. El producto obtenido tras este periodo se pesó y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta su uso, sellando la tapa con parafina para evitar la entrada de humedad en los tubos.

Rendimiento de extracción de colágeno ácido soluble (ASC)

El rendimiento de la extracción de colágeno se calculó:

Rendimiento en base seca. Se relacionó el peso del colágeno liofilizado (W_{col}) con el peso obtenido al liofilizar un trozo de piel del mismo peso que el utilizado inicialmente (W_d).

$$Rendimiento_{Base\ seca} = \frac{W_{col}}{W_d} * 100 \quad (1)$$

Rendimiento en base húmeda. Se relacionó el peso del colágeno liofilizado (W_{col}) con el peso inicial utilizado de piel, luego de cortarla en trozos (W_{piel}).

$$Rendimiento_{Base\ húmeda} = \frac{W_{col}}{W_{piel}} * 100 \quad (2)$$

Elaboración de hidrogeles

Hidrogeles de colágeno (H_C)

Inicialmente se preparó una solución stock de colágeno a una concentración de 8 mg/mL. Para esto se utilizó el colágeno liofilizado, el cual se disolvió en ácido acético a una concentración 0.2 N, realizando agitaciones manuales de manera constante. Una vez que la mezcla se había homogenizado, se centrifugó a 1200 g por 15 minutos a 4 °C. Para elaborar los hidrogeles a las concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/mL se debe hacer uso de las siguientes soluciones en ese orden: solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 10X, agua destilada y un agente neutralizante, en este caso NaOH a 0.1 N. De ahora en adelante estas soluciones serán llamadas Col_{0.15}, Col_{0.3} y Col_{0.5}. Se deben tener en cuenta las siguientes ecuaciones para lograr las concentraciones ya mencionadas en los hidrogeles:

$$V_{PBS} = \frac{V_H}{10} \quad (3)$$

$$V_{col} = \frac{V_H * C_H}{S_C} \quad (4)$$

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

$$V_{dH_2O} = V_H - V_{col} - V_{PBS} - V_{NaOH} \quad (6)$$

Donde V_{PBS} es volumen de PBS concentrado a 10X, V_H es volumen final del hidrogel, V_{col} es volumen de solución de colágeno, C_H es concentración deseada para el hidrogel, S_C es solución stock de colágeno, V_{NaOH} es el volumen de NaOH y V_{dH_2O} es el volumen de agua destilada para formar un hidrogel. Estos cálculos permiten conocer los volúmenes necesarios para fabricar un

único hidrogel a la concentración deseada. Por lo tanto, para obtener los volúmenes necesarios para fabricar n hidrogeles, se deben de multiplicar.

Calculados los volúmenes necesarios de cada una de las soluciones mencionadas, estas se agregaron en un tubo falcon de 15 mL en el siguiente orden: PBS 10X, agua destilada, solución stock de colágeno 8 mg/mL y NaOH 0.1 N. Cuando la mezcla se hubo homogenizado, esta se depositó de a 300 μ L en una placa de 48 pozos, la cual se incubó a 37 °C y CO₂ al 5% por una hora. Pasado este tiempo se retiraron los hidrogeles y se sumergieron en cloruro de calcio (CaCl₂) a una concentración de 40 mM por 16 horas a 4 °C. Finalizado el periodo de reticulación los hidrogeles se depositaron en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente.

Hidrogeles de PPP y colágeno (H_{C+PPP})

Para la elaboración de estos hidrogeles, inicialmente se fabricaron hidrogeles de colágeno puro a las diferentes concentraciones. Estos se sumergieron en 800 μ L de un *pool* de PPP, el cual previamente había sido preparado mezclando muestras de diferentes pacientes. Los hidrogeles permanecieron en la mezcla por 1 hora a 4 °C. Finalizado este periodo, al igual que con los hidrogeles de colágeno puro, se depositaron en CaCl₂ 40 mM por 16 horas a 4 °C, permitiendo la reticulación del PPP en la red de colágeno. Finalizado este periodo, los hidrogeles se sumergieron en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, permitiendo su hinchamiento y la eliminación de toda partícula no reticulada.

Hidrogeles de PPP (H_{PPP})

Para la elaboración de estos hidrogeles (hidrogeles control) se utilizó el *pool* de plasma previamente elaborado y cloruro de calcio a una concentración de 600 mM, con el fin de asegurar una concentración final de 40 mM, igual a la utilizada en la elaboración de los demás hidrogeles. En tubos eppendorf se depositaron 280 μ L del PPP junto con 20 μ L del CaCl₂, para obtener un

volumen final de 300 μL . Una vez que la mezcla se homogenizó en los tubos, se almacenaron por 16 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente y al igual que con los hidrogeles anteriores, estos se depositaron en PBS 1X bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

Concentración de proteínas en los hidrogeles

Se elaboraron H_C , $\text{H}_{\text{C}+\text{PPP}}$ y H_{PPP} de acuerdo con la metodología mencionada anteriormente y se registraron sus dimensiones. Una vez que se conocieron las medidas de los geles, se quiso conocer si el PPP se había interpenetrado de forma adecuada. Para esto unos hidrogeles se introdujeron en tubos eppendorf, se trituraron y se centrifugaron a 5000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Hecho esto, se tomaron 2 μL del sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas que habían sido inmovilizadas en los geles, haciendo uso del espectrofotómetro NanoDrop One de la marca ThermoFisher, donde se seleccionó la configuración llamada *Protein A280*, con el tipo de proteína BSA (siglas en inglés para albúmina de suero bovino) y eliminando la corrección de línea de base.

De igual forma se quiso conocer si los hidrogeles liberaban el PPP de manera continua. Para ello, los hidrogeles se depositaron en 200 μL de PBS 1X en una placa de 48 pozos, la cual se llevó a incubación bajo condiciones estándar (37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2) por un periodo inicial de 72 horas. Pasado este tiempo se cuantificó la concentración de las proteínas liberadas por los hidrogeles, para lo cual se tomó 2 μL del sobrenadante de cada pozo y se depositó en el espectrofotómetro, procedimiento que se repitió cada 24 horas hasta un total de 168 horas o 7 días. Finalizado el periodo de incubación, los hidrogeles se maceraron y centrifugaron por 5 minutos a 5000 g, y se tomó el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteínas inmovilizadas en los hidrogeles tras el periodo de liberación.

Pruebas mecánicas

Prueba mecánica de compresión (PMC)

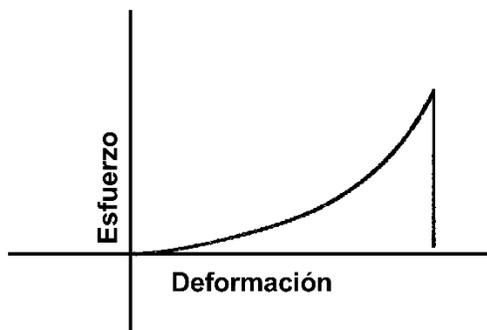
Para llevar a cabo esta prueba se elaboraron H_C , H_{C+PPP} y H_{PPP} a los cuales se les midió tanto su diámetro como su espesor. Se utilizó el banco de carga ElectroForce 3200 Serie III, donde se utilizó una celda de carga de 2.5 N y platos de compresión propios del equipo, de los cuales el superior realizó la compresión, mientras que el inferior permaneció inmóvil y se encargó de registrar la fuerza aplicada. Asimismo, el equipo se configuró para aplicar una velocidad de deformación de 0.05 mm/s, comprimiendo los geles hasta alcanzar la mitad de su altura o espesor inicial.

Con los datos proporcionados por el equipo, así como con los datos de las dimensiones de los hidrogeles, se calculó el esfuerzo (σ), haciendo una relación entre la carga aplicada, expresada en newtons (N) y el área transversal del hidrogel, expresada en m^2 . También se calculó la deformación sufrida por los hidrogeles tras la prueba, relacionando el desplazamiento a lo largo de la PMC con el espesor inicial de cada hidrogel. Con estos datos se graficó una curva Esfuerzo vs Deformación, como la que se puede apreciar en la Figura 5, de la cual se tuvo en cuenta la sección lineal para posteriores análisis. La pendiente de esta recta corresponde a la deformación elástica, para obtener así el módulo de compresión (K).

Al finalizar la prueba se volvieron a registrar las dimensiones de los hidrogeles y estos se sumergieron en PBS 1X por 72 horas, para determinar si los hidrogeles tenían la capacidad de hincharse nuevamente.

Figura 5

Curva Esfuerzo vs Deformación.



Prueba mecánica de tensión (PMT)

Se elaboraron los diferentes hidrogeles (H_C , H_{C+PPP} y H_{PPP}), a los cuales se les realizó un corte concéntrico para darles forma de anillo. Estos tenían 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno. Se utilizó el banco de carga para poder llevar a cabo la prueba, al igual que con la PMC. Sin embargo, en esta ocasión se utilizaron soportes personalizados y una velocidad de deformación de 0.1 mm/s, aplicando la fuerza hasta que los anillos se rompieron.

Prueba de hinchamiento

Se fabricaron H_C , H_{C+PPP} y H_{PPP} de acuerdo con los protocolos ya mencionados anteriormente. Una vez que se permitió el hinchamiento de estos, se colocaron en una superficie plana no absorbente, para eliminar el exceso de líquido, y se procedió a pesarlos, conociendo así el peso hinchado (W_s). Hecho esto, los hidrogeles se depositaron en tubos eppendorf, los cuales se cubrieron con papel filtro que se aseguró usando bandas elásticas, y se ubicaron en el liofilizador por 48 horas, tiempo tras el cual se volvieron a pesar, con el fin de registrar el peso seco (W_d). A partir de estos datos y haciendo uso de las ecuaciones 7, 8 y 9; se calculó la relación de hinchamiento (R_H), la capacidad de retención de agua (C_{H_2O}) y el contenido de proteínas (C_P).

$$R_H = \frac{W_S}{W_d} * 100 \quad (7)$$

$$C_{H_2O} = \left(\frac{W_S - W_d}{W_S} \right) * 100 \quad (8)$$

$$C_P = \left(\frac{W_d}{W_S} \right) * 100 \quad (9)$$

Prueba de degradación de los hidrogeles

Una de las principales características de los hidrogeles es que su tasa de degradación es ajustable, lo que los constituye como un apropiado vehículo para el transporte de moléculas bioactivas. Es por ello que se propone el realizar una prueba de degradación a través de la cual será monitorizado el cambio en el peso de los hidrogeles en el tiempo. Para esto se fabricaron y pesaron los diferentes hidrogeles, siendo este el tiempo 0. Posteriormente, los hidrogeles se depositaron en PBS 1X y se dejaron reposar a temperatura ambiente, pesándolos cada 24 horas. Además, haciendo uso de la ecuación 10 se conocerá la tasa de cambio de la masa de los hidrogeles.

$$\Delta m_{(t)} = \frac{m_0 - m_{(t)}}{m_0} \quad (10)$$

Ensayo de citotoxicidad

Teniendo en cuenta que se busca fabricar hidrogeles con potencial uso para el tratamiento de UCPD, se debe verificar que estos sean biocompatibles a nivel *in vitro*. Para ello, se determinó la capacidad de proliferación celular que ofrecían las moléculas liberadas por los hidrogeles.

Prueba de proliferación celular con lixiviados de hidrogeles

Para llevar a cabo la prueba, se fabricaron los diferentes grupos de hidrogeles de acuerdo con la metodología ya mencionada, los cuales se sumergieron en 200 μ L de PBS 1X y se llevaron a incubación bajo condiciones estándar por 168 horas. Finalizado este periodo, se recolectó y

mezcló el sobrenadante de cada grupo de hidrogeles y se alicuotaron (400 μL cada alícuota), para luego congelarlos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

De igual forma, en tres placas de 96 pozos se sembraron fibroblastos humanos, provenientes de la línea celular HT1080, de acuerdo con la distribución de la Figura 6. Estos se sembraron en cada pozo a una densidad de 21875 células/ cm^2 en 200 μL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico y glutamina; y se llevaron a incubación. Tras 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por el tratamiento de los lixiviados de la siguiente manera: en los pozos marcados con las letras X, ϵ y δ se depositaron 100 μL de la mezcla de lixiviados proveniente de los $\text{H}_{\text{C}+\text{PPP}}$ y 100 μL de medio suplementado, en los pozos señalados con las letras Φ , σ , λ y Ω se agregaron 100 μL de los lixiviados provenientes de los H_{C} y H_{PPP} , junto con 100 μL de medio suplementado. Por último, en los pozos señalados con la letra α se depositaron 200 μL de medio suplementado.

Una vez que se aplicó el respectivo tratamiento a los pozos, las placas se incubaron por tres diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas. Finalizado cada uno de los periodos de incubación, se retiró el tratamiento y se agregó 200 μL de solución de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeiltetrazoliobromida (MTT) en cada uno de los pozos, la cual se preparó combinando la solución de MTT junto con medio suplementado en una proporción 1:100. A continuación, la placa se llevó a incubación por 4 h para permitir la formación de cristales de formazán de color morado, formados por las células metabólicamente activas. Tras las 4 h, se retiró la solución y se agregó 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) en cada pozo, además de depositarlo en tres pozos más a los cuales no se había aplicado algún tratamiento, y la placa se llevó a agitación constante a 100 rpm por 10 minutos, buscando diluir los cristales. Finalizado el tiempo de agitación, la placa se llevó al lector,

donde se determinó la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 570 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad celular haciendo uso de la ecuación 11.

Figura 6

Distribución de pozos para las células y tratamientos en la prueba de lixiviados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X			δ	δ	δ				
B	Φ	Φ	Φ			λ	λ	λ				
C												
D	ε	ε	ε			Ω	Ω	Ω				
E	σ	σ	σ									
F						α	α	α				
G												
H												

Nota: los pozos marcados con las diferentes letras corresponden a aquellos en los cuales se sembraron las células, (7000 células/pozo). La distribución de los lixiviados para tratamiento de cada pozo se hizo de la siguiente manera: por un lado, los pozos A1 a A3, D1 a D3 y A6 a A8 corresponden a los hidrogeles de colágeno al 1.5, 3 y 5% + PPP, respectivamente. Por otro lado, en los pozos B1 a B3, E1 a E3 y B6 a B8 se aplicó el tratamiento de los hidrogeles con colágeno al 1.5, 3 y 5%, mientras que D6 a D8 correspondió a los hidrogeles hechos de PPP puro. Finalmente, el control de medio corresponde a los pozos F6 a F8.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left(\frac{A_P * 1}{A_C} \right) * 100 \quad (11)$$

donde A_P representa la absorbancia de cada uno de los pozos con tratamiento y A_C es la absorbancia del pozo control de medio. A estos valores de absorbancia, previamente les ha sido restado el valor promedio del blanco, es decir, la absorbancia del DMSO.

