
Caracterización y evaluación de biocompatibilidad del colágeno extraído de la piel de tilapia en el contexto de cicatrización de quemaduras

Giulianna Pagurut Santizo



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Caracterización y evaluación de biocompatibilidad
del colágeno extraído de la piel de tilapia en el
contexto de cicatrización de quemaduras

Trabajo de graduación presentado por Giulianna Pagurut Santizo para
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



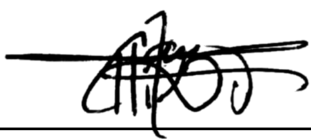
Caracterización y evaluación de biocompatibilidad
del colágeno extraído de la piel de tilapia en el
contexto de cicatrización de quemaduras

Trabajo de graduación presentado por Giulianna Pagurut Santizo para
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica


Guatemala,


2025

Vo.Bo.:

(f) 
M. Sc. Carlos Esquit

Tribunal Examinador:

(f) 
M.Sc. Carlos Esquit

(f) 
Dr. Luis Alberto Rivera Estrada

(f) _____
Ing. Kurt Emmanuel Kellner

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de febrero de 2025.

La ejecución de esta tesis no solo simboliza un éxito académico, sino también el producto de un proceso de aprendizaje y desarrollo personal que no hubiera sido factible sin el respaldo y soporte de personas especiales en mi vida. Durante este proyecto, he recibido el respaldo y soporte continuo de mi familia, quienes, con su cariño y fe en mí, han sido una fuente constante y esencial para mi motivación. A mis amigos, que han estado a mi lado en los momentos de adversidad y festejo, proporcionándome su apoyo y ánimo, les debo igualmente un profundo agradecimiento.

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a mi mentora, PhD. Vanessa Jungbluth, por su orientación, paciencia y compromiso durante este estudio. Su dedicación y conocimiento han sido cruciales para finalizar este trabajo, y su respaldo ha sido clave en mi crecimiento académico y profesional.

Además, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Diego Archila, por su cooperación y voluntad de compartir sus saberes y experiencia, que han aportado de manera significativa a la calidad de este proyecto.

Asimismo, agradezco al Departamento de Biología y al Departamento de Química pertenecientes a la Universidad del Valle de Guatemala, cuyos recursos, instalaciones y apoyo han sido cruciales para el desarrollo de esta investigación. La oportunidad de trabajar en un entorno tan enriquecedor ha sido invaluable y decisivo para la realización de esta tesis.

A todos ustedes, gracias.

Prefacio	III
Lista de figuras	VII
Lista de cuadros	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	4
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo general	7
4.2. Objetivos específicos	7
5. Alcance	8
6. Marco teórico	9
6.1. Quemaduras	9
6.1.1. Tipos de quemaduras en la piel	10
6.1.2. Tratamientos de quemaduras de piel	10
6.2. Apósitos	11
6.2.1. Historia de apósitos	11
6.2.2. Tipos de apósitos	11
6.2.3. Tipos de vendajes	12
6.3. Biomateriales	13
6.3.1. Relacionados a quemaduras	13
6.4. Colágeno: origen y propiedades	14
6.4.1. Tipos de colágeno	14

6.4.2. Fuente del colágeno	15
6.4.3. Uso y aplicaciones del colágeno	16
7. Metodología	18
7.1. Aislamiento de colágeno soluble en pepsina (PSC) a partir de piel de tilapia	18
7.2. Caracterización de colágeno	18
7.3. Descongelación de líneas celulares L929 y LAN-1	19
7.4. Conteo celular	19
7.5. Prueba para evaluar la viabilidad celular metil tiazol tetrazolio (MTT)	20
8. Resultados	21
8.1. Aislamiento de colágeno soluble en ácido (ASC) y, posteriormente, en pepsina (PSC)	21
8.2. Caracterización de colágeno	21
8.3. Evaluación de la biocompatibilidad del colágeno derivado de piel de tilapia con las líneas celulares L929 y LAN-1	22
8.4. Evaluación de la morfología celular de las líneas L929 y LAN-1 en cocultivos con diferentes concentraciones de colágeno	27
9. Discusión	32
10. Conclusiones	39
11. Recomendaciones	41
12. Bibliografía	43
13. Anexos	49
13.1. Preparación de la muestra	49
13.2. Desengrasado	50
13.3. Extracción de colágeno con ácido acético	50
13.4. Liofilización de la muestra	51
13.5. Incubación de líneas celulares LAN-1 y L929	51

Lista de figuras

1.	Tipos de quemaduras [25]	10
2.	Porcentaje aproximado de colágeno en diferentes tejidos del cuerpo [39]	14
3.	Porcentaje aproximado de colágeno en diferentes tejidos del cuerpo [42]	15
4.	Fórmula para conteo celular	19
5.	Fórmula para conteo celular	19
6.	Curva de calibración utilizada para calcular la concentración de hidroxiprolina en muestras de colágeno	22
7.	Línea celular L929 después de 24 horas de incubación en colágeno. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/ml de colágeno. C) Concentración de 50 ug/ml de colágeno. D) Concentración de 10 ug/ml de colágeno. E) Concentración de 1 ug/ml de colágeno	23
8.	Línea celular LAN-1 después de 24 horas de incubación en colágeno. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/mL de colágeno. C) Concentración de 50 ug/mL de colágeno. D) Concentración de 10 ug/ml de colágeno. E) Concentración de 1 g/ml de colágeno	24
9.	Desviación estándar de la viabilidad de la línea celular L929 según las concentraciones de colágeno después de realizar el ensayo MTT	25
10.	Desviación estándar de la viabilidad de la línea celular LAN-1 según las concentraciones de colágeno después de realizar el ensayo MTT	26
11.	Morfología de línea celular L929. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/ml de colágeno. C) Concentración de 50 ug/ml de colágeno. D) Concentración de 10 ug/ml de colágeno. E) Concentración de 1 ug/ml de colágeno	29
12.	Morfología de línea celular LAN-1. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/mL de colágeno. C) Concentración de 50 ug/mL de colágeno. D) Concentración de 10 ug/mL de colágeno. E) Concentración de 1 ug/mL de colágeno	31
13.	Piel de tilapia posterior de 3 horas de remojo en solución de hidróxido de sodio (NaOH)	49
14.	Piel de tilapia en remojo en etanol durante 24 horas	50
15.	Colágeno extraído de la piel de tilapia soluble en ácido acético	50

16. Muestra liofilizada en liofilizador (Pro Freeze Dryer, Harvest Right, Utah, USA)	51
17. Células LAN-1 bajo microscopio invertido (x100) con un período de incubación en medio DMEM de 24 horas	51
18. Células L929 bajo microscopio invertido (x100) con un período de incubación en medio DMEM de 24 horas	52

Lista de cuadros

1. Fuente de colágeno y el tipo de colágeno predominante [47]	16
2. Resultados del proceso de extracción de colágeno de piel de tilapia	21

El órgano más grande del cuerpo humano es la piel, la cual es esencial para mantener la salud. Según la OMS, las quemaduras causan aproximadamente 180,000 muertes anuales, lo que destaca la necesidad de tratamientos eficaces. Por esto el objetivo de este proyecto es generar una solución innovadora con el fin de tratar quemaduras utilizando colágeno extraído de la piel de tilapia. El colágeno de tilapia presenta una estructura similar a la del colágeno humano, lo que lo hace más biocompatible y menos susceptible a la contaminación, a diferencia del colágeno de bovinos y porcinos. Utilizar la piel de tilapia, un subproducto de la acuicultura, también contribuye a la sostenibilidad al reducir el desperdicio.

Este proyecto se enfoca en generar una solución vanguardista para el tratamiento de quemaduras que beneficien a los pacientes en entornos médicos. El colágeno, conocido por su capacidad para cicatrizar y ser biocompatible, es esencial para la fabricación de apósitos. Por ende, se ofrece una futura alternativa viable a las fuentes tradicionales de colágeno, y así se generará un impacto significativo en el campo médico. Este proyecto se divide en tres fases. La primera etapa se enfocará en la preparación de la piel de tilapia. La segunda, en la extracción del colágeno de la piel tratada mediante proceso enzimático. Finalmente, la tercera etapa consiste en la realización de pruebas específicas para verificar la presencia de colágeno y evaluar la biocompatibilidad del mismo. Se utilizarán células L929 y LAN-1 para evaluar la biocompatibilidad del colágeno extraído mediante pruebas con azul de metileno y ensayo de MTT.

The largest organ in the human body is the skin, which is essential for maintaining health. According to the WHO, burns cause approximately 180,000 deaths annually, highlighting the need for effective treatments. Therefore, the objective of this project is to generate an innovative solution to treat burns using collagen extracted from tilapia skin. Tilapia collagen has a structure similar to human collagen, making it more biocompatible and less susceptible to contamination compared to bovine and porcine collagen. Using tilapia skin, a by-product of aquaculture, also contributes to sustainability by reducing waste.

This project focuses on developing an advanced solution for burn treatment that benefits patients in medical settings. Collagen, known for its healing capabilities and biocompatibility, is essential in the manufacturing of wound dressings. Thus, a viable future alternative to traditional collagen sources is offered, aiming to make a significant impact in the medical field. This project is divided into three phases. The first stage will focus on the preparation of tilapia skin. The second phase will focus on the extraction of collagen from the treated skin through an enzymatic process. Finally, the third phase consists of performing specific tests to verify the presence of collagen and evaluate its biocompatibility. L929 and LAN-1 cells will be used to assess the biocompatibility of the extracted collagen through methylene blue and MTT assay tests.

El colágeno es considerado como una proteína de vital importancia en el organismo humano, frecuentada en el ámbito biomédico debido a sus características biocompatibles, biodegradables y su habilidad para fomentar la regeneración de tejidos. El colágeno proveniente de animales ha sido el principal recurso para usos en la ingeniería de tejidos, producción de apósitos y otras aplicaciones terapéuticas. No obstante, las inquietudes acerca de patologías zoonóticas, obstáculos culturales y limitaciones éticas han motivado la exploración de fuentes alternativas de colágeno. En estas circunstancias, el colágeno procedente del mar, especialmente el obtenido de la piel de peces, se ha vuelto una alternativa con gran potencial debido a su reducido riesgo de contagio de enfermedades, su abundancia y su fácil adquisición.

La tilapia es una especie comunmente cultivada en diversas partes del mundo, cuyo procesamiento genera grandes cantidades de residuos, especialmente de piel. Este subproducto, que tradicionalmente es desechado o destinado a usos de bajo valor, es una fuente rica en colágeno que podría ser aprovechada para aplicaciones biomédicas. La extracción y purificación de colágeno a partir de la piel de tilapia no sólo representa una oportunidad para reducir los desechos en la industria acuícola, sino que también ofrece una alternativa sostenible y accesible para el desarrollo de biomateriales.

Por ende, dicho trabajo de investigación se enfoca en la purificación y caracterización del colágeno extraído de la piel de tilapia, empleando técnicas químicas con el fin de obtener una muestra de alto grado de pureza que se adecúe para diversas aplicaciones biomédicas. Se busca optimizar el proceso de extracción, eliminando proteínas no colagenosas y lípidos que podrían afectar la estabilidad y funcionalidad del colágeno. Además, se realizan análisis estructurales y de estabilidad para evaluar la viabilidad del colágeno obtenido en aplicaciones como la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas. Por medio de este estudio, se espera contribuir a la literatura existente sobre fuentes alternativas de colágeno y sentar las bases para investigaciones futuras en el desarrollo de biomateriales a partir de subproductos de origen marino.

La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, juega un papel fundamental en la protección de la salud y el bienestar. No obstante, cuando se supera esa barrera y se obstaculiza el proceso de curación, es crucial restablecer la protección antes de que surjan complicaciones crónicas que puedan ser perjudiciales para la salud. Por lo que, antes de las donaciones de piel, es crucial realizar tratamientos como limpieza de la herida, eliminación de tejido necrótico y uso de apósitos oclusivos para proteger la piel. Además, las heridas pueden afectar partes importantes del cuerpo, lo que dificulta el tratamiento cuando no hay suficiente piel donada [1], [2]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las quemaduras causan aproximadamente 180,000 muertes al año en países en desarrollo. Las quemaduras graves causan desvitalización del tejido, exudados y proliferación de microorganismos, lo que hace crucial el uso de terapia húmeda con apósitos oclusivos [3].

La Sociedad Internacional de Lesiones por Quemaduras (ISBI) [4] define a las quemaduras como lesiones en la piel provocadas por traumatismos térmicos que pueden permitir que los patógenos ingresen al cuerpo [4]. Además, es importante recordar que la elección de los apósitos correctos es crucial. Estos deben seleccionarse en función de cada lesión en específico, teniendo en cuenta su efectividad curativa, facilidad de uso, costo y comodidad para el paciente. Los apósitos deben elegirse según las necesidades específicas de cada quemadura, ya que protegen contra infecciones, absorben exudados y facilitan la cicatrización.

Debido a su capacidad para estimular la formación de tejido de granulación, promover la migración celular, prevenir infecciones y mantener un ambiente húmedo que favorece la cicatrización, el colágeno se utiliza en apósitos para la curación de heridas [4]. Por ello, el colágeno utilizado en apósitos se obtiene actualmente de fuentes animales; uno de los métodos más comunes para obtener colágeno es el curtido del cuero [5]. El proceso implica la extracción de colágeno animal a partir de pieles de vacas, cerdos o peces mediante tratamientos mecánicos y químicos para eliminar impurezas y producir una matriz rica en colágeno. Sin embargo, el uso de colágeno animal en apósitos para heridas presenta la desventaja del riesgo de desencadenar reacciones alérgicas y transmitir enfermedades zoonóticas en entornos clínicos [5].

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, el colágeno extraído de la piel de pescado puede tener una estructura molecular más similar a la de la piel humana, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en heridas cutáneas. La disponibilidad de colágeno de origen animal ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de apósitos para el tratamiento de heridas y quemaduras, incluyendo apósitos de colágeno puro, apósitos combinados con otros materiales como alginato de calcio o quitosano, y apósitos con propiedades antimicrobianas [6].

Por ende, gracias a su alto contenido de colágeno y su capacidad de adherirse a los tejidos cutáneos, la piel de tilapia ha surgido como una alternativa prometedora en el tratamiento de quemaduras [3]. Esto lo convierte en una opción más segura que otros animales terrestres. Para abordar estas lesiones de manera más efectiva y específica, considerando su impacto en la calidad de vida y los costos sanitarios, es necesario desarrollar apósitos activos que mejoren la atención avanzada de quemaduras [7].

Debido a su biocompatibilidad innata, biodegradabilidad y funcionalidades innovadoras, el uso de biomateriales de origen natural y sus múltiples beneficios han despertado un gran interés [8]. El colágeno es uno de los biomateriales más reconocidos que ha demostrado ser un producto esencial para una variedad de aplicaciones, tales como las cosméticas, alimentarias, biomédicas y farmacéuticas [9]. El colágeno derivado de fuentes de mamíferos se utiliza con mayor frecuencia en la administración de medicamentos, la administración de genes, el tratamiento de heridas, matrices fundamentales para el cultivo celular [10], ingeniería de tejidos como sustitutos óseos, reemplazo de válvulas y vasos sanguíneos artificiales [10], [11].

La proteína animal más abundante es el colágeno, el cual representa aproximadamente el 25-30 por ciento de todas las proteínas de los organismos animales. Este es reconocido por ser un componente esencial que se encuentra en los tejidos conectivos del cuerpo, siendo estos los músculos, los dientes, los huesos y la piel. No obstante, se concentra mayoritariamente en la piel y los tejidos relacionados con los huesos. Las principales fuentes de colágeno son los bovinos y los porcinos, que también se consideran las mejores fuentes debido a su alta homología de secuencia con el colágeno humano [12].

Cabe mencionar que la extracción de colágeno se realiza principalmente a partir de desechos bovinos, así como de piel, huesos y cartílago de cerdos; sin embargo, existen desafíos asociados con estas fuentes de colágeno convencionales. Por ello, se han realizado diversos estudios con el fin de evaluar la eficacia del colágeno de pescados utilizando las pieles de peces [13]. Aunque el colágeno proviene principalmente de los animales, es importante tener en cuenta que el colágeno de origen animal también presenta riesgos, esto debido a la posible transmisión de enfermedades a través de la sangre, como la encefalopatía espongiiforme bovina, la fiebre aftosa, la tembladera caprina y otras zoonosis [13], [14], [15].

En este sentido, el colágeno extraído de la piel de tilapia se presenta como una alternativa atractiva que satisface las necesidades del mercado y aborda los problemas ambientales en el sector de las piscifactorías [13]. Lo cual se vuelve una ventaja significativa dado que uno de los peces de agua dulce y salada que se cultivan con mayor frecuencia en todo el mundo, especialmente en áreas tropicales y subtropicales, es la tilapia [16]. Sin embargo, a pesar

de que la industria de piscifactoría ha crecido significativamente, la producción de filetes de pescado genera una variedad de desperdicios, tales como la piel, huesos, escamas, vísceras y cabezas [15]. Es importante tomar en cuenta que la piel, que se considera rica en colágeno, representa aproximadamente el 30 por ciento de todos los desperdicios.

Aunque la piel del pescado es un subproducto de la industria procesadora, esta se descarta como desperdicio o se utiliza para fines de importancia limitada. Como resultado, la extracción de colágeno se convierte en una opción rentable. Debido a que la piel de los peces de tilapia es común y fácil de obtener, la producción de la misma es menos costosa en comparación con otras fuentes de colágeno tales como la piel de bovino [10].

Por ende, el aprovechamiento de subproductos como la piel de tilapia para la extracción de colágeno promueve la sostenibilidad al utilizar recursos que de otro modo se descartarían e incrementarían el desperdicio en la industria pesquera [12]. Por ello, es importante recalcar que el uso de vendajes para quemaduras hechos de materiales biodegradables y renovables también promueven prácticas ambientalmente amigables y ayuda a reducir la huella ecológica de los tratamientos médicos [17]. Es importante tomar en cuenta que la similitud química del colágeno de tilapia con el colágeno humano ayuda a reducir el riesgo de reacciones adversas o rechazo inmunológico cuando se aplica al cuerpo humano.

Asimismo, el colágeno es una proteína esencial para la estructura y función de la piel, así como también su presencia en apósitos y/o vendajes ayuda a mejorar la cicatrización de heridas. Se ha demostrado que el colágeno de tilapia posee propiedades bioactivas, incluida la capacidad de estimular la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular, lo que fomenta la formación de nuevo tejido y la regeneración de la piel después de quemaduras. Además, el colágeno de tilapia también se integra mejor en la piel gracias a la similitud estructural, lo que ayuda a promover una mejor respuesta regenerativa y una cicatrización más rápida de las quemaduras [10].

Se ha demostrado en estudios clínicos que el uso de vendajes de colágeno, incluidos los derivados de la piel de tilapia, son capaces de acelerar significativamente el proceso de cicatrización en quemaduras de diferentes grados. Por ende, la promoción de la migración, proliferación celular y la capacidad del colágeno para mantener un ambiente húmedo y protegido en la herida ayudan a una recuperación más rápida y reducen las complicaciones como las infecciones [12].

Por otro lado, el colágeno es un polímero natural que se utiliza en productos farmacéuticos y suplementos debido a su alta capacidad para promover la curación. Cuando una instalación médica no posee acceso a injertos, el tratamiento convencional es la utilización de gasas y vendas que deben ser reemplazados cada dos días, lo que causa un gran dolor y molestia al paciente. En el caso de los injertos de piel de Tilapia, solo se debe reemplazar cada diez días y en la mayoría de los casos, no es necesario cambiar la piel. Su increíble capacidad para retener la humedad mucho más tiempo que cualquier otro apósito no solo mantiene la herida sellada por más tiempo, sino que también reduce el dolor y el sufrimiento de los pacientes [13], [15].

En comparación con el colágeno obtenido de fuentes animales como el ganado o los cerdos, la piel de tilapia como fuente de colágeno tiene un riesgo menor de contaminación microbiana y enfermedades zoonóticas. Esto es particularmente importante en las instalaciones médicas,

donde la seguridad y la prevención de infecciones son esenciales para el tratamiento de quemaduras y otras lesiones cutáneas [14]. Por ende, el consumo de colágeno de fuentes marinas puede ser una alternativa segura para los consumidores con el fin de abordar dichos problemas de salud [15].

4.1. Objetivo general

Extraer y analizar colágeno de la piel de tilapia para evaluar ensayos de biocompatibilidad que podrían ser utilizados para aplicaciones de cicatrizaciones de heridas.

4.2. Objetivos específicos

- Aislar el colágeno perteneciente a la piel de tilapia mediante el método de extracción enzimática con enzimas proteolíticas.
- Caracterizar la morfología del colágeno extraído de la piel de tilapia mediante una extracción enzimática.
- Examinar la distribución morfológica de las células L929 y LAN-1 y la estructura fibrilar del colágeno utilizando técnicas de observación microscópica.
- Evaluar la biocompatibilidad del colágeno utilizando células L929 y LAN-1 mediante el método MTT Assay y Azul de Metileno.

El propósito principal de este estudio es desarrollar y caracterizar un proceso de purificación de colágeno obtenido de la piel de tilapia, valorando su posible uso en biomedicina, particularmente en la ingeniería de tejidos y en la cicatrización de heridas. Se lleva a cabo a través de tratamientos químicos con NaOH y ácido acético, con el objetivo de eliminar proteínas no colagenosas y lípidos, optimizando de esta manera la pureza y estabilidad estructural del colágeno adquirido.

Aunque se emplea un protocolo estandarizado para la purificación y caracterización de colágeno, los procedimientos y materiales utilizados no son necesariamente los más adecuados para conseguir un producto totalmente exento de impurezas, lo que podría afectar la reacción final del colágeno en usos clínicos. En esta etapa, la labor se restringe a realizar evaluaciones iniciales del material en un ambiente controlado de laboratorio, lo que implica que los resultados logrados no constituyen un colágeno preparado para su uso y aplicación en seres humanos.

Debido que dicho proyecto se encuentra en una etapa inicial de desarrollo, no se utilizan métodos sofisticados tales como la bioimpresión o los cultivos celulares complejos para valorar la biocompatibilidad del colágeno en usos particulares. Los reactivos y materiales empleados se escogen por su accesibilidad y compatibilidad con los equipos de laboratorio existentes, dando igualmente prioridad a su coste reducido y facilidad de manejo. Esto significa que los estudios de viabilidad celular y estabilidad estructural se llevan a cabo bajo condiciones reguladas y no en modelos que se puedan aplicar directamente en tejidos humanos.

La bibliografía relacionada con la obtención de colágeno de especies piscícolas para usos biomédicos es escasa, lo que supone un reto al contrastar los hallazgos alcanzados con investigaciones anteriores en otras especies. Al estimar los gastos y el tiempo necesario para la extracción y descripción del colágeno, es crucial tener en cuenta que este estudio constituye una etapa inicial en un proyecto de mayor magnitud, que podría incorporar en el futuro ensayos de biocompatibilidad en modelos animales y la mejora del proceso de purificación para conseguir un producto de calidad biomédica.

6.1. Quemaduras

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), una quemadura es un daño en la piel u otro tejido orgánico causado por calor, radiación, radioactividad, electricidad, fricción o contacto con sustancias químicas. Este tipo de daño puede generar ampollas debido a la temperatura elevada, que destruye las células de la piel y otros tejidos a través de diferentes mecanismos [18].