Análisis estadísticos

Para analizar los resultados obtenidos de cada una de las pruebas se utilizó el software de análisis estadístico GraphPad Prism. En este se graficaron los resultados de acuerdo con su media aritmética \pm desviación estándar, realizando comparaciones entre los diferentes grupos de estudio utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, según correspondiera. Para llevar a cabo las pruebas paramétricas se tuvo en cuenta si los datos eran normales o no, lo que permitió un mayor nivel de confianza en los resultados. Finalmente, para todo análisis estadístico se consideraron significativos aquellos valores de $p < 0.05$ y, buscando garantizar la reproducibilidad de los resultados, la cantidad de réplicas por experimento correspondió a un $n \geq 3$.

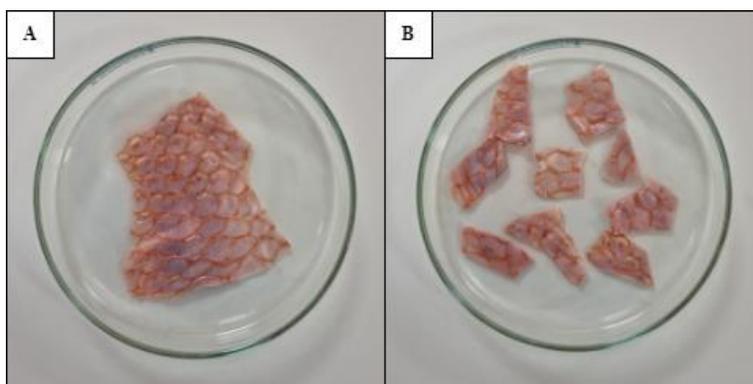
Capítulo 5. Resultados y análisis

Extracción de colágeno a partir de piel de tilapia roja

El protocolo tenido en cuenta para la extracción de colágeno a partir de la piel de tilapia roja (PTR), estandarizado por Ramírez et al., (2022), quienes mostraron que el producto final es colágeno tipo I. El proceso se inició con muestras de piel de aproximadamente 2300 mg, las cuales se recortaron en trozos de aproximadamente 2 cm² de área, tal y como se aprecia en la Figura 7. Asimismo, las muestras de piel utilizadas cumplieron con las características organolépticas adecuadas, entre ellas, ser de apariencia brillante, no estar decolorada, ser firme y elástica y presentar un olor fresco.

Figura 7

Muestras de piel utilizadas para la extracción de colágeno.



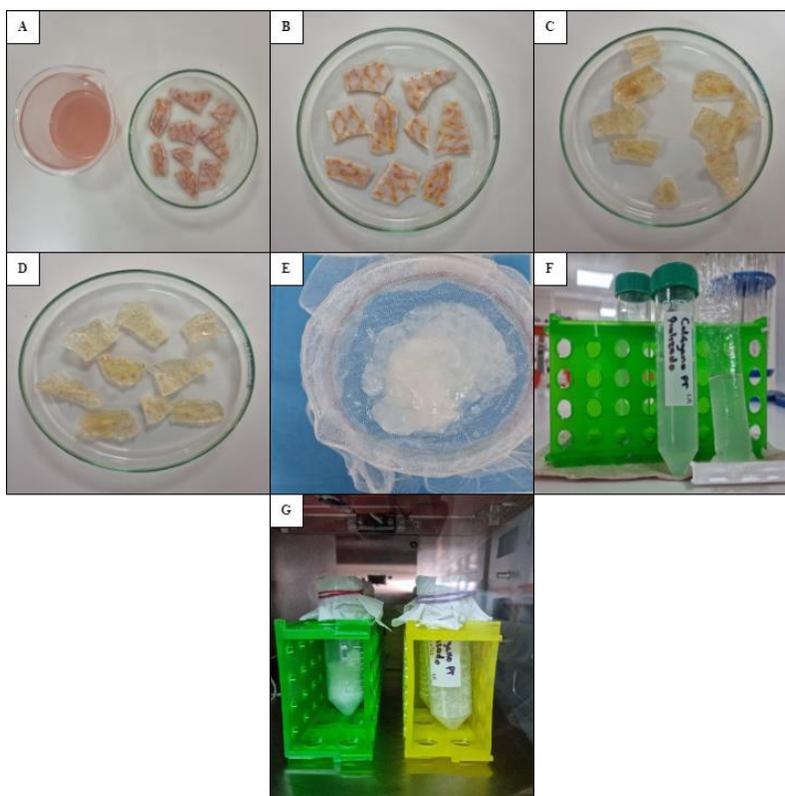
Nota: (A) Muestra de PTR utilizada para el proceso de extracción de colágeno. (B) PTR cortada para el proceso de extracción de colágeno.

En primer lugar, las muestras de PTR se sometieron al blanqueamiento, donde se tornaron blanquecinas, perdiendo la intensidad de su pigmento rojizo, cuando se mezclaron con el NaClO, volviendo turbia y rojiza la solución (ver Figura 8A). Tras los dos lavados llevados a cabo luego

del blanqueamiento, no se observaron cambios significativos en la piel, mientras que el agua destilada se vio turbia únicamente tras el primer lavado.

Figura 8

Resultados de los diferentes procesos del protocolo.



Nota: (A) Blanqueamiento de la piel, (B) Desengrasado de la piel, (C) Primera etapa de la hidrólisis básica, (D) Segunda etapa de la hidrólisis básica, (E) Precipitado del salting out, (F) Colágeno dializado en la membrana de diálisis y en tubo para almacenar y (G) Colágeno liofilizado.

En el proceso de desengrasado, donde se hizo uso de n – butanol al 10%, se eliminó la grasa del producto final. Tras esto, la piel había perdido gran parte de su pigmentación rojiza (ver Figura 8B) y la solución utilizada se tornó turbia y blanquecina. Finalizado este proceso, nuevamente las pieles se lavaron dos veces consecutivas con agua destilada, tras los cuales no

hubo cambios físicos visuales significativos en las muestras ni en el agua utilizada. En tercer lugar, las muestras de PTR se sometieron al proceso de hidrólisis básica en dos etapas, mediante las cuales se buscaba eliminar toda molécula diferente a colágeno, obteniendo un producto más puro. Tras la primera fase, la solución se tornó amarillenta y los trozos de piel comenzaron a volverse transparentes (ver Figura 8C), características que se intensificaron aún más tras la segunda fase de este proceso (ver Figura 8D). Una vez se terminó este paso, se realizaron en promedio nueve lavados para reducir el pH de las muestras de piel. La siguiente etapa, la extracción ácida, deshizo totalmente las muestras de piel, formando una sustancia viscosa. En la superficie de la solución de ácido acético utilizada, se observó un precipitado amarillento, el cual podría corresponder a los últimos pigmentos presentes en la piel. Posteriormente, esta sustancia viscosa se mezcló y agitó con NaCl al 12%, obteniendo un precipitado (ver Figura 8E) que luego se centrifugó para eliminar la presencia del cloruro de sodio utilizado anteriormente. El precipitado recolectado tras la centrifugación se diluyó en ácido acético y se depositó en membranas de diálisis SnakeSkin, para ser expuestos primero a ácido acético a una menor concentración y después en agua destilada, buscando llevar el pH de la disolución a neutro, lo que tardó un tiempo promedio de 6 días. Seguidamente, el colágeno contenido en las membranas de diálisis se almacenó en tubos Falcon de 50 mL (ver Figura 8F), inicialmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego ser transferido a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, las muestras se liofilizaron por 72 horas, obteniendo un producto final de apariencia similar a una esponja de color blanca (ver Figura 8G), inolora y presentó alta estática, tal como lo reportaron Ramírez et al., (2022).

Al mismo tiempo que se llevó a cabo la liofilización del colágeno dializado, se liofilizó una muestra de PTR (ver Figura 9) de la misma masa que las utilizadas para la obtención del colágeno. Esto se hizo con el fin de conocer el valor del peso seco, el cual permitió calcular el rendimiento

en base seca del proceso de extracción. El proceso de extracción de colágeno se llevó a cabo en tres ocasiones, obteniendo de cada uno diferentes valores de peso húmedo y peso seco, los cuales se reportan en la Tabla 5.

Figura 9

Muestra de PTR liofilizada.

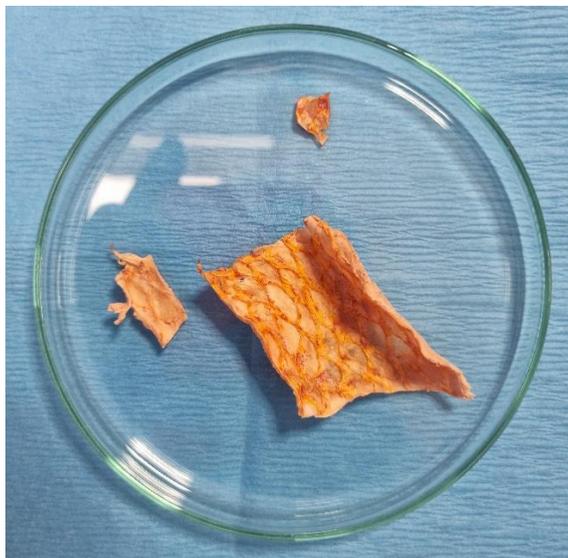


Tabla 5

Pesos húmedos y secos de las PTR utilizadas en cada proceso de extracción.

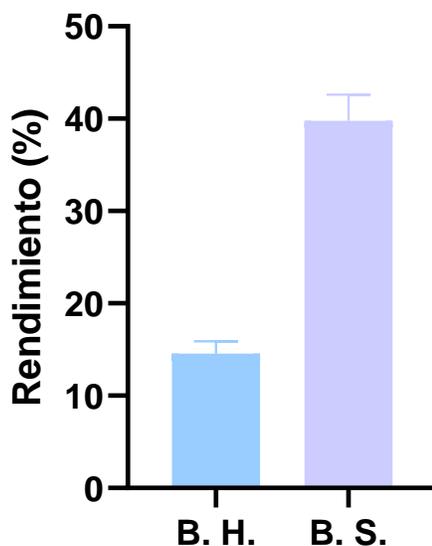
REPETICIÓN	PESO HÚMEDO (mg)	PESO SECO (mg)
1	2301.0	839
2	2387.8	853.5
3	2358.6	883.1

Con los pesos registrados en la tabla anterior, así como el peso del producto final de colágeno obtenido tras cada repetición del proceso de extracción, se calcularon tanto el rendimiento en base seca como en base húmeda, haciendo uso de las ecuaciones 1 y 2, respectivamente. De esta manera, se obtuvo un rendimiento en base seca promedio del $39.759 \pm$

2.836, mientras que el promedio del rendimiento en base húmeda se calculó como 14.546 ± 1.358 (Figura 10).

Figura 10

Rendimiento de la extracción de colágeno ácido soluble.



Nota: B. S. hace referencia al rendimiento de la extracción en base seca, mientras que B. H. representa el rendimiento de la extracción en base húmeda.

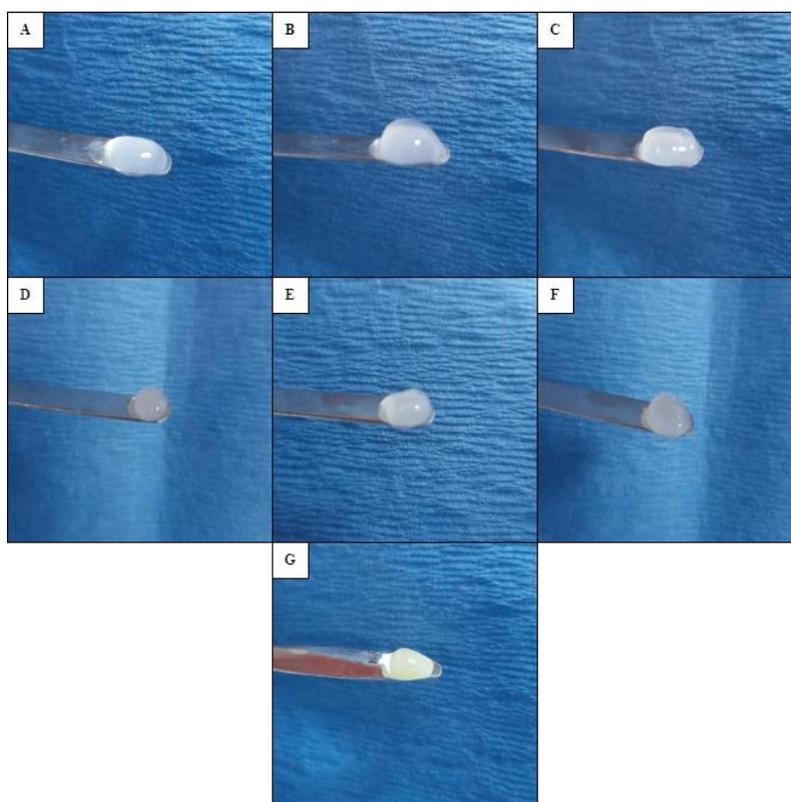
Elaboración de hidrogeles de colágeno puro, PPP puro y colágeno + PPP

El proceso de elaboración de las diferentes formulaciones de hidrogeles inició con la preparación de una solución stock de colágeno a una concentración de 8 mg/mL, a partir de la cual se obtuvieron las mezclas a las diferentes concentraciones de colágeno. Los H_C+PPP se elaboraron a partir de la fabricación de los H_C, que se sumergieron en el PPP y posteriormente se sumergieron en CaCl₂ a una concentración de 40 mM. Una vez se obtuvieron los hidrogeles y se permitió su hinchamiento en PBS 1X, se observó que mantenían su forma y lucían firmes, características que se mostraron más notorias a una mayor concentración de colágeno presente en los hidrogeles

(Figura 11D, 11E y 11F). De igual forma, se elaboraron hidrogeles de colágeno puro (Figura 11A, 11B y 11C) para usarlos como controles. De estos, se evidenció que físicamente los hidrogeles con una concentración de colágeno del 1.5% eran los más débiles, mientras que los que tenían colágeno al 5% se presentaron mucho más resistentes. Otra característica que se vio relacionada con la concentración de colágeno correspondió a la translucidez de los hidrogeles, ya que los hidrogeles de colágeno al 1.5% eran transparentes, mientras que aquellos con colágeno al 5% se vieron mucho más blanquecinos. Finalmente, los H_{PPP} (Figura 11G) presentaron una textura firme y con una coloración amarillenta.

Figura 11

Hidrogeles fabricados de colágeno puro, colágeno + PPP y PPP puro.



Nota: las imágenes A, B y C corresponden a los hidrogeles fabricados con colágeno puro, a las concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/mL, respectivamente. Las imágenes D, E y F presentan los

hidrogeles de colágeno a las diferentes concentraciones y que se reticularon con PPP. La imagen G presenta un hidrogel elaborado con PPP puro.