La gravedad de las quemaduras varía considerablemente y puede estar influenciada por patologías preexistentes en el paciente, las cuales afectan el resultado clínico. A medida que aumenta el área afectada por la quemadura, también incrementan las tasas de morbilidad y mortalidad. Por lo tanto, una clasificación precisa de la quemadura es esencial para determinar el tratamiento adecuado y mejorar el pronóstico del paciente [19].

Cuando la piel es expuesta a altas temperaturas, se produce una desnaturalización de las proteínas que resulta en necrosis coagulativa. Alrededor de la lesión, los vasos sanguíneos se contraen, y el tejido circundante, conocido como "zona de estasis" puede deteriorarse si no se aplica un tratamiento adecuado. Este tejido alrededor de la zona de estasis suele inflamarse y presentar hiperemia [20], [21].

A nivel local, se pueden identificar tres zonas con distintos grados de afectación:

1. Zona necrótica: es la más afectada, donde se observa la desaparición completa de la red vascular capilar [22].
2. Zona de estasis: es una región intermedia caracterizada por la dilatación de la red capilar; si no se trata adecuadamente, puede formarse trombosis [22].
3. Zona hiperémica: es la zona más superficial, donde la epidermis presenta inflamación, y la dermis permanece intacta [22].

6.1.1. Tipos de quemaduras en la piel

Para clasificar las quemaduras y determinar su gravedad y pronóstico, es fundamental evaluar la profundidad, la extensión y la localización de la quemadura [23]. Las quemaduras se dividen en tres grados: primer, segundo y tercer grado.

Tal y como se observa en la Figura 1, las quemaduras de primer grado, también conocidas como quemaduras superficiales, son las más leves, ya que sólo afectan la epidermis, la capa más externa de la piel [23]. Este tipo de quemaduras suele sanar entre 3 y 5 días sin dejar cicatrices significativas. Las quemaduras de segundo grado afectan tanto la epidermis como la dermis, la capa subyacente. Estas quemaduras suelen ser dolorosas y pueden provocar inflamación y ampollas. En general, requieren un manejo cuidadoso para prevenir infecciones y facilitar una recuperación adecuada. Las quemaduras de tercer grado, también denominadas quemaduras de espesor total, atraviesan completamente la epidermis y la dermis, afectando los tejidos más profundos. Estas lesiones suelen requerir injertos de piel para sanar, ya que no se curan por sí solas debido a la extensión del daño [12]. Además, las quemaduras de tercer grado no son dolorosas, ya que las terminaciones nerviosas en el área afectada han sido destruidas, lo que impide la percepción del dolor y la regeneración de las mismas [24].

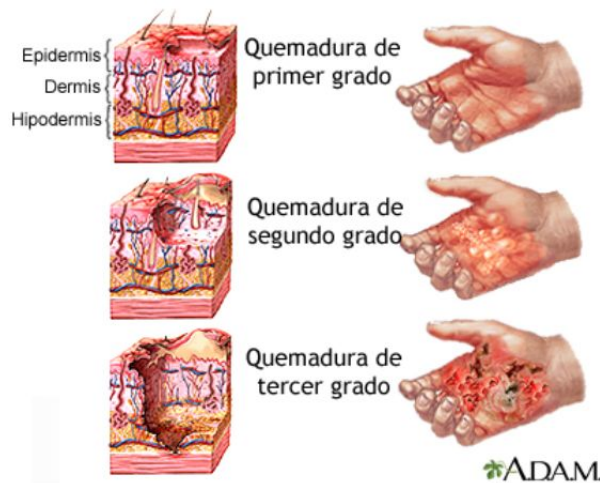


Figura 1: Tipos de quemaduras [25]

6.1.2. Tratamientos de quemaduras de piel

El tratamiento de las quemaduras varía según la causa y la gravedad de la lesión. Todas las quemaduras deben mantenerse limpias y de acuerdo con la severidad, es necesario aplicar vendajes o apósitos apropiados. Un aspecto fundamental es el control del dolor, ya que un manejo inadecuado puede interferir con el proceso de curación de la herida [25].

Los tratamientos se adaptan al tipo de quemadura:

1. Primer grado: las quemaduras de primer grado requieren enfriamiento inmediato con agua fría para reducir el calor en el área afectada. Posteriormente, se recomienda aplicar una crema antibiótica y cubrir la zona con una gasa esterilizada para protegerla [25].

2. Segundo grado: para las quemaduras de segundo grado, es ideal utilizar una crema antibiótica que contenga plata, ya que la plata tiene propiedades antimicrobianas que ayudan a prevenir infecciones. Además, se recomienda mantener elevada el área afectada para reducir la inflamación y el dolor [25].
3. Tercer grado: las quemaduras de tercer grado son graves y pueden poner en riesgo la vida del paciente. Estas lesiones requieren atención médica inmediata y, a menudo, es necesario administrar líquidos por vía intravenosa para mantener la estabilidad de la presión arterial y prevenir la deshidratación. En algunos casos, puede requerirse un injerto de piel debido al daño profundo [25].

6.2. Apósitos

Los apósitos se adhieren a las heridas con el fin de protegerlas de infecciones y prevenir futuras lesiones. Existen apósitos de diversas formas y tipos, cada uno con diferentes propósitos, no obstante, su objetivo primordial es mantener y crear siempre un ambiente húmedo para fomentar el continuo crecimiento de células, facilitando el proceso de curación [26].

6.2.1. Historia de apósitos

El ser humano ha intentado curar sus heridas desde la antigüedad y algunas de las técnicas y terapias utilizadas han perdurado a lo largo de los siglos [27]. Muchos de los materiales que conocemos hoy en día para el tratamiento de heridas han surgido a partir de diversos conflictos y descubrimientos históricos. La gasa, por ejemplo, es un producto que se utiliza desde el siglo V a.C. Su retirada puede ser dolorosa, ya que los tejidos se adhieren a la herida al secarse sobre el lecho [26].

Durante mucho tiempo, desde la época de Hipócrates hasta 1962, se creía que la cura seca ayudaba a cicatrizar las heridas. Sin embargo, en 1962, George D. Winter realizó un estudio en cerdos en el cual comparó el proceso de cicatrización entre heridas sin apósito y heridas cubiertas con polietileno (PE) en un ambiente húmedo, oclusivo. Winter descubrió que las heridas en un entorno húmedo regeneraban epitelio más rápido que las heridas secas y que aquellas cubiertas con polietileno (PE) cicatrizaban el doble de rápido que las que no llevaban apósito [28].

A partir de estos hallazgos, el enfoque comercial de los apósitos ha priorizado mantener un ambiente húmedo y un control adecuado del exudado. Durante la Primera y Segunda Guerra Mundial, se desarrolló el primer apósito no adhesivo de doble capa: una capa de gasa impregnada con parafina y otra capa adicional para absorber el exudado. Los apósitos modernos siguen manteniendo esta estructura de doble capa para optimizar la curación de las heridas

6.2.2. Tipos de apósitos

Existen diversos tipos de apósitos, con características y aplicaciones para la cicatrización:

1. Biocompatibilidad: la capacidad de interactuar con el organismo sin causar efectos adversos. Un biomaterial biocompatible permite una integración sin dañar los tejidos circundantes y promueve una respuesta favorable [29].
2. Respuesta del organismo: esta propiedad se centra en cómo el cuerpo reacciona al material, que rara vez es completamente inerte. La interacción depende del tiempo y el propósito del material implantado, lo cual debe evaluarse para evitar reacciones inmunológicas no deseadas [29].
3. Toxicidad: los biomateriales deben ser diseñados para no liberar sustancias tóxicas al organismo. La toxicidad puede comprometer otros órganos o sistemas, por lo que es crucial que el material implantado esté libre de agentes que puedan provocar toxicidad a corto o largo plazo [29].
4. Propiedades mecánicas: dependiendo de la aplicación, un biomaterial debe tener propiedades mecánicas específicas, como resistencia a la tracción, elasticidad y durabilidad, que le permitan soportar el uso y adaptarse a las fuerzas del cuerpo humano [29].

6.2.3. Tipos de vendajes

Existen cinco tipos principales de vendajes, utilizados para diversas aplicaciones:

1. Vendaje circular: consiste en dar una vuelta completa de la venda sobre sí misma. Es utilizado principalmente para asegurar apósitos en su lugar [30].
2. Vendaje en espiral: la venda rodea la extremidad de forma continua desde la parte inferior hasta la zona deseada. Este vendaje se aplica a menudo en brazos y piernas [30].
3. Vendaje inverso: se dobla la venda sobre sí misma en cada vuelta, lo cual permite una mayor sujeción. Es ideal para zonas donde se necesita más firmeza [30].
4. Vendaje cruzado en 8: comúnmente utilizado en articulaciones. El vendaje se aplica formando un patrón en forma de ocho, proporcionando estabilidad sin restringir el movimiento [30].
5. Vendaje recurrente: este tipo de vendaje se utiliza para proteger áreas como la cabeza y fijar apósitos en heridas complejas. Se aplica cubriendo la zona con varias capas, asegurando la protección [30].

En la búsqueda de opciones efectivas para el tratamiento de heridas y quemaduras, la combinación de vendajes avanzados y biomateriales ha ganado protagonismo en el ámbito médico. Los vendajes tradicionales han evolucionado, integrando biomateriales que ofrecen ventajas adicionales, como la promoción de la cicatrización acelerada, la protección contra infecciones y una mejor interacción con el tejido lesionado. Los biomateriales, al ser diseñados específicamente para integrarse con los tejidos humanos sin causar reacciones adversas, permiten desarrollar vendajes que no sólo protegen, sino que también participan activamente en el proceso de regeneración. De esta manera, el uso de biomateriales en el diseño de vendajes representa una solución innovadora y efectiva en el tratamiento de heridas complejas, mejorando la calidad de vida de los pacientes [30].

6.3. Biomateriales

Los biomateriales son materiales diseñados para interactuar con sistemas biológicos y pueden ser naturales o sintéticos. Son utilizados para mejorar, reemplazar o apoyar funciones corporales, incluyendo tejidos y órganos. Estos materiales deben ser seguros para el paciente y estar fabricados con estándares de biocompatibilidad [31], [32].

Por lo que, en cuanto a sus propiedades, para su uso en medicina, los biomateriales deben cumplir con ciertas características clave:

1. Biocompatibilidad: la capacidad de interactuar con el organismo sin causar efectos adversos. Un biomaterial biocompatible permite una integración sin dañar los tejidos circundantes y promueve una respuesta favorable [33].
2. Respuesta del organismo: esta propiedad se centra en cómo el cuerpo reacciona al material, que rara vez es completamente inerte. La interacción depende del tiempo y el propósito del material implantado, lo cual debe evaluarse para evitar reacciones inmunológicas no deseadas [33].
3. Toxicidad: los biomateriales deben ser diseñados para no liberar sustancias tóxicas al organismo. La toxicidad puede comprometer otros órganos o sistemas, por lo que es crucial que el material implantado esté libre de agentes que puedan provocar toxicidad a corto o largo plazo [33].
4. Propiedades mecánicas: dependiendo de la aplicación, un biomaterial debe tener propiedades mecánicas específicas, como resistencia a la tracción, elasticidad y durabilidad, que le permitan soportar el uso y adaptarse a las fuerzas del cuerpo humano [33].