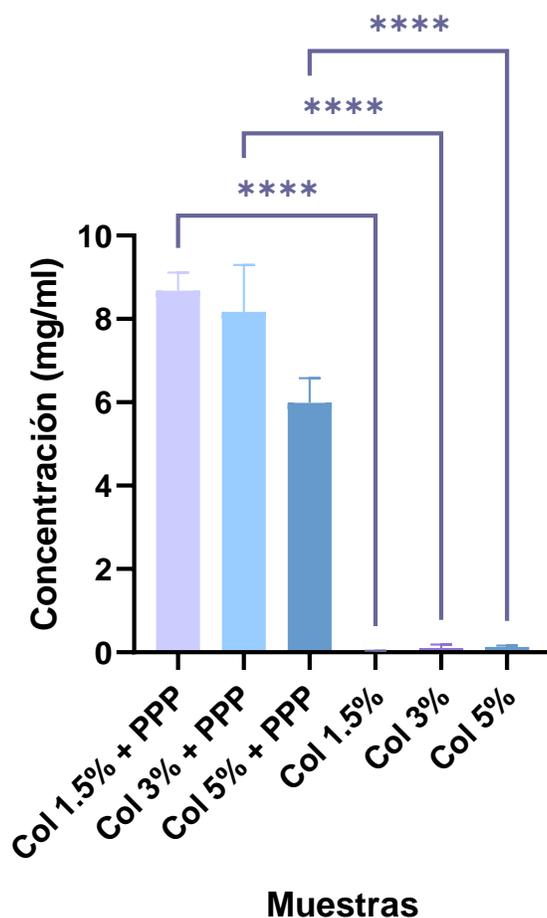
Concentración de proteínas inmovilizadas y liberadas por los hidrogeles

Teniendo en cuenta que se busca mejorar el proceso de cicatrización a partir de las proteínas inmovilizadas en los hidrogeles, es importante conocer la concentración de estas que han sido retenidas y posteriormente liberadas por los geles. Para esto se hizo uso del espectrofotómetro, midiendo la absorbancia de la solución de proteínas a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que la relación entre la absorbancia y la concentración de proteína se encontraba en la parte lineal. Entonces, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de las proteínas en tres momentos: dos de estos tras su fabricación y al final del proceso de liberación de siete días (Figuras 12 y 13 respectivamente). Al cuantificar la concentración de proteínas en los hidrogeles elaborados con colágeno puro y aquellos de colágeno reticulado con el PPP, se pudo apreciar un valor mucho mayor para aquellos hidrogeles que se reticularon con el PPP ($p < 0.0001$), donde para los hidrogeles de colágeno puro el valor pudo ser apenas detectado. Lo anterior porque al reticular el PPP en los hidrogeles de colágeno, se acentuó la concentración de proteínas asociadas al componente sanguíneo, con respecto a los hidrogeles elaborados solo con colágeno. Además, se evidenció que, a una menor concentración de colágeno en los hidrogeles, mayor es la concentración de proteínas inmovilizada en estos. Al finalizar el periodo de incubación, la tendencia de una mayor concentración de proteínas por parte de los hidrogeles reticulados con el PPP se mantuvo, aunque se presentó un aumento en la lectura de concentración de proteínas por parte de los geles hechos con colágeno. La concentración de proteínas remanente en los hidrogeles presentó valores menores a la retenida post fabricación, ya que estas proteínas se liberaron de forma gradual. Se observó que aquellos hidrogeles elaborados con colágeno al 3% y PPP

retuvieron la mayor concentración de proteínas, con apenas una disminución de 1.2 veces, mientras que los hidrogeles con una concentración de colágeno al 1.5% reticulados con PPP tuvieron el menor remanente de proteínas, con una disminución de casi 1.7 veces.

Figura 12

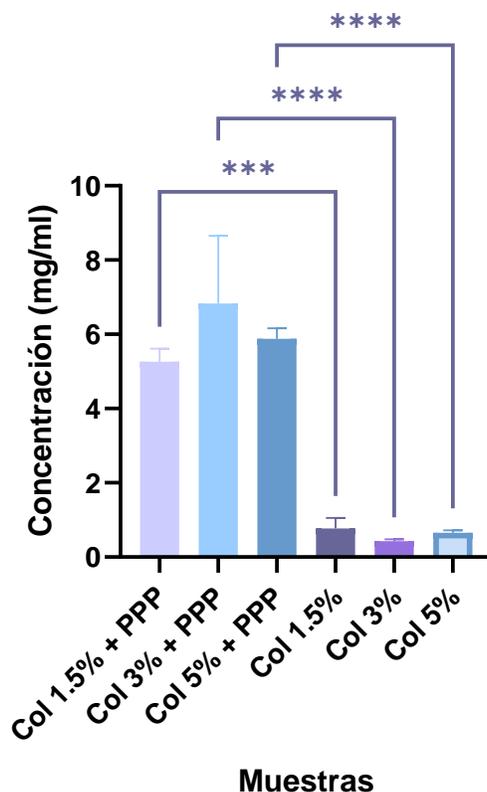
Concentración de proteínas retenidos en los hidrogeles post fabricación.



*Nota: en la figura se presenta la concentración de proteínas retenidas por los hidrogeles tras haber sido fabricados. Los datos se obtuvieron con $n = 6$ para cada concentración. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias estadísticas entre los grupos, representados como **** para $p \leq 0.0001$.*

Figura 13

Concentración de proteínas en los hidrogeles tras 7 días de incubación.

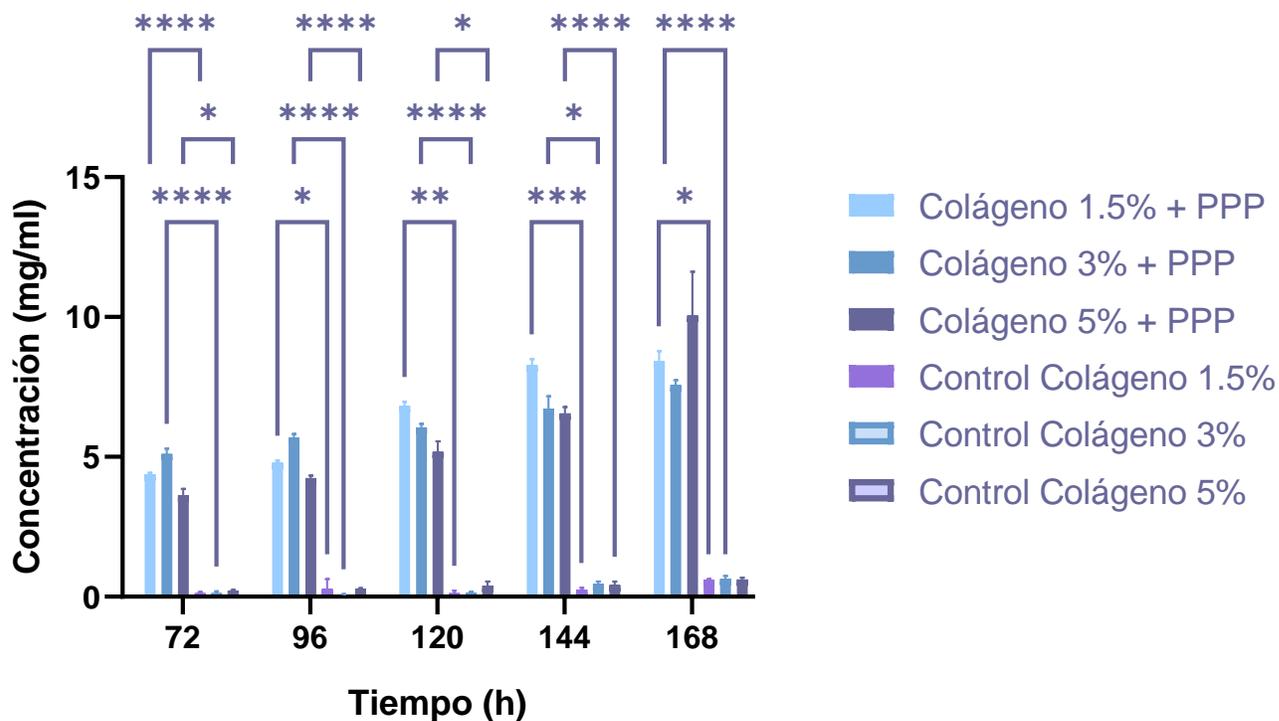


*Nota: en la figura se presenta la concentración de proteínas retenidas en los hidrogeles tras haber sido incubados por 7 días bajo condiciones estándar. Los datos se calcularon a partir de seis muestras independientes para cada concentración. Los datos se calcularon con un $n = 6$ para cada concentración. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias estadísticas entre los grupos, representados como **** para $p \leq 0.0001$ y *** para valores de $p \leq 0.001$.*

Por otra parte, durante los 7 días de incubación, se cuantificaron las proteínas totales por medio de espectrofotometría a las 72, 96, 120, 144 y 168 horas. La concentración de proteínas liberadas por las muestras de colágeno reticulado con PPP se comparó con las de las muestras de colágeno puro, y los resultados se reportan en la Figura 14.

Figura 14

Liberación de proteínas en el tiempo por los hidrogeles.



Nota: en la figura se presenta la concentración de proteínas liberadas por los hidrogeles, cuantificadas en cinco tiempos diferentes. Los datos se calcularon con un n de 6 muestras para cada concentración. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias estadísticas entre los grupos, representados como: **** para $p \leq 0.0001$, *** para $p \leq 0.001$ y * para $p \leq 0.05$.

Respecto a los hidrogeles de colágeno al 1.5% y PPP, la concentración de proteínas liberadas aumentó de manera gradual en el periodo de incubación, donde entre la primera y última lectura, la concentración aumentó en una proporción de 1.92 veces. Esta formulación tuvo la mayor concentración de proteínas liberadas hasta las 144 horas de incubación. Ahora bien, tras las primeras 96 horas de incubación, los hidrogeles de colágeno al 3% y PPP que presentaron una

mayor concentración de proteínas. Después de este tiempo, el aumento en el valor de la concentración de proteínas por parte de estos hidrogeles se minimizó de forma considerable y, al finalizar la incubación, la concentración de proteínas había aumentado apenas 1.48 veces con respecto a la primera medición realizada. En cuanto a los hidrogeles de colágeno al 5% y PPP, estos presentaron la menor concentración de proteínas liberadas en la mayoría de las mediciones, excepto en la última, donde el valor aumentó drásticamente. Para esta muestra, el aumento de la última medición con respecto a la primera realizada tuvo una proporción de casi 2.8 veces. Finalmente, los hidrogeles elaborados con colágeno presentaron una concentración de proteínas en el tiempo mucho menor que las muestras reticuladas con el PPP, pero estos valores se incrementaron con el paso del tiempo de incubación, donde el mayor valor tras las 168 correspondió a la muestra de colágeno al 3%. Para una mejor visualización de los datos de concentración de proteínas en los hidrogeles de colágeno, ver la gráfica en el Anexo 1. Los valores promedio de proteínas liberadas durante el periodo de incubación de todas las muestras se observan en el Anexo 2.

Caracterización mecánica de los hidrogeles

Los hidrogeles se evaluaron mecánicamente mediante las pruebas de compresión y de tensión. Adicional a esto, se llevó a cabo una prueba de hinchamiento a través de la cual se determinó la capacidad de hinchamiento, la capacidad de retención de agua y la cantidad de proteínas contenidas en los diferentes hidrogeles bajo estudio.

Evaluación del módulo de compresión

Para llevar a cabo la prueba se elaboraron hidrogeles del grupo experimental (H_{C+PPP}) y los del grupo control (H_C y H_{PPP}). A cada muestra se le tomaron sus medidas de espesor y diámetro,

necesarias para la configuración del equipo y el análisis de los datos. Estas medidas se reportan en la Tabla 6.

Tabla 6

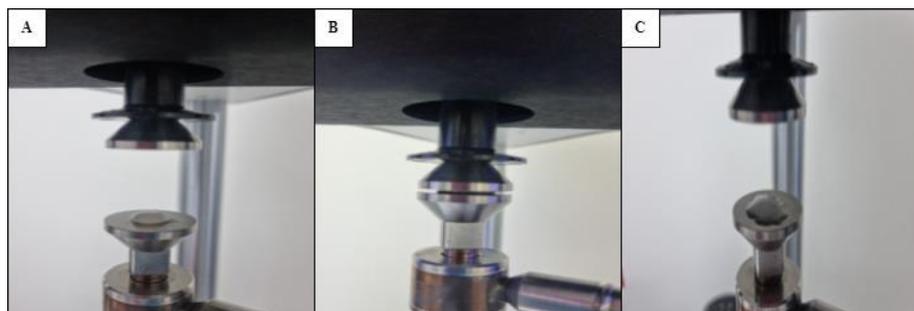
Dimensiones de los hidrogeles luego del hinchamiento para la PMC.

Muestra	Colágeno 1.5% + PPP	Colágeno 3% + PPP	Colágeno 5% + PPP	Colágeno 1.5%	Colágeno 3%	Colágeno 5%	PPP
Diámetro (mm)	9.242 ± 0.357	9.582 ± 0.279	9.842 ± 0.230	9.165 ± 0.355	9.649 ± 0.301	9.760 ± 0.264	5.883 ± 0.094
Espesor (mm)	3.221 ± 0.319	3.257 ± 0.336	3.490 ± 0.457	2.727 ± 0.296	3.348 ± 0.155	3.555 ± 0.227	2.184 ± 0.041

Conociendo las dimensiones de los diferentes hidrogeles se dio inicio a la PMC. Las muestras se ubicaron en el plato de compresión inferior y el plato superior descendió sobre el hidrogel, aplicando la fuerza hasta alcanzar un espesor igual a la mitad de la inicial, parámetro previamente configurado. Una vez que se alcanzó dicha altura, el equipo se detuvo y el plato superior volvió a su posición inicial. Lo anteriormente descrito observa en la Figura 15.

Figura 15

Proceso de la PMC.

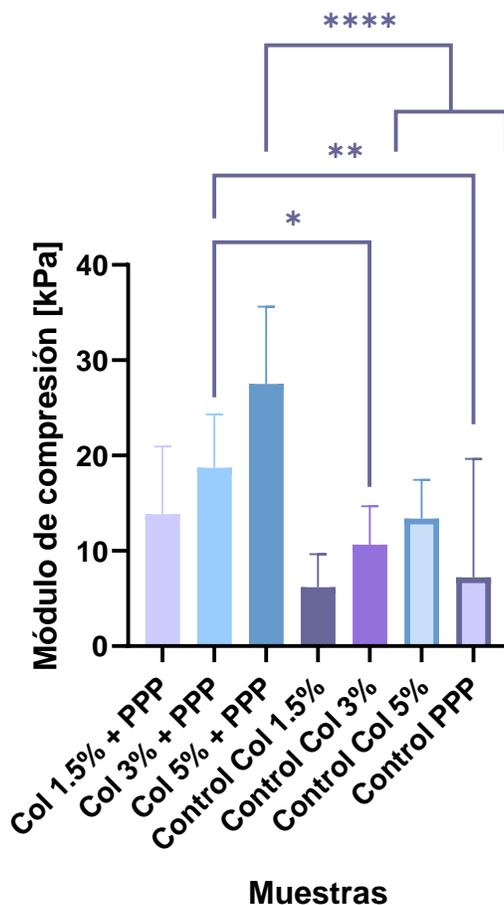


Nota: la imagen representa el proceso de la prueba mecánica de compresión. (A) antes de la prueba, (B) durante la prueba y (C) después de la prueba.