6.3.1. Relacionados a quemaduras

1. Quitosano: este biomaterial biológico se compone de polisacáridos distribuidos aleatoriamente de B-(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, derivado de la desacetilación de la quitina, el segundo polisacárido más común en la naturaleza. Su perfil incluye características biodegradables, biocompatibles y antimicrobianas, propiedades que lo hacen ideal para la creación de biomateriales destinados a la regeneración de tejidos [34]. Además, el quitosano es beneficioso para la proliferación celular y la organización histológica del tejido. Su capacidad para bloquear las terminaciones nerviosas y facilitar la coagulación sanguínea natural ayuda a reducir el dolor del paciente [35].
2. Alginato: este polímero se usa ampliamente en aplicaciones biomédicas, como apósitos para heridas, andamios, materiales de impresión dental y quirúrgica. Se considera económico y biocompatible [35]. mantiene un ambiente fisiológicamente húmedo con infecciones bacterianas mínimas y puede absorber el exceso de líquidos de las heridas [36]. Estas propiedades convierten a los vendajes de alginato en una opción útil para la protección de heridas de piel [35].
3. Gelatina: es uno de los polímeros naturales más utilizados en la medicina y la industria farmacéutica. Su efectividad está bien documentada en el campo de la medicina regenerativa. Debido a su capacidad para fomentar la adhesión, proliferación y propagación celular, la gelatina ha mostrado eficacia en la cicatrización de heridas y se usa

ampliamente en ingeniería de tejidos [37].

6.4. Colágeno: origen y propiedades

El colágeno, debido a sus características estructurales y su abundancia en el organismo, juega un papel fundamental en la medicina regenerativa y en la ingeniería de tejidos. Su composición y propiedades fisicoquímicas le otorgan una alta capacidad de integración y biocompatibilidad, lo que lo convierte en un biomaterial esencial en aplicaciones biomédicas [38].

Representa aproximadamente el 30 por ciento de las proteínas totales y constituye el componente principal de los tejidos conectivos, como la piel, los músculos, los huesos, los tendones y los ligamentos. También se encuentra en los vasos sanguíneos, el revestimiento intestinal y otros órganos [39]. Debido a su papel esencial en la matriz extracelular, el colágeno influye significativamente en las características mecánicas, estructurales y organizativas de los tejidos, aportando a la firmeza y elasticidad de estructuras como la piel y el cartílago [38].

Por otro lado, el colágeno se destaca como uno de los biomateriales más beneficiosos en aplicaciones médicas. Su biocompatibilidad y baja inmunogenicidad lo convierten en un polímero ideal para productos biomédicos, incluyendo cosméticos y fármacos [38]. Esto lo ha llevado a ser ampliamente estudiado y utilizado en una variedad de productos, como se observa en su alta eficacia para la regeneración de tejidos y reparación de heridas [39].

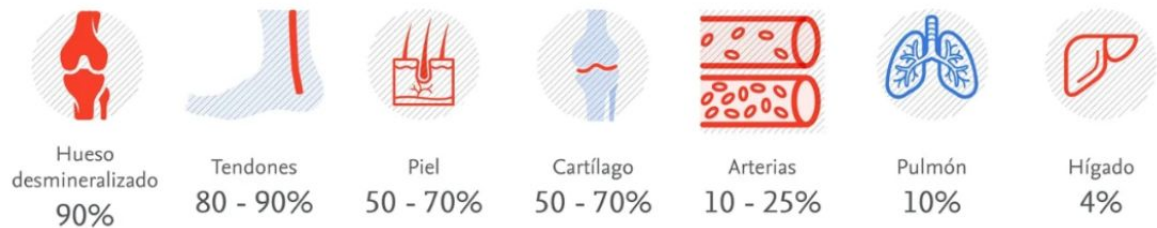


Figura 2: Porcentaje aproximado de colágeno en diferentes tejidos del cuerpo [39]

6.4.1. Tipos de colágeno

La superfamilia de proteínas del colágeno es un componente principal de las matrices extracelulares de los organismos. Dentro de esta, los colágenos IV, XV y XVIII son algunos de los tipos que se encuentran en los invertebrados. Por otro lado, en los vertebrados se han identificado aproximadamente 28 variedades de colágeno. Estas se clasifican según la composición de su cadena alfa, aunque existen cinco tipos de colágeno que son los más comunes y ampliamente estudiados [40].

El colágeno tipo I es el más prevalente, abarcando más del 90 por ciento del colágeno total en el cuerpo humano. Este tipo se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos [41]. El colágeno tipo II es abundante en la matriz del cartílago y se relaciona con varias enfermedades, como las displasias esqueléticas, la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis

(OA) [12] , [42]. A su vez, el colágeno tipo III está vinculado a problemas vasculares [43].

El colágeno tipo IV se encuentra predominantemente en la membrana basal, y es fundamental en la estructura de dicha membrana. Este tipo de colágeno se asocia con el síndrome de Alport, una enfermedad renal crónica que puede resultar de mutaciones en el colágeno tipo IV. Además, este tipo de colágeno es el más antiguo desde el punto de vista evolutivo, según estudios realizados en animales no bilaterales [41]. Finalmente, el colágeno tipo V se localiza en la matriz intersticial, los músculos, los pulmones, el hígado y la placenta [40]. Este colágeno trabaja en conjunto con el colágeno tipo I en áreas como la piel y los tendones [43].

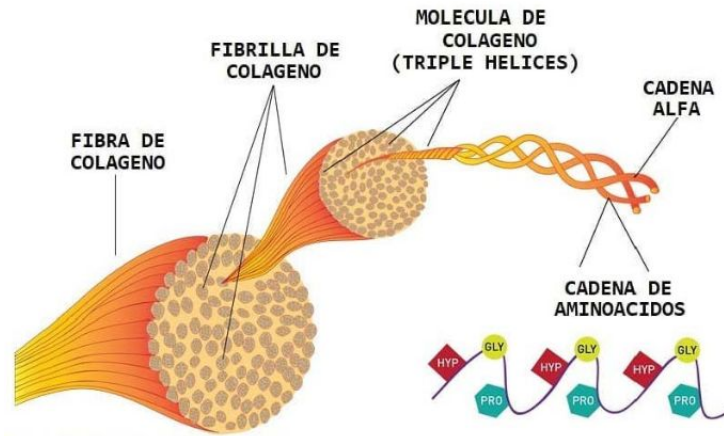


Figura 3: Porcentaje aproximado de colágeno en diferentes tejidos del cuerpo [42]

6.4.2. Fuente del colágeno

Actualmente, es posible obtener colágeno a partir de diversas fuentes naturales, como animales y vegetales, o mediante sistemas de producción de proteínas recombinantes, que incluyen bacterias, levaduras, insectos, plantas, células de mamíferos o fibrillas artificiales. Entre las fuentes animales, se destacan el colágeno humano, bovino, porcino y de origen marino, siendo estos últimos tipos de colágeno de mayor aplicación en la industria [44] [38].

El colágeno porcino, por ejemplo, se utiliza en tratamientos para la osteoporosis debido a su similitud con el colágeno humano y a que en pocas ocasiones provoca reacciones alérgicas. También se extrae colágeno tipo I de ovejas para la ingeniería de tejidos y la creación de andamios [44].

En cuanto a la comparación de las fuentes de colágeno, el colágeno marino presenta ventajas únicas frente a otros tipos, como un alto rendimiento y un riesgo bajo de transmisión de enfermedades. Además, sus cadenas de aminoácidos son más pequeñas, lo cual facilita su absorción en comparación con el colágeno de mamíferos [38] [45]. No obstante, este tipo de colágeno tiene una resistencia térmica menor, lo que limita su aplicación en ambientes con temperaturas más altas [45] [38].

Cuadro 1: Fuente de colágeno y el tipo de colágeno predominante [47]

Fuente de colágeno	Tipos de colágeno predominantes
Colágeno bovino (piel)	Tipo I y III
Colágeno porcino (piel)	Tipo I y III
Colágeno de pescado (piel, escamas)	Tipo I predominante
Colágeno de pollo (cartílago esternal)	Tipo II
Colágeno de cartílago bovino o porcino	Tipo II

Los tipos más comunes en suplementos alimenticios son el colágeno tipo I, tipo II y tipo III. Cada fuente de colágeno, como se observa en la tabla a continuación, contribuye predominantemente con uno o más tipos específicos de colágeno, utilizados tanto en suplementos como en productos cosméticos [38].

6.4.3. Uso y aplicaciones del colágeno

El colágeno se considera como una proteína versátil en el cuerpo dado a que posee una amplia gama de usos en una variedad de industrias. Dicha proteína ha jugado un papel importante en la industria cosmética, ya que se utiliza para mejorar la apariencia de la piel y combatir los signos del envejecimiento. Esto debido a que se ha comprobado que las fibras de colágeno se van dañando con el paso del tiempo, perdiendo grosor y resistencia lo que se ha relacionado fuertemente con los fenómenos de envejecimiento cutáneo, por ende, la industria cosmética ha incorporado el colágeno en diversos productos para el bienestar del usuario [46].

Asimismo, el colágeno es utilizado en grandes cantidades en la industria alimentaria, funcionando como gelificante y estabilizante en numerosos productos [46]. El colágeno también es utilizado en la industria textil con el fin de dar a las fibras y tejidos propiedades únicas, mientras que en el sector farmacéutico juega un papel importante en la creación de medicamentos y dispositivos médicos.

El colágeno, especialmente cuando se extrae de fuentes como la piel de tilapia, ha demostrado ser altamente beneficioso en el tratamiento de quemaduras debido a su biocompatibilidad y su capacidad de promover la regeneración de tejido dérmico. En el contexto de cuidado de heridas, el colágeno actúa como andamio que facilita la migración celular, lo cual es crucial para la reparación de la piel dañada. Los apósitos de colágeno pueden mantener un ambiente húmedo que previene la desecación del tejido y reduce el riesgo de infección, favoreciendo así la cicatrización. Esta propiedad es especialmente útil en quemaduras, donde el tejido está comprometido y requiere un ambiente controlado que permita la regeneración sin interferencias externas [46].

Actualmente, el colágeno puede obtenerse a partir de diversas fuentes animales y marinas. El colágeno de pescado, especialmente de la piel de tilapia, es una opción popular debido a su sostenibilidad y menor impacto ambiental. Este colágeno, además de ser accesible para individuos con restricciones religiosas o dietéticas, presenta una alta biocompatibilidad y bajo riesgo inmunológico, lo cual lo convierte en un biomaterial ideal para apósitos en quemaduras. La industria pesquera de Guatemala, rica en producción de tilapia, tiene el potencial de aprovechar este recurso como subproducto, contribuyendo a una economía cir-

cular y reduciendo los desechos ambientales [47].

Los apósitos de colágeno de tilapia, al ser aplicados en quemaduras, mantienen un ambiente húmedo que favorece la cicatrización, reduce el dolor y minimiza las infecciones. Este uso no solo ayuda a mejorar la calidad de vida de los pacientes sino que también optimiza el uso de recursos naturales, fortaleciendo la sostenibilidad en la industria pesquera de Guatemala [48].

7.1. Aislamiento de colágeno soluble en pepsina (PSC) a partir de piel de tilapia

Para la extracción del colágeno soluble en pepsina (PSC) (Merck, Alemania), la sustancia no disuelta obtenida del ácido, se recurrió a la extracción de colágeno soluble (ASC) para una extracción adicional, empleando 2 volúmenes de ácido 0.5 M el cual contiene 1.5 por ciento (p/v) de pepsina, durante 30 horas a 4 °C, con agitación constante. Los extractos fueron centrifugados a 1500×g durante 30 minutos a 4 °C, para que luego los sobrenadantes fueran separados. Los desechos se extrajeron nuevamente con ácido acético 0.5 M, el cual poseía un 1.5 por ciento (p/v) pepsina, durante 12 horas antes de ser centrifugados a 1500×g durante 30 minutos a 4 °C. Los dos sobrenadantes se fusionaron y se añadió NaCl con el objetivo de eliminar la sal hasta que la concentración final del sobrenadante llegó a 0.7 M, lo que permitió la formación de precipitaciones. Finalmente, la muestra del colágeno fue liofilizada utilizando un liofilizador (Pro Freeze Dryer, Harvest Right, Utah, USA).