Con los datos proporcionados por el equipo, y con las dimensiones previamente registradas, se calculó tanto el esfuerzo como la deformación, variables que se graficaron para cada una de las muestras, obteniendo gráficas similares a la de la Figura 5. De esta curva se identificó la sección lineal, comprendida entre 0.2 y 0.3 para los valores de deformación, y a la recta resultante se le calculó la pendiente, que representa el valor del módulo de compresión. Los hidrogeles de colágeno al 1.5% tuvieron un módulo de compresión de 6.171 ± 3.481 kPa, mientras que los geles con la misma concentración de colágeno que se habían reticulado con el PPP presentaron un módulo de compresión de 13.85 ± 7.092 kPa, lo que se traduce en un aumento de 2.2 veces al permitir la reticulación del PPP en la red de colágeno. Respecto a las muestras de colágeno al 3% y PPP, el módulo de compresión de estas tuvo un valor de 18.72 ± 5.595 kPa, mientras que su respectivo control presentó un valor de K de 66 ± 4.008 kPa, es decir, el valor se redujo en 1.75 veces bajo la no presencia del PPP. Finalmente, los hidrogeles de colágeno al 5% y PPP presentaron un valor de módulo de compresión de 27.52 ± 8.097 kPa y los hidrogeles de colágeno a la misma concentración dieron como resultado un módulo de compresión de apenas 13.38 ± 4.066 kPa, por lo que los primeros presentaron un valor de K 1.98 veces mayor que su control. Las principales diferencias del módulo de compresión se dan principalmente por la concentración de colágeno con que se elaboraron los hidrogeles, y esta característica se puede aumentar de forma considerable al permitir la reticulación del PPP en la red de colágeno. Estos datos se reportan en la Figura 16.

Figura 16

Módulos de compresión de los hidrogeles.



*Nota: los datos se obtuvieron al realizar dos repeticiones de la PMC. En total se utilizaron 13 muestras independientes para las formulaciones de colágeno al 1.5 y 3% + PPP, así como para el control de colágeno al 3%. Para los hidrogeles de colágeno al 5% + PPP y los controles de colágeno al 1.5 y 5% se utilizaron 12 muestras independientes. Finalmente, para los controles de PPP hubo un total de seis muestras. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias significativas representadas así: **** para $p \leq 0.0001$, ** para $p \leq 0.01$ y * para $p \leq 0.05$.*

Finalizada la prueba, los hidrogeles se volvieron blandos y delgados, lo que dificultó su manipulación. Lo anterior se hizo más notorio en los hidrogeles de colágeno, principalmente en aquellos que se elaboraron con una menor concentración del polímero. Otra característica que se destacó tras realizar la prueba correspondió al color de los hidrogeles, puesto que aquellos del grupo experimental se vieron blanquecinos, mientras que los del grupo control se apreciaron más transparentes (ver Figura 17). Al final del ensayo, se volvieron a tomar las medidas de las muestras, obteniendo los datos presentados en la Tabla 7. En términos generales, los hidrogeles redujeron sus dimensiones. Sin embargo, esta reducción se hizo menos notoria en aquellos hidrogeles elaborados con una mayor concentración de colágeno, y la proporción en que se redujeron las dimensiones también disminuyó en aquellos geles que habían sido reticulados con el PPP.

Tabla 7

Dimensiones de los hidrogeles tras la prueba de compresión.

Muestra	Colágeno 1.5% + PPP	Colágeno 3% + PPP	Colágeno 5% + PPP	Colágeno 1.5%	Colágeno 3%	Colágeno 5%	PPP
Diámetro (mm)	6.955 ± 1.324	8.586 ± 0.427	8.784 ± 0.430	7.434 ± 0.385	8.224 ± 0.333	9.008 ± 0.223	4.640 ± 0.191
Espesor (mm)	1.841 ± 0.103	2.597 ± 0.185	2.625 ± 0.227	1.419 ± 0.179	2.275 ± 0.150	2.701 ± 0.234	1.077 ± 0.047

Finalizado el ensayo, los hidrogeles se sumergieron en 800 µl de PBS 1X por un periodo de 72 h a una temperatura de 4 °C. Lo anterior con el objetivo de determinar si las muestras tenían la capacidad de volver a hincharse tras haber sido comprimidos. Tras el periodo de incubación se volvieron a registrar las medidas, tanto el diámetro como espesor, de los hidrogeles (ver Tabla 8).

Tabla 8

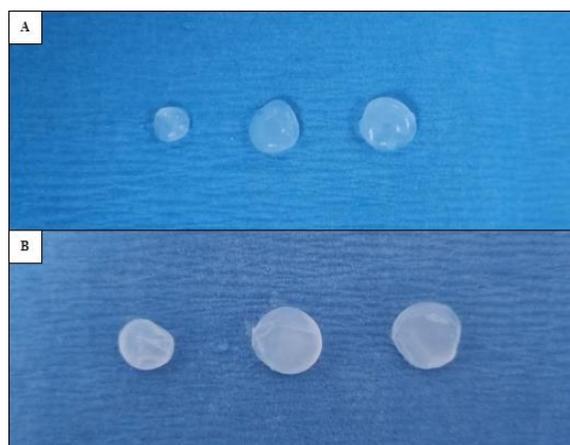
Dimensiones de los hidrogeles tras el rehinchamiento.

Muestra	Colágeno 1.5% + PPP	Colágeno 3% + PPP	Colágeno 5% + PPP	Colágeno 1.5%	Colágeno 3%	Colágeno 5%	PPP
Diámetro (mm)	6.180 ± 0.599	7.887 ± 0.596	8.345 ± 0.324	6.037 ± 0.447	8.173 ± 0.516	8.978 ± 0.419	5.199 ± 0.134
Espesor (mm)	1.396 ± 0.156	2.169 ± 0.739	2.612 ± 0.402	1.228 ± 0.124	2.014 ± 0.504	2.613 ± 0.431	1.066 ± 0.123

Tanto para los H_C como para los H_{C+PPP}, se observó un comportamiento similar. Específicamente, aquellos hidrogeles que contenían colágeno al 1.5 y 3% no se volvieron a hinchar y, por el contrario, se vieron reducidas sus dimensiones. Sin embargo, aquellos hidrogeles con una concentración de colágeno al 5%, con o sin PPP, aunque también vieron reducido su diámetro y su espesor, esta reducción no se marcó tanto como con las demás muestras. Finalmente, los hidrogeles elaborados con PPP aumentaron su diámetro, pero sin alcanzar la dimensión presentada tras su fabricación e hinchamiento, pero su espesor continuó disminuyendo.

Figura 17

Estado de los hidrogeles al finalizar la PMC.



Nota: (A) hidrogeles de colágeno del grupo control. (B) hidrogeles del grupo experimental. De izquierda a derecha: 1.5, 3 y 5% de colágeno en ambos casos.

Evaluación del módulo de Young

Para llevar a cabo la prueba mecánica de tensión se elaboraron cuatro (4) muestras independientes de cada formulación de hidrogeles. Luego de permitir el hinchamiento de estos, se hizo un corte concéntrico de 6 mm de diámetro a cada uno de ellos, con el fin de obtener anillos. Esto se hizo inicialmente con las muestras de colágeno al 5% + PPP, ya que eran las muestras más consistentes. De estos hidrogeles, uno se rompió al momento de realizar el corte. Otra de las muestras se rompió al momento de ubicarlo en los soportes personalizados. Únicamente dos de las muestras de esta formulación lograron posicionarse de forma satisfactoria en los soportes, tal y como se observa en la Figura 18. Sin embargo, la consistencia de los hidrogeles tras haber realizado el corte era bastante débil, razón por la cual el ensayo no pudo ser llevado a cabo de forma satisfactoria, dado que la fuerza realizada en los geles se encontró por fuera del límite de detección del equipo. Esto provocó que los datos obtenidos se presentaran como ruido en su totalidad, tal y como se reporta en el Anexo 3.

Figura 18

Montaje de la PMT.



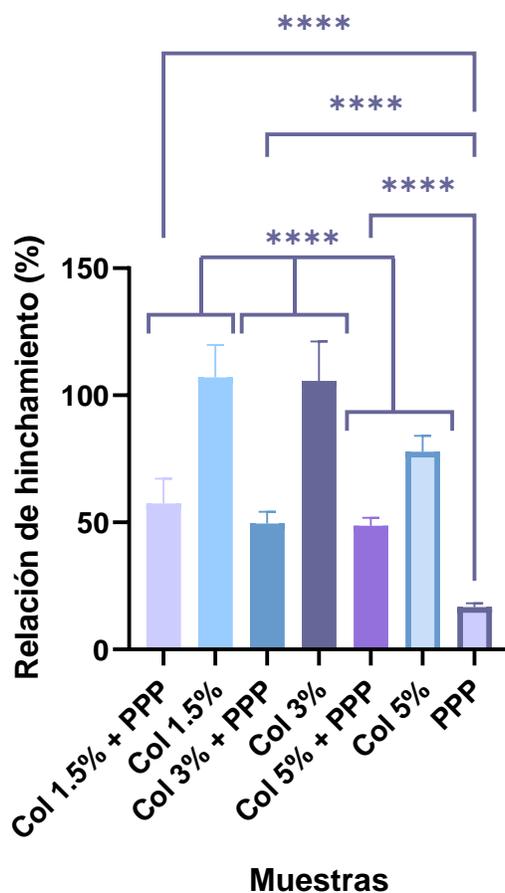
Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles

Con el objetivo de determinar la relación de hinchamiento (R_H), la capacidad de retención de agua (C_{H_2O}) y el contenido de proteínas (C_P) para las muestras elaboradas, se llevó a cabo la prueba de hinchamiento, donde se utilizó un total de 10 muestras independientes ($n = 10$) para cada formulación. Una vez los hidrogeles se hincharon, estos se pesaron para obtener el valor del peso hinchado (W_s), y se liofilizaron por 72 horas con el fin de tener el valor de peso seco para las diferentes muestras (W_d). Con estos datos, se calcularon los valores promedio del peso húmedo y de peso seco, los cuales se reportan en el Anexo 4.

Conociendo estos valores de peso para cada una de las muestras, y haciendo uso de la ecuación 7, se calculó la relación de hinchamiento, valores que se presentan en la Figura 19. Para los hidrogeles de colágeno al 1.5% se obtuvo una relación de hinchamiento del 107.1%, mientras que a la misma de concentración de colágeno reticulada con PPP esta se redujo en aproximadamente 1.86 veces, obteniendo una relación de hinchamiento del 57.38%. Ahora bien, respecto a los hidrogeles de colágeno al 3%, estos presentaron una relación de hinchamiento del 105.6%, valor que se redujo en los hidrogeles de colágeno al 3% y PPP, obteniendo un valor de 49.56%, lo que se traduce en una reducción en 2.13 veces. Las otras muestras, de colágeno al 5%, bajo la presencia del PPP presentaron una relación de hinchamiento del 48.72%, mientras que, al eliminar la fracción del plasma en el hidrogel, se obtuvo una relación de hinchamiento del 77.81%, es decir, aumentó en 1.6 veces aproximadamente. Por lo tanto, se determinó que la capacidad de hinchamiento de aquellos hidrogeles reticulados con el PPP presentó un valor mucho menor comparada con la de aquellos hidrogeles elaborados únicamente con colágeno. Además, los hidrogeles elaborados con el PPP puro presentaron una relación de hinchamiento mucho menor a las demás muestras elaboradas, con un valor de apenas 16.73%.

Figura 19

Relación de hinchamiento de los hidrogeles.



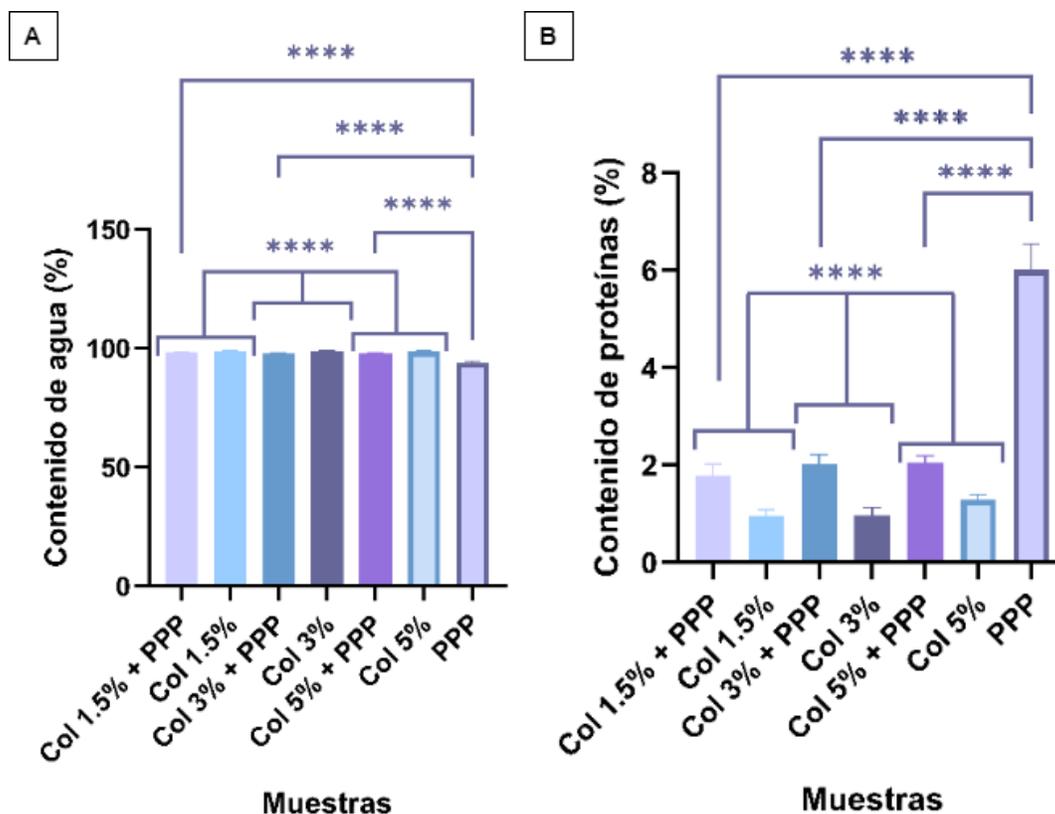
*Nota: los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias significativas representadas por **** para $p \leq 0.0001$.*

Ahora bien, en cuanto a la capacidad de retención de agua o contenido de agua, y el contenido de proteínas de los diferentes hidrogeles, estas características se calcularon haciendo uso de las ecuaciones 8 y 9. Los datos del contenido de agua (Figura 20a), aunque denotan una similitud entre todas las muestras, presentan ciertas diferencias estadísticas al comparar las muestras con y sin PPP a las mismas concentraciones de colágeno, además de comparar con aquella elaborada únicamente con el PPP ($p < 0.0001$). Por lo tanto, aquellos hidrogeles elaborados

únicamente con colágeno tienen un mayor contenido de agua en comparación a aquellos que se reticularon con el PPP, ya sea con colágeno o sin él, es decir que aquellos hidrogeles que constan totalmente del PPP, aunque también tienen un elevado grado de contenido de agua, el porcentaje es menor en comparación a los demás hidrogeles. Respecto al contenido de proteínas, lo que se puede apreciar en la Figura 20b es que esta característica está condicionada principalmente a la presencia del PPP, ya que aquellos hidrogeles elaborados únicamente con este componente presentaron un mayor porcentaje de proteínas en su constitución ($p < 0.0001$), aproximadamente 3 veces más que las muestras con colágeno al 5% + PPP, muestra que ocupa el segundo lugar en esta característica. Es por este mismo condicionamiento que aquellos hidrogeles de colágeno que se reticularon con el plasma obtuvieron valores porcentuales mayores de proteínas con respecto a aquellos elaborados únicamente con el colágeno.