7.2. Caracterización de colágeno

Para determinar el contenido de colágeno en las muestras, estas fueron hidrolizadas en ácido clorhídrico y posteriormente neutralizadas con NaOH. Una alícuota de la solución se sometió a una reacción química utilizando p-dimetilaminobenzaldehído. La absorbancia de las muestras se midió a 560 nm mediante espectrofotometría, utilizando una curva de calibración basada en concentraciones diversas de hidroxiprolina (100, 50, 10 y 1 ug/ml). Finalmente, el contenido de colágeno se calculó multiplicando la cantidad de hidroxiprolina por un factor de conversión establecido según la norma técnica colombiana NTC 3750, siendo

este de 7.46.

7.3. Descongelación de líneas celulares L929 y LAN-1

Para establecer la biocompatibilidad del colágeno liofilizado adquirido de la piel de tilapia, se llevaron a cabo ensayos in vitro con las líneas celulares L929 y LAN-1. Para lograrlo, se descongelaron las dos líneas celulares, liberándolas de sus viales de criopreservación (F-0926, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y las ubicaron en un baño de agua a 37 °C, asegurando un descongelado rápido y regulado. Luego, las células fueron transferidas a un tubo conteniendo medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich, F0926), enriquecido con suero fetal de bovino (10 por ciento FBS) y antibióticos (1 por ciento de penicilina/estreptomicina). Finalmente, se resuspendieron las células en medio fresco y se trasladaron a placas de cultivo para su incubación subsiguiente.

7.4. Conteo celular

Antes de realizar el conteo celular, fue necesario tripsinizar las células para desprenderlas del flask. Para ello, se retiró el medio DMEM de los flasks y se agregó 4 ml de tripsina previamente calentada a 37 °C. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con 5 por ciento de CO₂. A los 5 minutos, se revisó el desprendimiento celular y, posteriormente, se recolectaron las células en un tubo cónico, el cual se centrifugó a 1000 rpm a 25 °C durante 10 minutos para eliminar residuos de tripsina y otros componentes.

Para el conteo, se utilizó azul de tripano para teñir las células. Una alícuota de la suspensión celular fue colocada en la cámara de Neubauer. Durante el conteo, se registró el número de células presentes en un volumen definido de la cámara, y con esta información se calculó la concentración celular en la suspensión. Este resultado permitió determinar la cantidad total de células presentes en el volumen de la suspensión recolectada mediante:

$$\text{Células totales} = \text{Concentración celular} \left(\frac{\text{Células}}{\text{ml}} \right) * \text{Volumen Total (ml)}$$

Figura 4: Fórmula para conteo celular

La cantidad de células a sembrar en los pocillos se ajustó en función del número calculado. El objetivo era alcanzar la densidad deseada en cada pocillo. Para esto, se calculó el volumen de suspensión celular necesario para obtener la cantidad específica de células por pocillo utilizando:

$$\text{Volumen de suspensión celular (ml)} = \frac{\text{Células requeridas por pocillo}}{\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{Células}}{\text{ml}} \right)}$$

Figura 5: Fórmula para conteo celular

Cada pocillo recibió el volumen calculado de la suspensión celular, complementado con medio DMEM para completar un volumen total de 1 ml por pocillo.

7.5. Prueba para evaluar la viabilidad celular metil tiazol tetrazolio (MTT)

Se realizaron diferentes diluciones de colágeno con PBS (OmniPur, Calbiochem, Merck Millipore) para obtener concentraciones de trabajo de 1, 10, 50 y 100 g/ml. Se agregó el colágeno en sus distintas concentraciones en 8 placas de 96 pocillos redondos (BIOFLOAT, faCellitate, Merck KGaA) Las placas se incubaron a 4 °C por 24 horas con el objetivo de garantizar la adhesión del colágeno en el interior de los pocillos. Después de la incubación, se sembró 5×10^4 células/mL por pocillo de las líneas celulares L929 (4 placas) y LAN-1 (4 placas). La incubación se llevó a cabo a 37 °C en un ambiente regulado con un 5 por ciento de CO₂ durante 48 horas.

Tras 24 horas de incubación, se realizaron fotografías de las células utilizando un microscopio invertido (AE31E Motic) para registrar y examinar potenciales interacciones con el colágeno de tilapia. A las 48 horas después de la siembra de células, se llevó a cabo el ensayo del método de reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT), una prueba colorimétrica que mide la viabilidad de las células basándose en la actividad mitocondrial. Este estudio consiste en transformar MTT (un compuesto tetrazolio) en formazán, lo que produce una coloración purpúrea en células viables.

Para el experimento de MTT, se extrajo el medio de cultivo de cada pocillo y se agregó una solución de MTT en PBS (0.5 mg/mL), manteniendo las placas en incubación durante 4 horas. Después de la incubación, se retiró la solución de MTT y se agregó DMSO (100 g/mL por pocillo) con el objetivo de solubilizar el formazán. Se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Elx800, BioTek Instruments, Agilent Technologies), lo que permitió examinar el impacto de las diferentes concentraciones de colágeno (1, 10, 50 y 100 g/mL) en las dos líneas celulares. Los hallazgos se contrastaron con los pocillos de control sin colágeno con el objetivo de establecer la biocompatibilidad y seguridad del colágeno obtenido de la piel tilapia. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 10.4.0, con el cual se generaron gráficas de desviación estándar para observar la viabilidad celular de ambas líneas celulares y comparar los resultados con los pocillos de control sin colágeno.

Finalmente, se incorporaron dos placas extra de 24 pocillos con las mismas concentraciones de colágeno (1, 10, 50 y 100 g/mL) y se plantaron las líneas celulares, asignando una placa a cada línea (L929 y LAN-1). A las 24 horas de incubación, se registró la forma de las células para estudiar los impactos de las distintas concentraciones de colágeno en cada línea celular.

8.1. Aislamiento de colágeno soluble en ácido (ASC) y, posteriormente, en pepsina (PSC)

Con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad del colágeno derivado de piel de tilapia en cocultivos con las líneas celulares de fibroblastos L929 y neuroblastoma LAN-1 se realizó un proceso de aislamiento con ácido y pepsina. Para este procedimiento se pesó 52.68 gramos de piel de tilapia y se siguió el procedimiento de Hukmi y Sarbon (2018) [49]. Luego del proceso de aislamiento y de liofilización se obtuvo un total de 0.00821 gramos y una eficiencia del extracto de 0.0156 por ciento (Cuadro 1). Esto sugiere que sólo una mínima fracción del colágeno fue recuperada, indicando que el método puede requerir optimización para mejorar el rendimiento en futuras aplicaciones biomédicas.

Cuadro 2: Resultados del proceso de extracción de colágeno de piel de tilapia

Peso de la piel de tilapia (Gramos)	Peso de la piel de tilapia después de liofilización (Gramos)	Eficiencia (%)
52.68	0.00821	0.0156

8.2. Caracterización de colágeno

El objetivo de este análisis fue cuantificar el contenido de colágeno en una muestra mediante el cálculo del contenido de hidroxiprolina, siguiendo el método descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750 (ICONTEC, 1995), que establece que el contenido de colágeno es equivalente al contenido de hidroxiprolina multiplicado por un factor de 7.46. Para este propósito, se generó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de hidroxiprolina.

prolina en un rango de concentración de 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se midió la absorbancia a 560 nm. En la Figura 1, se presenta la curva de calibración obtenida, con la ecuación linealizada $y = 0.007x + 0.0335$ y un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9791$, lo cual indica un alto grado de ajuste entre los valores experimentales y el modelo lineal. Este alto R^2 confirma que el método tiene una buena precisión para fines cuantitativos, aunque posibles desviaciones menores pueden deberse a variaciones instrumentales o experimentales. Utilizando esta ecuación, se determinó la concentración de hidroxiprolina en las muestras analizadas. Por ejemplo, para una absorbancia promedio medida de 0.007, el valor de concentración de hidroxiprolina obtenido fue 0.0191 $\mu\text{g}/\text{mL}$, calculado al despejar x en la ecuación de regresión lineal. Posteriormente, el contenido de colágeno se estimó multiplicando esta concentración por el factor de conversión de 7.46, resultando en 0.142 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

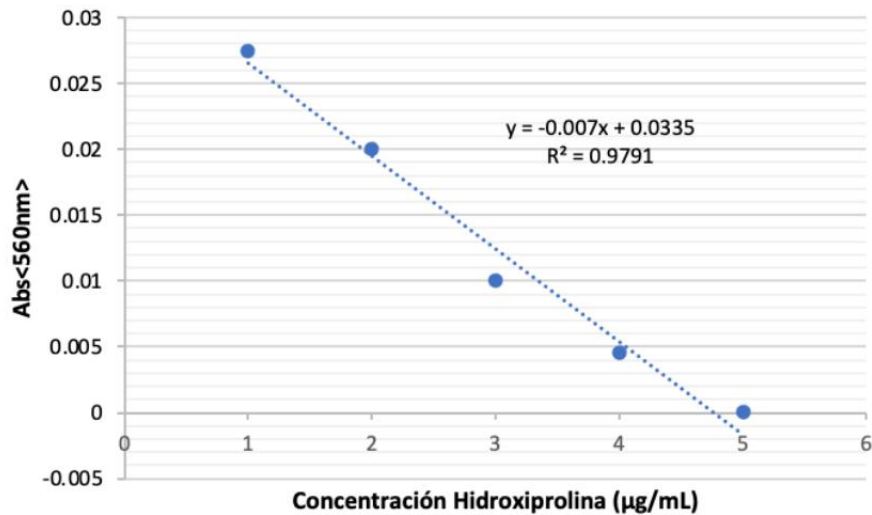


Figura 6: Curva de calibración utilizada para calcular la concentración de hidroxiprolina en muestras de colágeno

8.3. Evaluación de la biocompatibilidad del colágeno derivado de piel de tilapia con las líneas celulares L929 y LAN-1

Luego de aislar el colágeno derivado de piel de tilapia se procedió a realizar un ensayo de biocompatibilidad con la línea celular L929 y LAN-1. Brevemente, se sembró colágeno en diferentes concentraciones (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en una placa de cultivo celular y se co-cultivaron células durante cinco semanas. Se observó que ambas líneas celulares pudieron adherirse y proliferar luego de sembrarse encima del colágeno. En 24 horas de incubación (Figura 7), se observó una distribución homogénea de células y una forma regular. Sin embargo, existen diferencias entre la confluencia observada para las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