Figura 20

Contenido de agua y de proteínas en los hidrogeles.



*Nota: los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias significativas representadas por **** para $p \leq 0.0001$.*

Degradación de los hidrogeles

A partir de la prueba de degradación se determinó el cambio en la masa de los hidrogeles al dejarlos reposar en PBS 1X a temperatura ambiente por un tiempo determinado. Los hidrogeles, luego de ser fabricados e hinchados se pesaron, obteniendo una masa promedio, en mg, de 112.388 ± 11.213 , 190.526 ± 18.973 y 209.804 ± 8.283 para los hidrogeles de colágeno al 1.5, 3 y 5% + PPP. La masa de los hidrogeles de colágeno puro se reportó como 96.018 ± 11.482 , 159.930 ± 14.058 y 197.683 ± 8.355 mg para las concentraciones de 1.5, 3 y 5% (8 muestras independientes

de cada formulación). En el caso de los hidrogeles de PPP puro, se tuvo una masa promedio de 54.659 ± 11.937 mg. No obstante, no se encontraron diferencias significativas al comparar los hidrogeles a las diferentes concentraciones de colágeno, con o sin PPP en la red reticulada, y se determinó que los hidrogeles son más pesados a una mayor concentración de colágeno con la que se elaboraron. Además, se obtuvo un mayor peso en aquellos hidrogeles que reticularon el PPP en la red de colágeno. Los hidrogeles se depositaron en PBS 1X por 144 h (seis días) y se pesaron cada 24 horas. Los valores de las mediciones de la masa de los hidrogeles se reportan en la Tabla 9.

Tabla 9

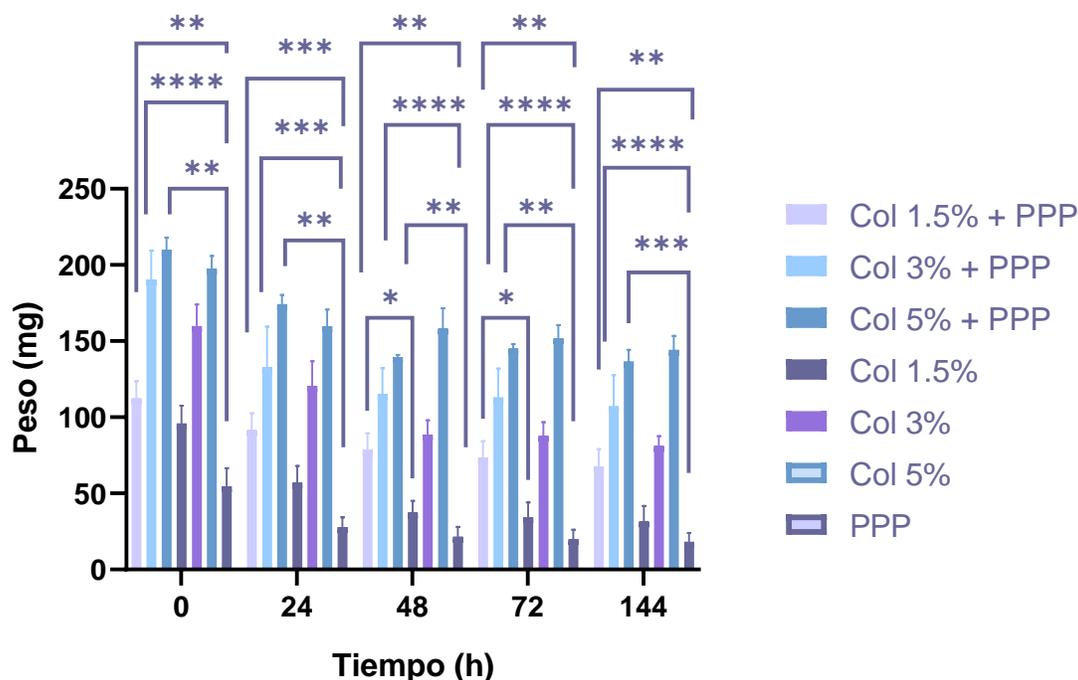
Medición de masa (mg) de los hidrogeles en los seis días.

Tiempo (h)	Muestras						
	Col 1.5% + PPP	Col 1.5%	Col 3% + PPP	Col 3%	Col 5% + PPP	Col 5%	PPP
24	91.602 ± 10.967	56.946 ± 11.156	132.834 ± 26.584	120.488 ± 16.267	174.259 ± 6.072	159.690 ± 11.088	27.845 ± 6.503
48	78.927 ± 10.458	37.419 ± 7.647	115.059 ± 17.231	88.628 ± 9.419	139.413 ± 1.456	158.333 ± 13.173	21.588 ± 6.369
72	73.486 ± 10.807	34.271 ± 9.774	113.125 ± 18.794	87.848 ± 9.022	145.133 ± 2.901	151.868 ± 8.575	19.914 ± 6.132
144	67.537 ± 11.604	31.568 ± 10.121	107.215 ± 20.438	81.053 ± 6.628	136.644 ± 7.669	144.220 ± 9.255	18.240 ± 5.816

Los hidrogeles fabricados con colágeno al 5%, con y sin PPP, presentaron una reducción menos pronunciada en su masa que las demás formulaciones en el transcurso del ensayo. A concentraciones menores de colágeno, se presentó una reducción bastante marcada en cuanto a la masa de los hidrogeles, siendo esto más evidente en aquellos fabricados con colágeno puro.

Figura 21

Cambio del peso de los hidrogeles en el tiempo.



*Nota: en la figura se presenta el cambio en la masa de los hidrogeles pasados 6 días de su elaboración, condición cuantificada en cinco momentos. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias significativas representadas por **** para $p \leq 0.0001$, *** para $p \leq 0.001$, ** para $p \leq 0.01$ y * para $p \leq 0.05$.*

Haciendo uso de la ecuación 10, se determinó que en las primeras 24 horas de degradación de los hidrogeles, se presentó la mayor variación en la masa para aquellas muestras elaboradas únicamente con PPP, con una variación del $48.643 \pm 8.482\%$. Además, al finalizar el periodo de degradación, aquellos hidrogeles que tuvieron una mayor variación en su masa con respecto a su peso inicial correspondieron a los elaborados con una concentración de colágeno al 1.5%, con un promedio de $67.539 \pm 8.430\%$, mientras que los hidrogeles que presentaron una menor variación promedio en su peso correspondieron a los elaborados únicamente con colágeno a una

concentración del 5%, con un valor del $27.032 \pm 3.746\%$. Al finalizar el periodo de incubación, los hidrogeles fabricados con colágeno al 1.5 y 5% + PPP tuvieron una disminución total de su peso inferior al 40%, mientras que para los hidrogeles de colágeno al 3% y PPP esta reducción estuvo cercana al 44%. Ahora bien, aquellos hidrogeles elaborados únicamente con colágeno, tras el periodo de incubación, tuvieron una reducción en su masa del 67, 50 y 27% aproximadamente para las concentraciones de 1.5, 3 y 5%. Los datos de la variación de la masa de los hidrogeles se reportan en el Anexo 5.

Ensayo de proliferación celular utilizando lixiviados de los hidrogeles

Se llevó a cabo una prueba *in vitro* a través de la cual se buscó determinar la capacidad de proliferación celular que permiten los lixiviados producidos por los hidrogeles, lo que se analizó en tres tiempos de cultivos diferentes, a saber 24, 48 y 72 horas. Los porcentajes de viabilidad para las diferentes muestras se calcularon haciendo uso de la ecuación 11, se presentan en la Figura 22 y se compararon con el control de medio de cultivo al 100% a los mismos periodos de tiempo.

Tras 24 horas de incubación, se determinó que los lixiviados provenientes de los hidrogeles de colágeno + PPP indujeron una mayor tasa de proliferación mayor comparados con los lixiviados de aquellos hidrogeles elaborados únicamente con colágeno, tal y como se presenta en la Tabla 10. En este sentido, la mayor diferencia se presentó para los hidrogeles con colágeno al 3%, puesto que aquellos reticulados con PPP presentaron una proliferación celular 1.7 veces mayor, comparado con aquellos únicamente con colágeno. En el caso de los hidrogeles de colágeno al 1.5%, los hidrogeles con PPP presentaron una proliferación 1.07 veces mayor, mientras que en el caso de los hidrogeles con colágeno al 5% y PPP, presentando un incremento de apenas 1.2 veces, en relación con los hidrogeles de colágeno puro al 5%. Sin embargo, en este mismo periodo de

tiempo, los lixiviados de los hidrogeles de PPP puro presentaron la mayor tasa de proliferación celular ($83.729\% \pm 2.876$).

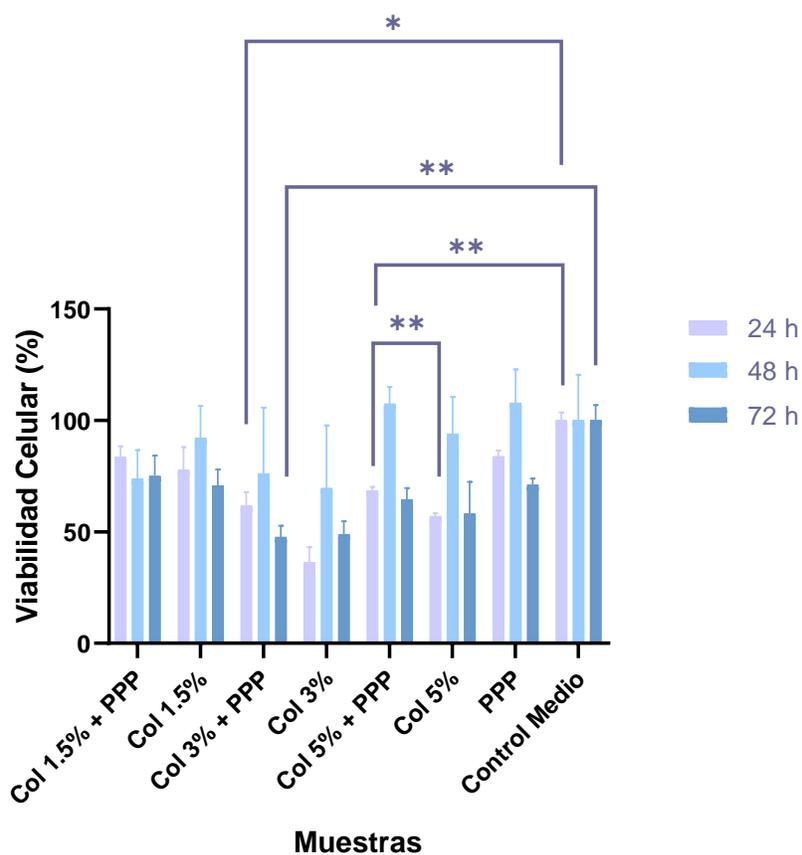
Tabla 10

Viabilidad celular con los tratamientos de lixiviado de hidrogeles.

Muestras	Tiempo (h)		
	24	48	72
Col 1.5% + PPP	$83.644\% \pm 4.731$	$73.709\% \pm 12.915$	$74.915\% \pm 9.282$
Col 1.5%	$77.691\% \pm 10.301$	$92.157\% \pm 14.272$	$70.656\% \pm 7.370$
Col 3% + PPP	$61.737\% \pm 6.107$	$75.962\% \pm 29.703$	$47.567\% \pm 5.237$
Col 3%	$36.314\% \pm 6.830$	$69.522\% \pm 28.296$	$48.818\% \pm 5.914$
Col 5% + PPP	$68.411\% \pm 1.754$	$107.460\% \pm 7.668$	$64.514\% \pm 5.094$
Col 5%	$56.970\% \pm 1.414$	$93.943\% \pm 16.588$	$58.069\% \pm 14.394$
PPP	$83.729\% \pm 2.876$	$107.843\% \pm 14.969$	$70.997\% \pm 2.895$

Figura 22

Porcentaje de viabilidad celular para los lixiviados.



*Nota: en la figura se representa el cambio en el porcentaje de viabilidad celular en tres periodos de incubación. Para el experimento se tuvo en cuenta un $n = 4$. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias significativas representadas por ** para $p \leq 0.01$ y * para $p \leq 0.05$.*

Pasadas 48 horas del cultivo, se apreció un incremento en la viabilidad celular para todas las muestras respecto a las 24 horas de incubación, excepto para aquellos pozos que se sometieron al tratamiento con los lixiviados de los hidrogeles de colágeno al 1.5% + PPP (ver Tabla 10). En este tiempo, los hidrogeles de colágeno al 1.5% presentaron un porcentaje de proliferación 1.25 veces mayor con respecto a los elaborados con la misma concentración de colágeno y que se reticularon con PPP. Los hidrogeles de colágeno al 3% y PPP presentaron un porcentaje de viabilidad celular mayor que aquellos elaborados únicamente con colágeno a la misma concentración, con un incremento de 1.09 veces; mientras que los hidrogeles de colágeno al 5% y PPP presentaron una tasa de viabilidad celular 1.14 veces mayor que los hidrogeles de colágeno a la misma proporción. Finalizado este tiempo de incubación, se mantuvo la tendencia en que los hidrogeles de PPP presentaron la mayor tasa de viabilidad celular ($107.843\% \pm 14.969$).

Finalmente, después de 72 horas de incubación, se presentó una situación contraria a la del periodo de incubación anterior: todas las muestras presentaron una disminución en el porcentaje de viabilidad celular, excepto por aquellas tratadas con colágeno al 1.5% + PPP, donde el porcentaje de viabilidad celular se presentó como el mayor con un $74.915\% \pm 9.282$. Para las concentraciones de 1.5 y 5% de colágeno, aquellas muestras que se reticularon con el PPP presentaron una mayor tasa de proliferación celular que aquellas elaboradas con colágeno puro. Para las muestras con colágeno al 3%, con y sin PPP, el porcentaje de proliferación celular presentó un valor muy parecido, con tasas cercanas al 49%. Tras este último periodo de incubación, los

hidrogeles de PPP presentaron una tasa de proliferación promedio no muy diferente a las de otras formulaciones.

Para los hidrogeles de colágeno al 1.5% + PPP, se evidenció una reducción en el porcentaje de viabilidad celular entre las 24 y 48 horas de incubación. Sin embargo, este valor aumentó levemente al realizar el ensayo a las 72 horas de incubación. En cuanto a los hidrogeles de PPP y colágeno al 3 y 5%, se presentó un porcentaje de viabilidad celular entre el 60 y 70% tras las primeras 24 horas de incubación. Tras 48 horas de incubación, el porcentaje de viabilidad aumentó, siendo este considerable para el colágeno al 5% y PPP, donde se superó la viabilidad ofrecida por el control con medio suplementado ($107.460\% \pm 7.668$). Para estas concentraciones de colágeno, tras 72 horas de incubación, el número de células vivas se redujo considerablemente. Al finalizar el periodo de incubación, el mayor número de células vivas se detectó con el tratamiento de lixiviado proveniente de los hidrogeles con colágeno al 1.5% + PPP, con un porcentaje de viabilidad cercano al 75%.

Análisis de resultados

Los biomateriales representan un campo emocionante y que en su aproximadamente medio siglo de existencia ha tenido un crecimiento fuerte. Estos se han utilizado de forma regular en áreas como la medicina, biología, química y en la ciencia de los materiales. No obstante, se ha buscado profundizar en aplicaciones dirigidas tanto al diagnóstico como a terapias (Ratner et al., 2013). Entre las características que se tienen en cuenta al momento de elegir un biomaterial, se destacan el diseño y la fabricación, la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas adecuadas (Kiran & Ramakrishna, 2021). Sin embargo, estos factores, entre muchos otros, difieren entre los diferentes materiales, razón por la cual es importante realizar una adecuada caracterización de estos. En este orden de ideas, en la presente investigación se determinó las propiedades mecánicas y biológicas

de los hidrogeles elaborados a partir del colágeno obtenido de la piel de tilapia roja, los cuales se reticularon junto con el PPP.

A partir del protocolo utilizado para la extracción de colágeno a partir de la piel de tilapia roja utilizado en el estudio, se obtuvo un rendimiento en base seca aproximadamente del 40%. Por un lado, el valor obtenido se asemeja a los reportados por otros autores como Zeng et al. (2009), quienes en el 2009 extrajeron colágeno ácido soluble a partir de la piel de tilapia y obtuvieron un rendimiento del 39.4%, y Ge et al. (2020), quienes sometieron la piel de tilapia a un proceso ácido soluble, obteniendo un rendimiento en base seca que incluso podría superar el 40%. Por otro lado, el valor obtenido para el rendimiento en base seca supera a lo reportado en otros estudios, como por ejemplo Serrano Gaona (2011) estandarizó un proceso para la extracción y purificación de colágeno ácido soluble a partir de pieles de tilapia, quien obtuvo un rendimiento en base seca del 33.3%, Chen et al. (2016), a través de un proceso de extracción ácido soluble obtuvo 27.2 mg de colágeno por cada 100 mg de piel utilizada y, finalmente, Li et al. (2018), mencionó en su estudio que el rendimiento en base seca de un proceso ácido soluble para la extracción de colágeno a partir de la piel de tilapia se encuentra alrededor del 20%.

Los hidrogeles se elaboraron a partir del colágeno extraído de la piel de tilapia, para luego ser reticulados con el PPP. Es por esto por lo que en ellos se esperaba encontrar una mayor concentración de proteínas asociadas al componente sanguíneo con respecto a los hidrogeles fabricados solamente con colágeno. Una vez que los hidrogeles se fabricaron se evidenció que, a una menor concentración de colágeno en los hidrogeles, mayor es la concentración de proteínas inmovilizada en estos. Lo anterior se debe a que una menor concentración de colágeno otorga un mayor tamaño del poro (Sarrigiannidis et al., 2021), lo que permite un mayor ingreso del PPP en la red reticulada de colágeno. Al analizar los datos de la liberación de proteínas en el tiempo,

después de 168 horas de incubación, los hidrogeles elaborados con una mayor concentración de colágeno liberaron más proteínas que los hidrogeles fabricados a concentraciones menores. Sin embargo, esta liberación se hizo de golpe, ya que, en las mediciones realizadas en días anteriores, la concentración de proteínas para el colágeno al 5% se presentó como la menor con respecto a las demás concentraciones. Lo anterior se pudo haber dado ya que, pasadas 144 horas de incubación, la red de colágeno comenzó a degradarse, razón por la cual ya no había algo que lograra mantener el PPP dentro de los hidrogeles. Finalmente, la concentración de proteínas remanente en los hidrogeles estuvo menor al compararla con la retenida inicialmente, precisamente porque estas se liberaron de manera gradual. Tras los siete días de incubación, aquellos hidrogeles elaborados con colágeno al 3% y PPP retuvieron la mayor concentración de colágeno, esto porque en el tiempo de incubación, se presentó como la muestra que liberó una menor concentración de proteínas. Por otro lado, los hidrogeles con una concentración de colágeno al 1.5% tuvieron el menor remanente de proteínas, dado por la rápida liberación de proteínas que tuvieron en los primeros días de incubación, mientras que los hidrogeles con colágeno al 5% presentaron una concentración similar a la detectada inicialmente, pues liberaron sus proteínas lentamente en las primeras 144 horas. Los comportamientos anteriormente mencionados se pueden sustentar en la velocidad de degradación que presentaron las diferentes formulaciones, y como esto afectó la capacidad de retención del PPP por parte de los hidrogeles.

En cuanto a los resultados obtenidos de la PMC, se evidenció de manera clara que el módulo de compresión se encuentra relacionado de forma proporcional con la concentración de colágeno, ya que, al aumentar la concentración de colágeno en la mezcla de los hidrogeles, se obtuvieron mayores valores para K . De acuerdo con lo reportado por Sarrigiannidis et al. (2021), la concentración del colágeno es un parámetro que se puede modificar para, fácilmente, ajustar la

rigidez de los hidrogeles. A una mayor concentración de colágeno, hay mayor presencia de monómeros de colágeno, los cuales se entrecruzan de manera más organizada y reducen el tamaño del poro en la red de colágeno (Sarrigiannidis et al., 2021). Willits et al. (2004), fabricaron hidrogeles con concentraciones de colágeno entre 0.4 y 2 mg/mL, obteniendo módulos elásticos de 2.2 Pa para aquellos elaborados a una menor concentración, y de 17 Pa para aquellos elaborados a la mayor concentración de colágeno. De igual forma, en el año 2020, Pankajakshan et al., describieron un modelo de pulpa dental para la regeneración de este tejido, donde se utilizó colágeno a una concentración baja para simular el conducto radicular interno, y se utiliza colágeno a una mayor concentración rodeando al anterior, para que éste interactúe con la dentina circundante. Estas dos capas utilizadas presentaron unos módulos de 285 y 800 Pa, respectivamente; por lo que se confirma que el aumentar la concentración de colágeno de la estructura dará como resultado un ligero aumento en la fuerza y, por lo tanto, en su módulo de compresión, tal y como sucedió en el presente estudio.

Respecto de los valores obtenidos para K para los hidrogeles elaborados únicamente con colágeno a las diferentes concentraciones (1.5, 3 y 5%), estos se encontraron entre 6 y 14 kPa, los cuales incluso superan los presentados por Antoine et al. (2015), quienes para concentraciones de colágeno a 4, 6, 8 y 10 mg/mL, obtuvieron módulos de compresión entre 2 y 6 kPa aproximadamente. Sin embargo, en aquel estudio, los módulos de compresión obtenidos no solo se vieron afectados por la concentración de colágeno, sino también tanto por la temperatura como por el pH de los hidrogeles al momento de realizar las pruebas. También, en el año 2019, Nguyen et al., realizaron un estudio en el cual se elaboraron hidrogeles de colágeno, los cuales se reticularon haciendo uso de dos agentes diferentes, I2959 y VA086, y se sometieron a una prueba de compresión uniaxial para conocer su módulo de compresión. Aquellos hidrogeles que no se

reticularon con alguno de los agentes presentaron valores de K bajos, entre 0.78 y 0.96 kPa, por el contrario, cuando los hidrogeles se reticularon con I2959 al 0.02%, se observó que el módulo de compresión aumentó ligeramente, pero los resultados no presentaron diferencias significativas al compararlos con los hidrogeles sin reticular. Utilizando la misma concentración de reticulante, pero del VA086, mejoró significativamente el módulo de compresión. Finalmente, se aumentaron las concentraciones de ambos agentes reticulantes (0.1%), así como el tiempo de reticulación de 1 a 10 minutos, obteniendo mejoras significativas de hasta dos veces el módulo de compresión, comparándolos con aquellos hidrogeles sin reticular. Sin embargo, no se superaron los valores de K obtenidos en esta investigación. Lo anterior se podría explicar teniendo en cuenta el método de reticulación utilizado en el presente estudio, así como la fuente del colágeno y la utilización del PPP.

En cuanto a los hidrogeles de colágeno que se reticularon con el PPP, se puede decir que estos tuvieron una mayor oposición al esfuerzo que se les aplicó, ya que los valores de módulo de compresión aumentaron, comparados con los hidrogeles elaborados con las mismas concentraciones de colágeno (entre 13 y 28 kPa). Si bien, a la fecha no existen estudios en los cuales se haya estudiado la reticulación de hidrogeles de colágeno con el PPP, sí se han hecho estudios en los cuales se reticula plasma sanguíneo con hidrogeles elaborados a partir de colágeno de origen animal. En el año 2019, Egorikhina et al., desarrollaron un *scaffold* a base de crioprecipitado de plasma sanguíneo y colágeno tipo I derivado de fuentes bovinas (N° 1) y de piel de bacalao (N° 2). En este ensayo, al realizar la prueba de compresión, los hidrogeles se elaboraron como discos de 26 mm de diámetro y 2 mm de espesor, los cuales se deformaron utilizando una carga total de 0.1 N, a una velocidad de compresión de 1 mm/min, buscando deformarlos hasta el 50%, misma deformación trabajada en este estudio. Las muestras del colágeno N° 1 obtuvieron un

valor de módulo de compresión de 9.18 ± 0.90 kPa, mientras que el módulo de compresión para aquellas muestras elaboradas con el colágeno N° 2 presentó un valor de 5.61 ± 0.26 kPa. En ese mismo año, do Amaral et al., elaboraron un andamio cuya base era una mezcla de colágeno microfibrilar tipo I proveniente de tendón bovino y Condroitina-6-sulfato, aislado del cartílago de tiburón, el cual se funcionalizó con la fracción del plasma conocida como PRP, que buscaba mejorar el potencial de curación de heridas cutáneas. Estos andamios se evaluaron mecánicamente mediante pruebas de tracción uniaxial, con una celda de carga de 5 N y a una velocidad de deformación del 20%. Tras llevar a cabo la prueba, el módulo de compresión se definió como la pendiente de la recta en la curva de esfuerzo – deformación sobre el área entre el 20 y 25% de deformación. Los resultados obtenidos denotan un valor de K de aproximadamente 0.5 kPa para el hidrogel compuesto, valor que aumenta casi dos veces (~ 1 kPa) para el hidrogel que combinó el compuesto con el PRP. Del estudio también se confirmó que la elaboración de un hidrogel utilizando exclusivamente PRP no es una opción viable para esta aplicación, ya que el módulo de compresión es de aproximadamente 0.1 kPa. Esto último se asemeja a lo obtenido en la presente investigación, pues los hidrogel que se fabricaron a partir del PPP no presentaron un módulo de compresión adecuado para ser utilizados de manera individual. Por lo tanto, la utilización del colágeno junto con la fracción de sangre utilizada (PPP) mejora significativamente el valor de K , comparado al utilizar el colágeno y el PPP de manera individual.

Ya se ha hablado acerca de las propiedades mecánicas obtenidas para el andamio elaborado, y se busca que estas sean lo más parecidas posibles a las del tejido nativo, ya que la rigidez participa en la respuesta celular a través de receptores mecanosensibles (Sarrigiannidis et al., 2021). En el momento de caracterizar mecánicamente los tejidos blandos, uno de los métodos más utilizados es la técnica de indentación, mediante la cual un indentador rígido se encarga de

aplicar una fuerza o desplazamiento conocida al tejido. En la literatura se encontró que esta técnica se ha utilizado de manera *in vivo* para caracterizar el módulo de Young (o de elasticidad), más no para caracterizar el módulo de compresión. De esta manera, se ha logrado determinar que el módulo de elasticidad de la piel se encuentra en el rango entre 1.1 y 2.5 MPa (Bader & Bowker, 1983; Isaza López, 2019). Un estudio más reciente llevado a cabo por Kalra & Lowe (2016), presenta los valores del módulo de elasticidad para cada una de las capas de la piel, siendo estos de 1.5 MPa para la epidermis, entre 8 y 35 kPa para la dermis y 2 kPa para la hipodermis. Si bien es cierto que los resultados obtenidos en este estudio no son semejantes a los reportados para la capa exterior de la piel, sí cumplen satisfactoriamente para las capas restantes.

A partir de los resultados de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles, presentados en la Figura 19, se demostró la tendencia que, al aumentar la concentración de colágeno presente en la mezcla del hidrogel, disminuía esta capacidad, bajo la presencia o no del PPP. Esto se encuentra relacionado con lo expuesto anteriormente, donde la mayor concentración de colágeno se organiza mejor en la red de colágeno y, por lo tanto, se reduce el tamaño del poro (Sarrigiannidis et al., 2021), razón por la cual se disminuye la entrada de agua en los hidrogeles. La capacidad de hinchamiento también se vio afectada por la presencia del PPP en los hidrogeles. Lo anterior puede darse debido a que el plasma ha ocupado la gran mayoría de los espacios disponibles en la red de colágeno, por lo que la capacidad de hincharse con agua (o PBS en este caso) es baja. Un estudio llevado a cabo en el año 2001 por Taguchi & Tanaka, desarrolló hidrogeles de ácido hialurónico (HyA por sus siglas en inglés) y colágeno tipo II, los cuales se reticularon con el compuesto orgánico llamado carbodiimida. Al evaluar la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles elaborados con colágeno puro y de aquellos compuestos de colágeno y HyA, ambos reticulados con la carbodiimida, se detectó una disminución de esta capacidad a una mayor presencia del

compuesto orgánico reticulado en los hidrogeles. De acuerdo con lo reportado por Chuang et al. (2018), donde se elaboraron hidrogeles a partir de la conjugación de clorhidrato de tiramina con colágeno, la tasa de hinchamiento de estos hidrogeles decreció drásticamente de un 170 a un 50% a medida que se aumentó la concentración de colágeno entre 0.15 y 1.6%. Otro estudio llevado a cabo por Liu et al. en el año 2015, donde se evaluó el efecto de las células en la formación de fibras de triple hélice de colágeno a nivel molecular en hidrogeles de colágeno, demostró que la proporción de hinchamiento disminuyó con el aumento en el número de células. Además, este mismo estudio concluyó que el aumento en la concentración de colágeno en la fabricación del hidrogel disminuía el tamaño del poro en la red reticulada, lo que a su vez se tradujo en una disminución de la capacidad de hinchamiento. En consecuencia, la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles fabricados en el presente estudio se asemeja a lo reportado por estudios encontrados en la literatura.