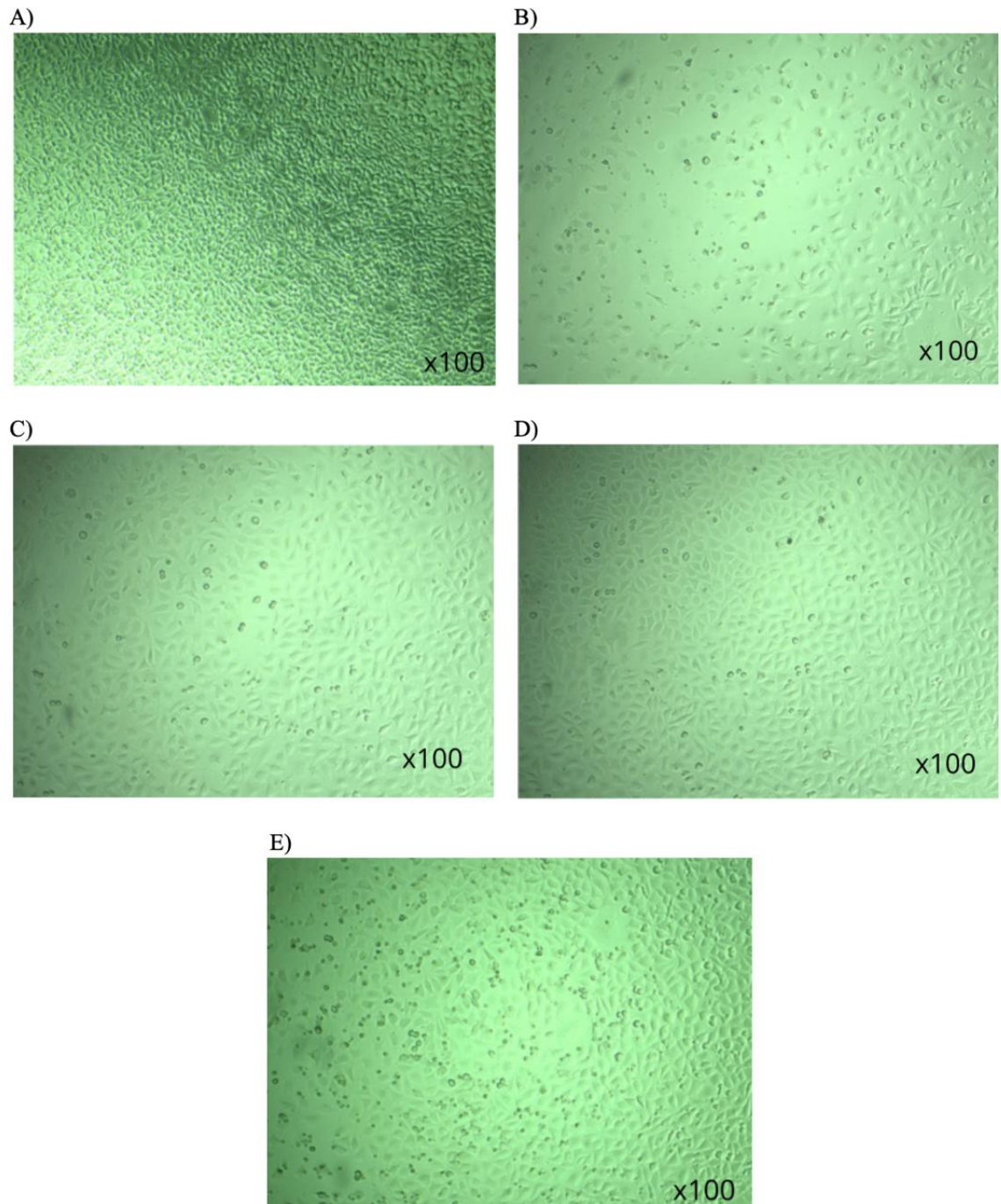


Figura 7: Línea celular L929 después de 24 horas de incubación en colágeno. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/ml de colágeno. C) Concentración de 50 ug/ml de colágeno. D) Concentración de 10 ug/ml de colágeno. E) Concentración de 1 ug/ml de colágeno

Nota: (A) 100 ml de medio DMEM + 2.10 ml de células L929, (B) 100 ug/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 2.10 ml de células L929, (C) 50 ug/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 2.10 ml de células L929, (D) 10 ug/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 2.10 ml de células L929, (E) 1 ug/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 2.10 ml de células L929.

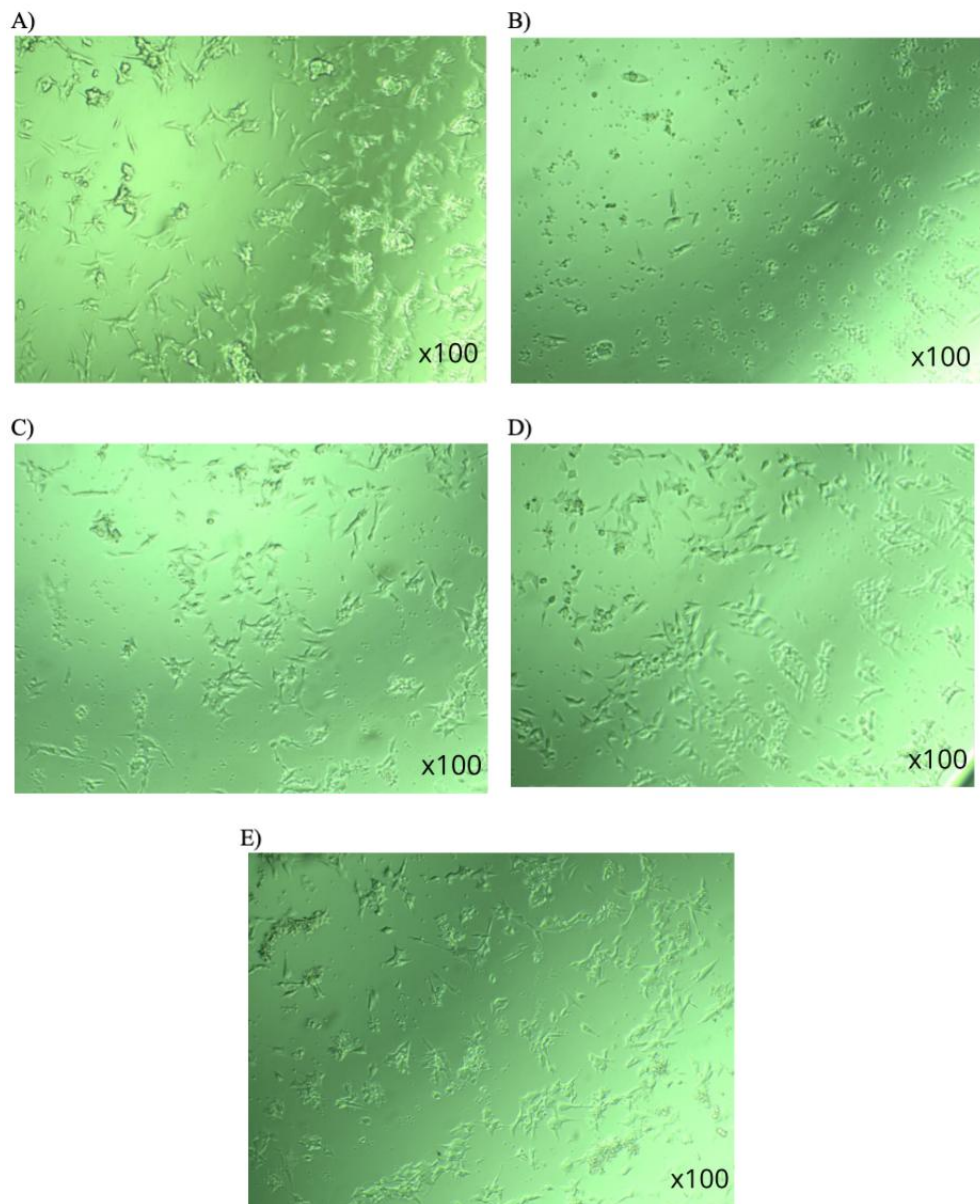


Figura 8: Línea celular LAN-1 después de 24 horas de incubación en colágeno. A) Control celular. B) Concentración de 100 µg/mL de colágeno. C) Concentración de 50 µg/mL de colágeno. D) Concentración de 10 µg/ml de colágeno. E) Concentración de 1 µg/ml de colágeno

Nota: (A) 100 ml de medio DMEM + 4.55 ml de células LAN-1, (B) 100 µg/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 4.55 ml de células LAN-1, (C) 50 µg/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 4.55 ml de células LAN-1, (D) 10 µg/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 4.55 ml de células L929, (E) 1 µg/ml de colágeno + 2.4 ml de PBS + 4.55 ml de células LAN-1.

Para la línea celular LAN-1 se observó una menor proliferación a las 24 horas con respecto a la línea celular L929 (Figura 7) utilizando los mismos conteos celulares. A pesar que las células si pudieron adherirse se observa una menor confluencia entre 30 por ciento a 5 por ciento (Figura 8). En concentraciones elevadas de colágeno (100 µg/ml y 50 µg/ml) se

puede observar menor proliferación celular (Figura 8C, 8D). Por ende, es posible determinar que la línea LAN-1 mostró una proliferación y confluencia más baja, lo que señala una reducida adhesión y expansión celular en contraste con la línea L929. Adicionalmente, a altas concentraciones de colágeno, ambas líneas celulares experimentaron una reducción en la proliferación, lo que indica que un nivel de colágeno excesivo podría restringir el crecimiento celular.

Seguidamente, se evaluó la viabilidad celular de los co-cultivos mediante a una prueba de MTT. Los co-cultivos de la línea celular L929 y el colágeno aislado de la piel de tilapia afectaron la viabilidad celular (Figura 9). Se observa que a mayor concentración, se observa una disminución significativa entre 30-40 por ciento de la viabilidad celular, especialmente para las concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno en comparación con el control. Esto sugiere que estas altas concentraciones de colágeno aislado de piel de tilapia con la metodología utilizada pueden ser tóxicas para las células L929, afectando negativamente su supervivencia. Sin embargo, a las concentraciones de 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular se mantiene similar al control, indicando que estas concentraciones son bien toleradas por las células.

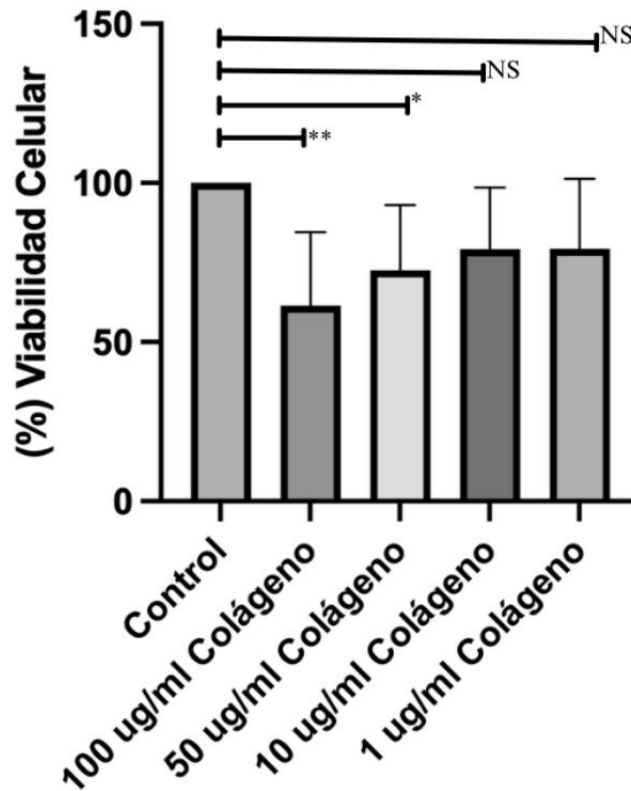


Figura 9: Desviación estándar de la viabilidad de la línea celular L929 según las concentraciones de colágeno después de realizar el ensayo MTT

Nota: Los niveles de significancia se representan como: (NS) No Significativo; * $p < 0.05$ (Significativo); ** $p < 0.01$ (Muy Significativo); *** $p < 0.001$ (Altamente Significativo). Se utilizó un valor de p de 0.05 en un análisis de dos colas.

En la Figura 10, se observa un comportamiento similar en los cocultivos de la línea celular LAN-1 con el colágeno similar a la línea L929, en donde el colágeno extraído de la piel de tilapia también influyó sobre la viabilidad celular dependiendo de su concentración. A niveles altos de colágeno, 100 ug/ml, 50 g/m y 10 ug/ml, se observa una disminución significativa de hasta 60 por ciento en la viabilidad celular con respecto al control, lo que indica un potencial impacto citotóxico de estos niveles en las células LAN-1. No obstante, en niveles de 10 y 1 g/mL de colágeno, la viabilidad celular de las células LAN-1 se observa una disminución del 20 por ciento con respecto al control al control, lo que sugiere que estas concentraciones inferiores son bien toleradas y no impactan de manera negativa en la supervivencia celular.