En el presente estudio también se evaluó la capacidad de retención de agua y el contenido de agua para los hidrogeles. Para la primera de estas características, el valor obtenido estuvo cercano al 99% para los hidrogeles elaborado con colágeno puro, a las diferentes concentraciones establecidas. En el caso de los hidrogeles elaborados a partir de colágeno y PPP, aunque tuvieron valores de retención de agua menores a sus respectivos controles, estos se encuentran cercanos al 98%. Estos resultados coinciden con lo presentado por Ge et al. (2020), donde el contenido de agua se reportó de aproximadamente el 100%, aun cuando la concentración de colágeno soluble en pepsina se aumentó. Esta característica es importante, ya que la capacidad de un apósito para conservar el agua es un índice importante para evaluar su aporte en el tratamiento de heridas, ya que un apósito ideal para este fin debe mantener húmedo el entorno (Ge et al., 2020). En el caso de los hidrogeles de PPP puro, su contenido de agua se encuentra apenas sobre el 93%, por lo que

ya hay una diferencia con respecto a los valores obtenidos para las otras muestras. En cuanto a la otra característica mencionada anteriormente, el mayor contenido de proteínas se dio para los hidrogeles elaborados con el PPP puro. Además, los hidrogeles de colágeno reticulados con el PPP presentaron un mayor contenido de proteínas respecto con aquellos hidrogeles fabricados con colágeno puro, los cuales presentaron un contenido de proteínas con valores bastante reducidos, más no cercanos a cero. Lo anterior podría ser presentarse ya que el PBS utilizado en la elaboración de estos posee sales que pueden agregar peso en el momento de obtener tanto el peso hinchado como el peso seco, afectando la caracterización de esta propiedad.

El cómo cambia el peso de los hidrogeles en el tiempo, es decir, cómo se degradan, es otra de las características que se debe tener presente en el momento de fabricar matrices, ya que esta se encuentra relacionada con procesos de migración celular (Zhou et al., 2022). De los resultados se obtuvo que la menor variación en el peso, tras el periodo de incubación, lo presentaron aquellos hidrogeles de colágeno que se reticularon con el PPP. Estas muestras tuvieron una tasa de cambio de su peso menor a la reportada por Fang en el año 2018, donde en su estudio hubo una tasa de cambio en la masa de los hidrogeles del 55% pasada una semana de incubación. Además, en dicho estudio, el colágeno se mezcló con PEGDA, lo que se tradujo en la disminución de la tasa del cambio de peso hasta un 15%. De igual forma, Ramírez et al en el año 2022 elaboraron hidrogeles con colágeno a las mismas concentraciones de este estudio, y tras incubar las muestras por un periodo de 82 horas, vieron reducida la masa de sus hidrogeles en más del 50%. De acuerdo con lo dicho, se puede afirmar que la reticulación de algún compuesto en la red de colágeno permite ralentizar la degradación de los hidrogeles, siendo el PPP el componente orgánico utilizado con este fin.

Finalmente, en el presente estudio, se evaluó qué tan citotóxicos eran los lixiviados producidos por los hidrogeles de colágeno y PPP (Tabla 10). Los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad son parcialmente consecuentes con lo reportado por Ge et al. (2020), quien demostró que la utilización de colágeno soluble en pepsina permite a las células proliferar aún más que con la utilización del medio de cultivo tras 72 horas de incubación, tiempo tras el cual se obtiene el mejor porcentaje de viabilidad a una menor concentración de colágeno. Respecto a los hidrogeles elaborados con PPP puro, estos presentaron el mejor porcentaje de viabilidad pasadas 24 y 48 horas, pero no así para las 72 horas de incubación. El estudio llevado a cabo por Misiura et al. en el año 2021, en el cual se utilizó PRP para promover la proliferación celular, permitió conocer que esta fracción de la sangre aumenta en más del 100% la proliferación de los queratinocitos. Del estudio se concluye que el aumentar la concentración del PRP en el medio, aumenta también la tasa de proliferación celular. Por otro lado, un estudio en el cual se utiliza el PPP con el fin de expandir cultivos de fibroblastos 3T3 se llevó a cabo por Chisini et al. en el año 2017, concluyendo que el suplementar estas células con PPP disminuyó la adhesión celular de manera inicial, pero tuvo una capacidad de proliferación similar a la que otorga el uso del suero fetal bovino, precisamente por la elevada concentración de fibrina con que cuenta esta fracción de la sangre. Al comparar los resultados del presente estudio con los encontrados en la literatura, el permitir la reticulación del PPP con el colágeno de PTR extraído mediante ASC, permite una adecuada proliferación para periodos de tiempo menores. Esto podría darse precisamente por el método de extracción que se utilizó para el colágeno, así como el método de fabricación de los hidrogeles, donde se utilizaron sustancias con un pH que podrían afectar de manera negativa el proceso de proliferación celular.

Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones

Esta tesis se enfocó en desarrollar un método a través del cual se pudieran elaborar hidrogeles de colágeno, extraído de piel de tilapia, los cuales se reticularon con PPP, hidrogeles que serían caracterizados mecánica, física y biológicamente. Si bien el presente estudio utilizó un protocolo para la extracción de colágeno que había sido previamente estandarizado, la rigurosidad en los procedimientos permitió obtener un rendimiento en base seca que se asemeja a lo estudiado por otros autores, e incluso supera lo obtenido por metodologías planteadas previamente. Este colágeno permitió elaborar hidrogeles a concentraciones de 1.5, 3 y 5 mg/mL, los cuales se reticularon con PPP al 100%. La metodología planteada para la elaboración de estos hidrogeles reticulados con el componente de la sangre mencionado, permiten eliminar cualquier microburbuja que se pudiera formar en los hidrogeles, obteniendo andamios con una correcta apariencia física. A través de la PMC se confirmó que el aumentar la concentración de colágeno para elaborar los hidrogeles se traduce como un aumento del módulo de compresión. Sin embargo, el adicionar el PPP en la red reticulada de colágeno aumentó notablemente el módulo de compresión.

A pesar de haber fabricado hidrogeles aptos para la PMC, no se presentó la posibilidad de llevar a cabo la prueba de tensión, puesto que presentaron poca resistencia y se presentaron dificultados para adaptarlos como anillos. Además, el banco de carga no tuvo la capacidad de detectar la deformación que los hidrogeles presentaron. Es por esto que se propone el uso de equipos que presenten mayor sensibilidad al momento de detectar la deformación al momento de llevar a cabo ensayos de tensión.

En cuanto a las características de los hidrogeles fabricados, si bien se reduce la capacidad de hinchamiento al incluir el PPP en la red de colágeno, estos aún retienen un porcentaje significativo de agua, lo que les permitiría otorgar humedad a la herida. De igual forma se pudo

conocer de manera indirecta el contenido de proteínas de las diferentes formulaciones de hidrogeles fabricados, obteniendo valores importantes si se comparan con aquellos hidrogeles elaborados únicamente con colágeno. En cuanto a la tasa de degradación, estos hidrogeles son menos susceptibles a degradarse con el paso del tiempo comparados con aquellos elaborados únicamente con colágeno, ya que la adición de un componente orgánico como el PPP permitió la ralentización en la disminución de la masa de los hidrogeles. Esto también permitió que los hidrogeles retuvieran satisfactoriamente el PPP que se había reticulado en la red de colágeno, lo que a su vez permitió una correcta dinámica en la liberación de proteínas que se encuentran en la fracción de la sangre utilizada.

Adicionalmente, a partir de esta liberación se obtienen porcentajes de viabilidad celular adecuados para periodos no mayores a 48 horas. Teniendo en cuenta lo anterior, estos hidrogeles de colágeno extraído de la piel de tilapia roja y PPP se podrían postular como una alternativa prometedora para el tratamiento de las UCPD, otorgando propiedades mecánicas apropiadas, un ambiente húmedo que evitaría la contaminación de la herida y que permitirían la proliferación de las células, lo que a su vez daría lugar a una adecuada cicatrización.

Referencias

- Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Impact, Risk Factors and Control Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 25. <https://doi.org/10.3390/ijms22158278>
- Aguilar Hurtado, M. (2020). *Plan Territorial de Salud “Santander por el mundo.”* 433–553. <http://santandercompetitivo.org/media/31e7ab1122d0b7c84b7dde25e69879dd863b0a59.pdf>
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2015). Tunable collagen I hydrogels for engineered physiological tissue micro-environments. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122500>
- Aumiller, W. D., & Dollahite, H. A. (2015). Pathogenesis and management of diabetic foot ulcers. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 28(5), 28–34. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000464276.44117.b1>
- Bader, D. L., & Bowker, P. (1983). Mechanical characteristics of skin and underlying tissues in vivo. *Biomaterials*, 4(4), 305–308. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(83\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(83)90033-9)
- Bandyk, D. F. (2018). The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Seminars in Vascular Surgery*, 31(2–4), 43–48. <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2019.02.001>
- Carretero Villanueva, N. C. (2014). *Desarrollo de un hidrogel como soporte para el cultivo de células osteoprogenitoras* [Universidad El Bosque]. <http://hdl.handle.net/20.500.12495/5241>
- 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). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>

Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S., & Sassoli, C. (2019). Influence of platelet-rich and platelet-poor plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration.

International Journal of Molecular Sciences, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030683>

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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>

Cheng, M., Wang, H., Yoshida, R., & Murray, M. M. (2010). Platelets and Plasma Proteins Are Both Required to Stimulate Collagen Gene Expression by Anterior Cruciate Ligament Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), 1479–1489. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0199>

Chiang, N., Rodda, O. A., Kang, A., Sleigh, J., & Vasudevan, T. (2018). Clinical Evaluation of Portable Wound Volumetric Measurement Devices. *Advances in Skin and Wound Care*, 31(8), 374–380. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000540072.52782.24>

Chisini, L. A., Karam, S. A., Noronha, T. G., Sartori, L. R. M., Martin, A. S. S., Demarco, F. F., & Conde, M. C. M. (2017). Platelet-Poor Plasma as a Supplement for Fibroblasts Cultured in Platelet-Rich Fibrin. *Acta Stomatologica Croatica*, 51(2), 133–140. <https://doi.org/10.15644/asc51/2/6>

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. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1499660>

- Chung, E., Rytlewski, J. A., Merchant, A. G., Dhada, K. S., Lewis, E. W., & Suggs, L. J. (2015). Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, 17(January), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.012>
- Cruz, A. (2003). Biología de la cicatrización. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 11(1), 45–62.
<https://revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/623/577>
- Dinescu, S., Albu Kaya, M., Chitoiu, L., Ignat, S., Kaya, D. A., & Costache, M. (2019). *Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. January, 1643–1664. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_54
- Diridollou, S., Vabre, V., Berson, M., Vaillant, L., Black, D., Lagarde, J. M., Grégoire, J. M., Gall, Y., & Patat, F. (2001). Skin ageing: Changes of physical properties of human skin in vivo. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(6), 353–362.
<https://doi.org/10.1046/j.0412-5463.2001.00105.x>
- Egorikhina, M. N., Aleynik, D. Y., Rubtsova, Y. P., Levin, G. Y., Charykova, I. N., Semenycheva, L. L., Bugrova, M. L., & Zakharychev, E. A. (2019). Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics. *Bioactive Materials*, 4(June 2019), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.003>
- Falanga, V. (2020). Bioengineered skin constructs. In *Principles of Tissue Engineering*. INC.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00073-3>
- Fang, S. (2018). *Development of collagen-based scaffolds for differentiation of induced*

pluripotent stem cells [Binghamton University].

https://orb.binghamton.edu/dissertation_and_theses/87

Fleck, C. A., & Simman, R. (2010). Modern collagen wound dressings: Function and purpose.

Journal of the American College of Certified Wound Specialists, 2(3), 50–54.

<https://doi.org/10.1016/j.jcws.2010.12.003>

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. *Marine Drugs*, 18(4), 178. <https://doi.org/10.3390/md18040178>

Geerligs, M. (2010). Skin layer mechanics. In *Skin layer mechanics* (Issue 2010).

Grover, C. N., Cameron, R. E., & Best, S. M. (2012). Investigating the morphological,

mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical*

Materials, 10, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.028>

Gu, L., Shan, T., Ma, Y. xuan, Tay, F. R., & Niu, L. (2019). Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends in Biotechnology*, 37(5), 464–491.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>

Holmes, C., Wrobel, J. S., Maceachern, M. P., & Boles, B. R. (2013). Collagen-based wound

dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: A systematic review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 6, 17–29.

<https://doi.org/10.2147/DMSO.S36024>

Houdek, M. T., Wyles, C. C., Stalboerger, P. G., Terzic, A., Behfar, A., & Moran, S. L. (2016).

Collagen and Fractionated Platelet-Rich Plasma Scaffold for Dermal Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 137(5), 1498–1506.

<https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002094>

Hyland, J. C. (2007). Skin and connective tissue disorders. *Molecular Pathology in Clinical Practice, Md*, 191–203. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33227-7_16

International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas 2021* (10th ed.).

Isaza López, J. A. (2019). *Mechanical Behavior of Skin in Function of its Layers Thickness*. Universidad Nacional de Colombia.

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), 1–37. <https://doi.org/10.3390/polym12102230>

Joodaki, H., & Panzer, M. B. (2018). Skin mechanical properties and modeling: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 232(4), 323–343. <https://doi.org/10.1177/0954411918759801>

Kalra, A., & Lowe, A. (2016). An Overview of Factors Affecting the Skins Youngs Modulus. *Journal of Aging Science*, 4(2). <https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000156>

Karami, A., Tebyanian, H., Sayyad Soufdoost, R., Motavallian, E., Barkhordari, A., & Nourani, M. R. (2019). Extraction and Characterization of Collagen with Cost-Effective Method from Human Placenta for Biomedical Applications. *World Journal of Plastic Surgery*, 8(3), 352–358. <https://doi.org/10.29252/wjps.8.3.352>

Khan, Y., M. Khan, M., & Raza Farooqui, M. (2017). Diabetic foot ulcers: a review of current

- management. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), 4683.
<https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174916>
- Kiran, A. S. K., & Ramakrishna, S. (2021). Biomaterials: Basic principles. *An Introduction to Biomaterials Science and Engineering*, 82–93.
https://doi.org/10.1142/9789811228186_0004
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
- Lim, J. Z. M., Ng, N. S. L., & Thomas, C. (2017). Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 110(3), 104–109.
<https://doi.org/10.1177/0141076816688346>
- Liu, C. Y., Matsusaki, M., & Akashi, M. (2015). Cell effects on the formation of collagen triple helix fibers inside collagen gels or on cell surfaces. *Polymer Journal*, 47(5), 391–399.
<https://doi.org/10.1038/pj.2015.2>
- Martínez-Correa, E., Osorio-Delgado, M. A., Henao-Tamayo, L. J., & Castro-Herazo, C. I. (2020). Systemic classification of wound dressings: A review. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 41(1), 5–28. <https://doi.org/10.17488/RMIB.41.1.1>
- Meisenberg, G., & Simmons, W. (2018). *Principles of Medical Biochemistry* (4th ed.). Elsevier Inc.
- Meyer, M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials

properties. *BioMedical Engineering Online*, 18(1), 1–74. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>

MinAgricultura - SIOC. (2020). *Cadena de la Acuicultura 3°Trimestre 2020*.