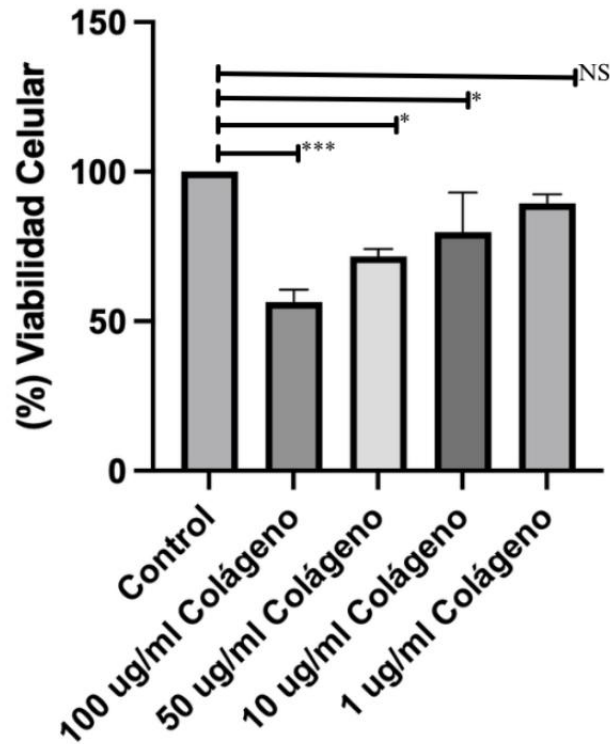


Figura 10: Desviación estándar de la viabilidad de la línea celular LAN-1 según las concentraciones de colágeno después de realizar el ensayo MTT

Nota: los niveles de significancia se representan como (NS) no significativo; * $p < 0.05$ (significativo); ** $p < 0.01$ (muy significativo); *** $p < 0.001$ (altamente significativo). Se utilizó un valor de p de 0.05 en un análisis de dos colas.

8.4. Evaluación de la morfología celular de las líneas L929 y LAN-1 en cocultivos con diferentes concentraciones de colágeno

Con el objetivo de evaluar el impacto de diferentes concentraciones de colágeno derivado de piel de tilapia sobre la morfología de la línea celular L929 y LAN-1 se procedió a hacer una evaluación utilizando un microscopio invertido a los 5 días de cocultivo con colágeno extraído de la piel de tilapia. Específicamente, se quería determinar si existían diferencias en la morfología celular al variar en la concentración influye. En condiciones de control, sin la adición de colágeno, las células L929 exhibieron una morfología característica de fibroblastos, con forma alargada y fusiforme (Figura 11a). Se observó un monocapa celular bien adherida al sustrato, con escaso espacio intercelular y núcleos ovalados en el centro de las células. En cocultivos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (Figura 11b), las células mostraron una tendencia a agruparse en cúmulos más compactos en comparación con el control. La forma celular se mantuvo alargada, pero se observó una disminución en la extensión de los procesos celulares. En 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (Figura 11c), las células presentaron una morfología similar a la observada en el control, con células alargadas y bien adheridas al sustrato. Sin embargo, se observa un ligero aumento en el tamaño celular en comparación con el grupo control. En concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 11d) de colágeno, las células mantuvieron una morfología similar a la del control, con células alargadas y bien adheridas. No se observaron cambios significativos en comparación con el grupo control. Finalmente, a la concentración más baja de colágeno, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno, las células mostraron una morfología más redondeada y menos adherida al sustrato en comparación con el control (Figura 11e). Se observó un aumento en el espacio intercelular y una disminución en la extensión de los procesos celulares.

Estos resultados sugieren que la concentración de colágeno en el medio de cultivo tiene un impacto sobre la morfología de las células L929, y apoya lo observado en el ensayo de MTT. A mayor concentración de colágeno (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promueve la formación de cúmulos celulares y una disminución en la extensión de los procesos celulares, lo que podría indicar una mayor adhesión entre las células y una menor interacción con el sustrato. Por otro lado, las concentraciones intermedias (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no produjeron cambios drásticos en la morfología celular en comparación con el control, sugiriendo que estas concentraciones podrían ser óptimas para el crecimiento y proliferación de estas células. Finalmente, la concentración más baja de colágeno (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultó en una morfología celular más redondeada y menos adherida, lo que podría indicar condiciones subóptimas para el crecimiento celular.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de colágeno derivado de piel de tilapia sobre la viabilidad de las células L929 y LAN-1, analizando el porcentaje de células vivas y muertas en cada condición utilizando azul de tripano. En la línea celular LAN-1, el control mostró un 64 por ciento de células vivas frente a un 36 por ciento de células muertas. A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hubo una disminución con un 40 por ciento de células vivas y un 60 por ciento de muertas, mientras que a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó una mayor viabilidad, con un 67 por ciento de células vivas y un 33 por ciento de muertas. A concentraciones más bajas de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el porcentaje de células vivas aumentó ligeramente. En cuanto a las células L929, el control mostró un 83 por ciento de células vivas frente a un 17 por ciento de muertas. A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se observó una decadencia con un 57

por ciento de células vivas y un 33 por ciento de muertas. Sin embargo, a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hubo un notable aumento en el porcentaje de células vivas (66 por ciento) en comparación con las muertas (34 por ciento), lo que sugiere un posible efecto citotóxico a concentraciones altas. A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, los porcentajes de células vivas fueron del 62 por ciento y 78 por ciento respectivamente, con menos muertes celulares, indicando que estas concentraciones bajas favorecen una viabilidad similar al control. En conclusión, los resultados indican que concentraciones bajas de colágeno (1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) son más compatibles con la viabilidad de ambas líneas celulares, especialmente LAN-1, al reducir el porcentaje de células muertas y mantener un balance favorable de viabilidad celular.

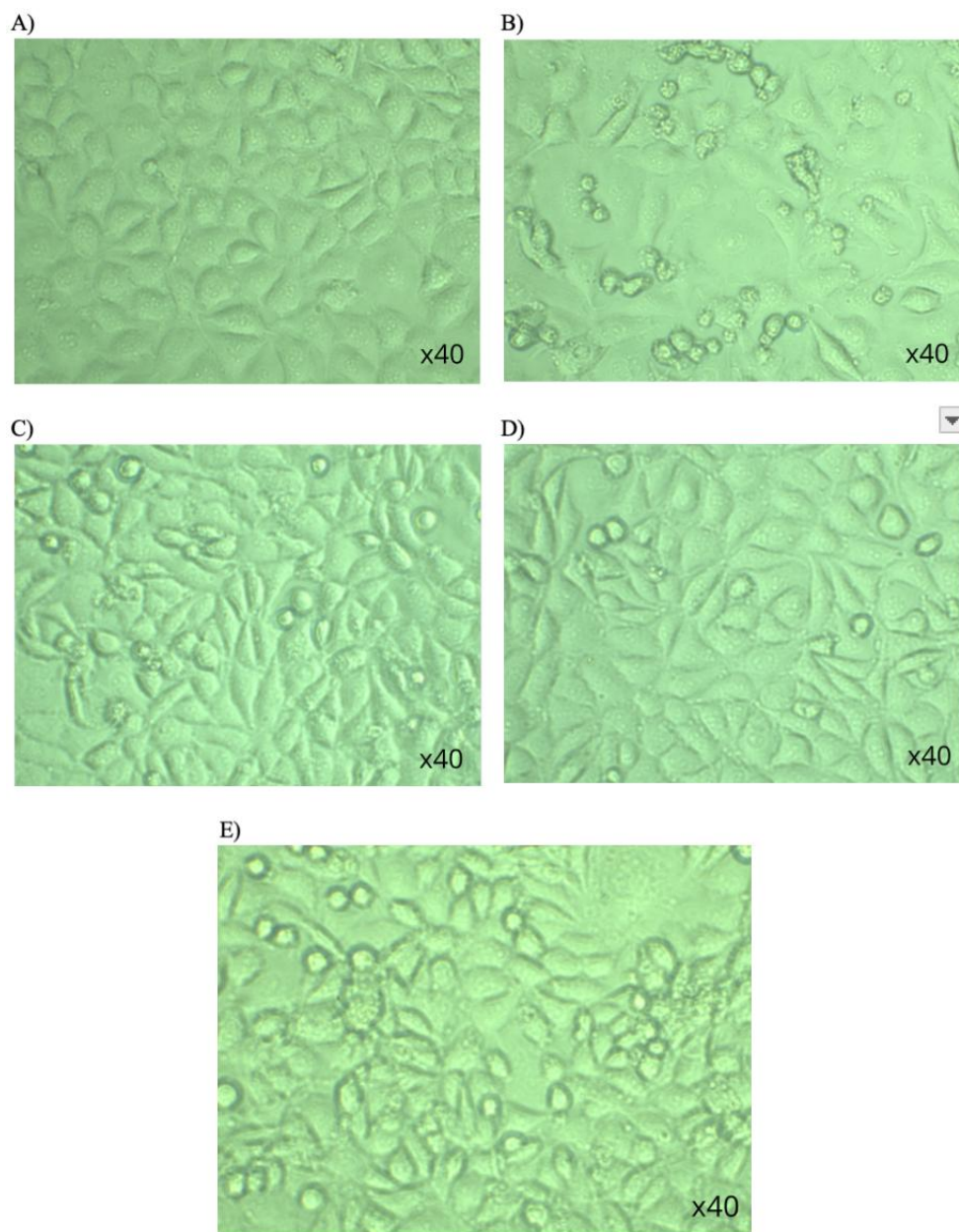


Figura 11: Morfología de línea celular L929. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/ml de colágeno. C) Concentración de 50 ug/ml de colágeno. D) Concentración de 10 ug/ml de colágeno. E) Concentración de 1 ug/ml de colágeno

Asimismo, se evaluó de igual forma la morfología de la línea celular LAN-1 en cocultivos con diferentes concentraciones de colágeno (1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con un control sin colágeno. En la figura 12a se observa la morfología de la línea celular LAN-1 en donde se observa una forma redondeada ligeramente elongada y la presencia de múltiples neuritas cortas y finas. Las células se observaron adheridas al sustrato y formando pequeños agregados. Mientras que a concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó una marcada disminución en la cantidad de la estructura similar a neuritas por célula en comparación con el control

(Figura 12b). Las células adoptaron una forma más redondeada y presentaron un aspecto más compacto. Además, se observó una tendencia a la formación de agregados celulares más grandes y densos. En la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12c) se observó que algunas células estaban desadheridas y su forma redonda sugieren el inicio de la apoptosis. Siendo un efecto similar al observado en la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células mostraron una disminución en la longitud y número de neuritas en comparación con el control, pero en menor medida que a la concentración más alta. En concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12d) la morfología celular se asemejó más al control, con células presentando múltiples neuritas y formando agregados de tamaño moderado. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la longitud de las neuritas en comparación con el control. Finalmente, en concentración más baja de colágeno, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la morfología celular fue muy similar al control, sin diferencias significativas en la forma celular o número o longitud de las neuritas (Figura 12e).