[https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/2020-09-30 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/2020-09-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf)

Misiura, M., Guszczyn, T., Oscilowska, I., Baszanowska, W., Palka, J., & Milyk, W. (2021).

Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human keratinocytes via a progression of the cell cycle. A role of prolidase. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22020936>

Monteiro-Soares, M., Boyko, E. J., Jeffcoate, W., Mills, J. L., Russell, D., Morbach, S., & Game,

F. (2020). Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(S1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3272>

Montero, A., Quílez, C., Valencia, L., Girón, P., Jorcano, J. L., & Velasco, D. (2021). Effect of

fibrin concentration on the in vitro production of dermo-epidermal equivalents.

International Journal of Molecular Sciences, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136746>

Natesan, S., Stone, R., Coronado, R. E., Wrice, N. L., Kowalczewski, A. C., Zamora, D. O., &

Christy, R. J. (2019). PEGylated Platelet-Free Blood Plasma-Based Hydrogels for Full-Thickness Wound Regeneration. *Advances in Wound Care*, 8(7), 323–340.

<https://doi.org/10.1089/wound.2018.0844>

Nguyen, T. U., Watkins, K. E., & Kishore, V. (2019). Photochemically crosslinked cell-laden

methacrylated collagen hydrogels with high cell viability and functionality. *Journal of*

Biomedical Materials Research - Part A, September 2018, 1541–1550.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36668>

- Osidak, E. O., Kalabusheva, E. P., Alpeeva, E. V., Belousov, S. I., Krasheninnikov, S. V., Grigoriev, T. E., Domogatsky, S. P., Vorotelyak, E. A., & Chermnykh, E. S. (2021). Concentrated collagen hydrogels: A new approach for developing artificial tissues. *Materialia*, 20(September), 101217. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2021.101217>
- Owczarzy, A., Kurasiński, R., Kulig, K., Rogóż, W., Szkudlarek, A., & Maciążek-Jurczyk, M. (2020). Collagen-structure, properties and application. *Engineering of Biomaterials*, 156, 17–23. <https://doi.org/10.34821/eng.biomat.156.2020.17-23>
- Pankajakshan, D., Voytik-Harbin, S. L., Nör, J. E., & Bottino, M. C. (2020). Injectable Highly Tunable Oligomeric Collagen Matrices for Dental Tissue Regeneration. *ACS Applied Bio Materials*, 3(2), 859–868. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00944>
- Pawlaczyk, M., Lelonkiewicz, M., & Wieczorowski, M. (2013). Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(5), 302–306. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.38359>
- Peppas, N. A., Slaughter, B. V., & Kanelberger, M. A. (2012). Hydrogels. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Vol. 9, pp. 385–395). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0>
- Pereira C., N., Suh, H. P., & Hong, J. P. (JP). (2018). Úlceras Del Pie Diabético: Importancia Del Manejo Multidisciplinario Y Salvataje Microquirúrgico De La Extremidad. *Revista Chilena de Cirugía*, 70(6), 535–543. <https://doi.org/10.4067/s0718-40262018000600535>
- 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. *Informacion Tecnologica*, 28(1), 109–120.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2013). Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*, xxv–xxxix. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4>

Ramírez Rojas, D., Ramírez Sánchez, P., Santos Soto, J. (2022). 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 [Tesis de pregrado]. Universidad Autónoma de Bucaramanga.

Rosendo Fernandez, J. and Pérez Zarauza, M., 2016. Guía Práctica de Úlceras de Pie Diabético. Santiago de Compostela: Programa Úlceras Fóra

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(January). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100098>

Schneider-Barthold, C., Baganz, S., Wilhelmi, M., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016). Hydrogels based on collagen and fibrin - Frontiers and applications. *BioNanoMaterials*, 17(1–2), 3–12. <https://doi.org/10.1515/bnm-2015-0025>

Serrano Gaona, J. C. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir*

de los residuos de fileteo de tilapia (Oreochromis sp) y cachama (Piaractus brachypomus).

85. <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/>

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

Silvipriya, K. S., Krishna Kumar, K., Bhat, A. R., Dinesh Kumar, B., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 123–127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>

Snyder, R. J., & Hanft, J. R. (2009). Diabetic foot ulcers--effects on QOL, costs, and mortality and the role of standard wound care and advanced-care therapies. *Ostomy/Wound Management*, 55(11), 28–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934461>

Sobczak-Kupiec, A., Drabczyk, A., Florkiewicz, W., Głąb, M., Kudłacik-Kramarczyk, S., Słota, D., Tomala, A., & Tylińczak, B. (2021). Review of the applications of biomedical compositions containing hydroxyapatite and collagen modified by bioactive components. *Materials*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/ma14092096>

Taguchi, T., & Tanaka, J. (2002). Swelling behavior of hyaluronic acid and type II collagen hydrogels prepared by using conventional crosslinking and subsequent additional polymer interactions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13(1), 43–52. <https://doi.org/10.1163/156856202753525927>

Techatanawat, S., Surarit, R., Suddhasthira, T., & Khovidhunkit, S. O. P. (2011). Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: A comparative study. *Asian Biomedicine*, 5(6), 787–798. <https://doi.org/10.5372/1905-7415.0506.111>

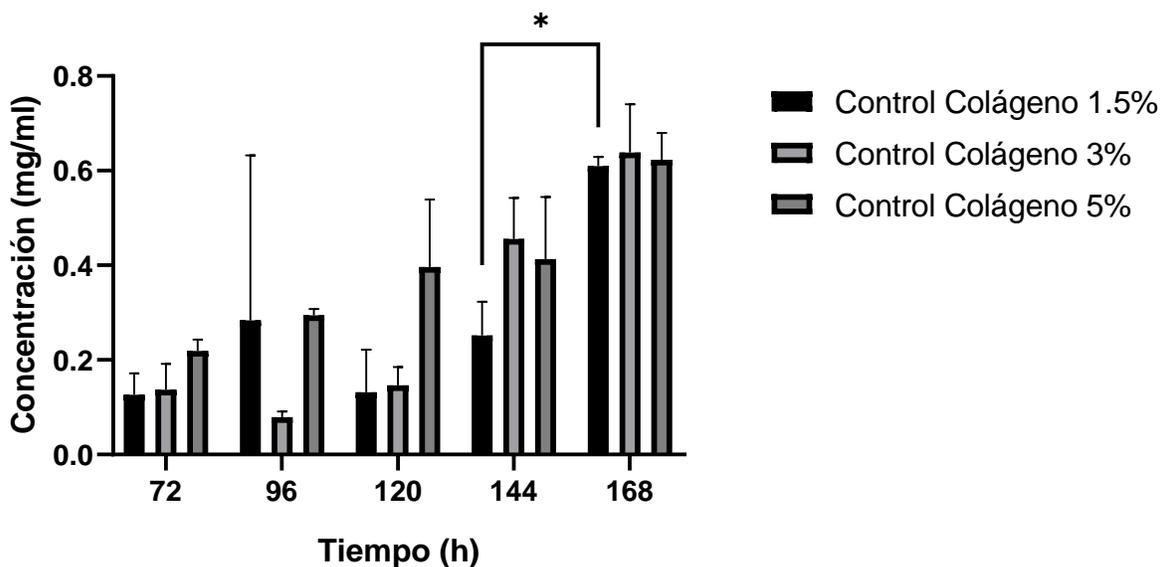
- Tian, H., Ren, Z., Shi, L., Hao, G., Chen, J., & Weng, W. (2021). Self-assembly characterization of tilapia skin collagen in simulated body fluid with different salt concentrations. *Process Biochemistry*, 108(June), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.013>
- Vallet-Regí, M. (2022). Evolution of Biomaterials. *Frontiers in Materials*, 9(March), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.864016>
- Willits, R. K., & Skornia, S. L. (2004). Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(12), 1521–1531. <https://doi.org/10.1163/1568562042459698>
- World Health Organization. (2021). *Diabetes*. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/diabetes>
- Wu, M., Cronin, K., & Crane, J. S. (2022). Biochemistry, Collagen Synthesis. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939531>
- Zeng, S. kui, Zhang, C. hua, Lin, H., Yang, P., Hong, P. zhi, & Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 116(4), 879–883. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.038>
- Zhang, J., Zhang, J., Zhang, N., Li, T., Zhou, X., Jia, J., Liang, Y., Sun, X., & Chen, H. (2020). The Effects of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Biological Characteristics of BM-MSCs in Vitro. *Analytical Cellular Pathology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8546231>
- Zhou, C., Sheng, C., Chen, J., Liang, Y., Liu, Q., Li, P., Huang, X., & Liu, B. (2022). Gradual hydrogel degradation for programable repairing full-thickness skin defect wound. *Chemical*

Engineering Journal, 450(P3), 138200. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138200>Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Impact, Risk Factors and Control Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 25. <https://doi.org/10.3390/ijms22158278>

Anexos

Anexo 1

Concentración de proteínas (mg/mL) para las muestras control elaboradas con colágeno.



Nota: en la figura se presenta la concentración de proteínas liberadas por los hidrogel de colágeno, cuantificadas en cinco tiempos diferentes. Los datos se calcularon con un n de 6 muestras para cada concentración. Los datos se reportan como la media \pm desviación estándar, obteniendo diferencias estadísticas entre los grupos, representados como: * para $p \leq 0.05$.

Anexo 2

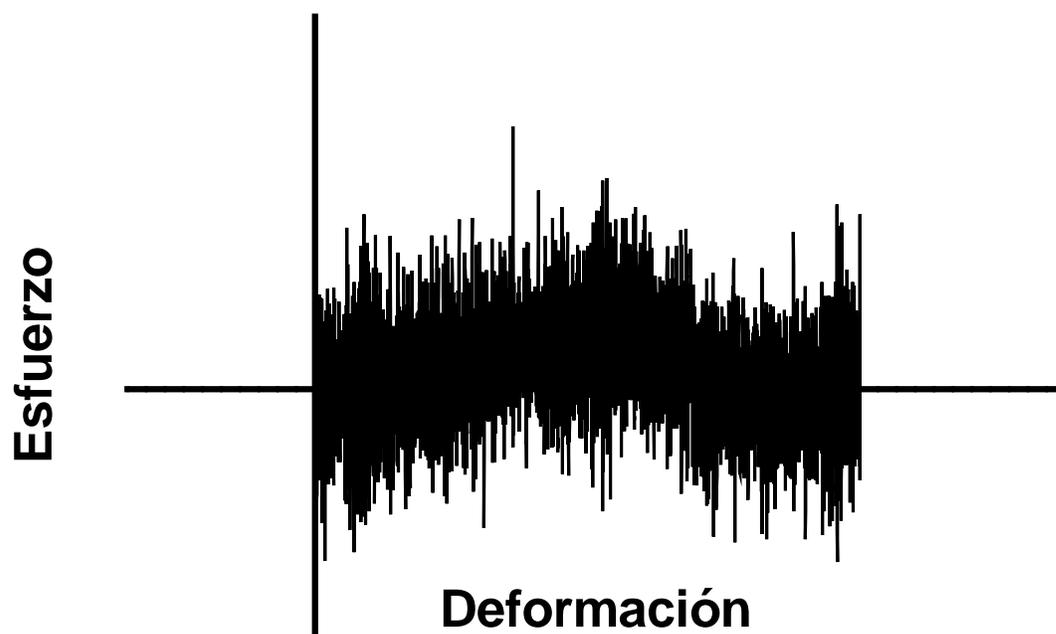
Concentración (mg/mL) de proteínas liberadas en el tiempo por parte de los hidrogeles fabricados.

Tiempo (h)	Muestras					
	Col 1.5% + PPP	Control Col 1.5%	Col 3% + PPP	Control Col 3%	Col 5% + PPP	Control Col 5%
72	4.380 ± 0.053	0.126 ± 0.046	5.112 ± 0.183	0.137 ± 0.055	3.635 ± 0.217	0.219 ± 0.024
96	4.794 ± 0.069	0.284 ± 0.349	5.698 ± 0.121	0.079 ± 0.012	4.238 ± 0.097	0.294 ± 0.013
120	6.822 ± 0.149	0.132 ± 0.090	6.052 ± 0.125	0.147 ± 0.039	5.184 ± 0.370	0.396 ± 0.143
144	8.279 ± 0.216	0.252 ± 0.071	6.717 ± 0.447	0.455 ± 0.087	6.558 ± 0.225	0.413 ± 0.131
168	8.420 ± 0.362	0.610 ± 0.019	7.566 ± 0.175	0.638 ± 0.102	10.054 ± 1.562	0.623 ± 0.056

Nota: la notación *Col* hace referencia al colágeno utilizado para la elaboración de los hidrogeles.

Anexo 3

Gráfica del ruido obtenido para la PMT.



Nota: la gráfica corresponde al resultado de haber graficado los datos obtenidos al llevar a cabo la PMT en uno de los hidrogel de colágeno al 5% + PPP.

Anexo 4

Valores de peso húmedo (Ws) y peso seco (Wd), en miligramos (mg), de las muestras.

Muestra	Colágeno 1.5% + PPP	Colágeno 3% + PPP	Colágeno 5% + PPP	Colágeno 1.5%	Colágeno 3%	Colágeno 5%	PPP
Ws	135.701 ± 39.15	198.886 ± 16.97	212.699 ± 28.23	164.051 ± 34.41	228.477 ± 30.06	234.208 ± 15.75	51.308 ± 27.76
Wd	2.349 ± 0.479	4.019 ± 0.203	4.386 ± 0.699	1.544 ± 0.315	2.210 ± 0.444	3.015 ± 0.118	2.974 ± 1.409

Anexo 5

Variaciones promedio de la masa de los hidrogeles durante el proceso de degradación.

Tiempo (h)	Muestras						
	Col 1.5% + PPP	Col 1.5%	Col 3% + PPP	Col 3%	Col 5% + PPP	Col 5%	PPP
24	18.546% ± 4.865	41.097% ± 6.427	30.789% ± 6.190	24.285% ± 10.823	16.919% ± 1.538	19.268% ± 3.218	48.643% ± 8.482
48	29.777% ± 6.476	61.189% ± 5.638	39.799% ± 3.435	44.402% ± 5.543	33.470% ± 2.807	19.996% ± 3.984	60.429% ± 7.720
72	34.645% ± 7.138	64.567% ± 8.587	40.819% ± 5.339	44.781% ± 6.585	30.756% ± 2.610	23.197% ± 2.210	63.530% ± 8.038
144	39.921% ± 8.486	67.539% ± 8.430	43.974% ± 6.308	49.037% ± 5.380	34.883% ± 2.108	27.032% ± 3.746	66.526% ± 7.807

Nota: estos cambios se calcularon con respecto al peso inicial de los hidrogeles, es decir, el tiempo 0.