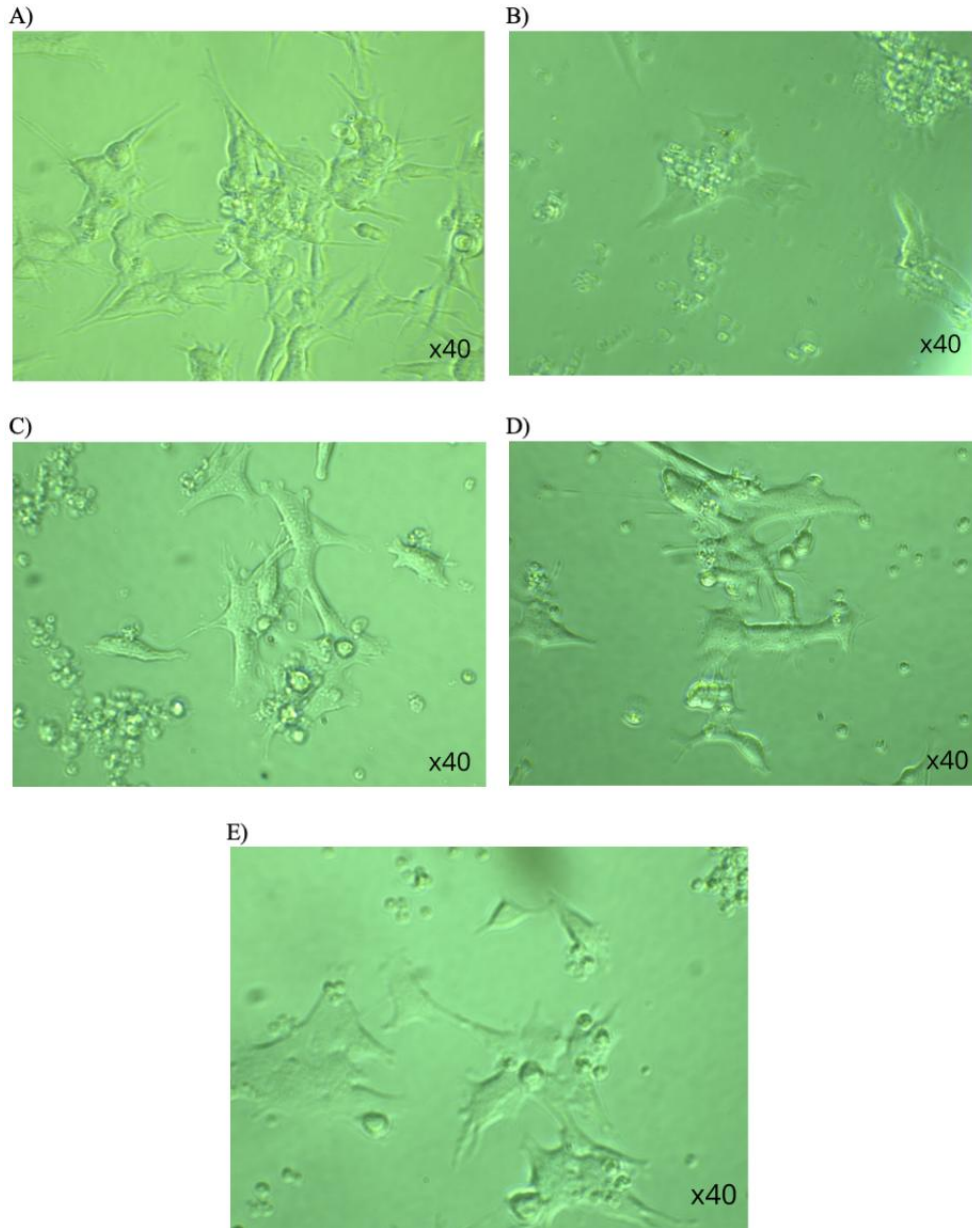


Figura 12: Morfología de línea celular LAN-1. A) Control celular. B) Concentración de 100 ug/mL de colágeno. C) Concentración de 50 ug/mL de colágeno. D) Concentración de 10 ug/mL de colágeno. E) Concentración de 1 ug/mL de colágeno

Las muertes relacionadas a quemaduras han aumentado a nivel mundial, específicamente en países en vías de desarrollo. Las quemaduras graves causan desvitalización del tejido, exudados y proliferación de microorganismos, lo que hace crucial el uso de terapia húmeda con apósitos oclusivos. Los apósitos deben elegirse según las necesidades específicas de cada quemadura, ya que facilitan la cicatrización. El colágeno se utiliza frecuentemente como apósitos para la curación de heridas. El colágeno utilizado en apósitos se obtiene generalmente de extractos de piel de vacas, cerdos o peces. Sin embargo, el uso de colágeno animal en apósitos para heridas presenta la desventaja del riesgo de desencadenar ciertos riesgos secundarios y su obtención puede llegar a ser difícil. La piel de tilapia ofrece ser una alternativa a considerar debido a que su cultivo ha aumentado en países en vías de desarrollo y la piel se descarta fácilmente. Además, se ha evidenciado que existe cierto grado de compatibilidad con la piel de tilapia y los humanos [50], lo cual hace que sea una alternativa a considerar.

En este estudio se utilizó a la piel de tilapia como fuente de colágeno. Se trabajó con una extracción por medio de ácidos y pepsina propuesto por Hukmi y Sarbon (2018) [49] para tener un producto más puro. Esta metodología se llevó a cabo para eliminar proteínas no colagenosas y grasas, a manera de aumentar la pureza del colágeno para su uso en aplicaciones biomédicas, en donde la biocompatibilidad y estabilidad son críticas [51]. Estos resultados concuerdan con la observación que enfatiza la importancia de eliminar proteínas no colagenosas para incrementar la biocompatibilidad del colágeno y reducir el riesgo de reacciones adversas en el organismo, como inflamación o rechazo [52]. El colágeno es una proteína predominante en los tejidos conectivos, reconocida por su resistencia y flexibilidad, lo cual la convierte en un biomaterial esencial para aplicaciones médicas [41]. La preservación de la triple hélice del colágeno es fundamental para mantener sus propiedades mecánicas y su capacidad de formar fibrillas, lo cual es esencial para su función en los tejidos conectivos [41]. Asimismo, la teoría respalda que la eliminación de proteínas no colagenosas incrementa la estabilidad térmica y la resistencia del colágeno, lo cual es fundamental para su uso en

la ingeniería de tejidos y la curación de heridas, donde el colágeno sirve como matriz que facilita la adhesión, proliferación y diferenciación de células [52], [53]. En la cicatrización de heridas, el colágeno purificado crea un entorno propicio para la regeneración del tejido, proporcionando protección contra infecciones y acelerando la recuperación, lo que refuerza su eficacia en aplicaciones biomédicas. En este estudio no evaluamos la presencia de otras proteínas no colágenas ni de los residuos de grasa, sin embargo, se pudo haber realizado un SDS page para evaluar los residuos de estas proteínas [54] y también un análisis para observar grasas residuales mediante el método de Soxhlet, que es un procedimiento ampliamente utilizado para la extracción de lípidos o grasas de muestras biológicas. En este proceso, se utiliza un disolvente orgánico, como el éter de petróleo, que disuelve las grasas presentes en la muestra de colágeno. La muestra, previamente secada y pesada, se coloca en una celda de extracción, donde el disolvente caliente pasa a través de la muestra, extrayendo las grasas. El disolvente y las grasas se condensan y regresan al matraz, donde se repite el ciclo varias veces para garantizar una extracción completa. Al finalizar, se evapora el disolvente, dejando solo las grasas extraídas, las cuales se cuantifican por pesaje. Este procedimiento es efectivo y permite identificar y cuantificar las grasas residuales, lo que puede ser relevante para evaluar la pureza del colágeno en aplicaciones biomédicas [55].

El uso de ácidos en la extracción pueden alterar la estructura y propiedad del colágeno, específicamente su gelatinización. Debido a que en este estudio se utilizó ácido acético se puede inferir qué pudo haber afectado tanto a proteínas no colágenas como al colágeno, principalmente en su viscosidad y elasticidad original en el tejido conectivo. Para esto se pudo haber realizado un ensayo de viscosidad para medir cómo la extracción con ácido influye en la fluidez del colágeno, y un ensayo de elasticidad para observar cómo cambia su capacidad para recuperar su forma original después de una deformación. Estos análisis permitirían cuantificar el impacto de la desnaturalización del colágeno sobre sus propiedades mecánicas. Un ensayo comúnmente utilizado para evaluar la viscosidad y elasticidad del colágeno es el análisis reología, que mide la respuesta del material a fuerzas aplicadas, proporcionando información sobre su comportamiento bajo estrés [56].

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con ácidos orgánicos como el acético induce la ruptura de los enlaces peptídicos expuestos en la superficie de las fibras de colágeno, lo que resulta en una disminución de la interacción entre las moléculas de colágeno y, por consiguiente, en una reducción de la viscosidad [56]. Además de la posible reducción de la viscosidad, podría haberse observado una mejora en la pureza del colágeno obtenido. La eliminación de las impurezas proteicas no colágenas, como las elastinas y las glicoproteínas, podría deberse a la solubilización selectiva de estas proteínas en el medio ácido. Esta purificación parcial del colágeno se supone que es fundamental para garantizar su biocompatibilidad y minimizar el riesgo de reacciones inmunológicas adversas en aplicaciones biomédicas [41]. Sin embargo, no se cuenta con pruebas directas que respalden que dicha eliminación ocurra de manera efectiva. La presencia de impurezas proteicas en el colágeno podría inducir una respuesta inflamatoria y afectar negativamente la cicatrización de heridas [57]. Para evaluar este efecto, sería útil realizar análisis adicionales, como la caracterización de las impurezas remanentes tras el proceso de extracción, para obtener evidencia que confirme o refute esta hipótesis.

El proceso de aislamiento de colágeno soluble en pepsina (PSC) podría haber resultado en la obtención de un producto con una estructura colágena visible y uniforme. El rendi-

miento del proceso fue bajo y poco satisfactorio, obteniéndose un total de 0.00821 gramos de PSC con una eficiencia baja de 0.0156 por ciento, lo que indica una eficiencia baja en la extracción, la cual pudo haber sido influenciada por factores como la concentración insuficiente de pepsina, el tiempo de incubación corto, la temperatura subóptima durante el proceso o la presencia de impurezas que interfieren con la solubilización del colágeno. En este estudio se implementó un segundo paso de purificación utilizando pepsina. La pepsina es una endopeptidasa específica que detecta los enlaces peptídicos del lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), hidroliza selectivamente las regiones telopeptidas del colágeno, incrementando así su solubilidad en soluciones ácidas [51]. Este aumento en la solubilidad es fundamental para la incorporación del colágeno en sistemas biológicos y para su posterior procesamiento.

El valor obtenido para la concentración de colágeno en las escamas de tilapia, calculado mediante la ecuación de regresión lineal, fue de 0.142 g/mL. Este resultado se determinó multiplicando la concentración de hidroxiprolina obtenida experimentalmente (0.0191 g/mL) por el factor de conversión 7.46, establecido en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750. Este factor es ampliamente utilizado para estimar el contenido de colágeno en tejidos biológicos debido a su relación comprobada entre la cantidad de hidroxiprolina y el contenido total de colágeno [58]. El valor teórico de colágeno esperado en este caso se encuentra en un rango aproximado de 0.1 a 0.2 g/mL, de acuerdo con estudios realizados en tejidos similares, como escamas de tilapia y otros tejidos animales [50]. Por lo tanto, el valor obtenido es coherente con los reportados en la literatura, lo que respalda la validez del procedimiento experimental y la precisión de los resultados. La correcta aplicación del método descrito en la NTC 3750 y el ajuste adecuado de la curva de calibración con un coeficiente de determinación $R^2=0.9791$ son elementos clave que aseguran la fiabilidad de los datos obtenidos entre los experimentales y teóricos. Cabe destacar que otros estudios han reportado rangos similares al obtenido en este trabajo. Por ejemplo: López et al. (2018) [50] encontraron concentraciones de colágeno en escamas de pescado de 0.12 a 0.18 g/mL, dependiendo del tipo de preparación y purificación utilizada. López et al. (2008) [59], en un estudio sobre tejidos biológicos, identificaron valores en el rango de 0.1 a 0.25 g/mL para muestras similares a las utilizadas en este análisis. En un análisis de tejidos biológicos no procesados, Ikoma et al. (2003) [60] reportaron un rango promedio de 0.1 a 0.2 g/mL. El valor obtenido (0.142 g/mL) se encuentra dentro del rango esperado, lo que demuestra que el procedimiento experimental fue aplicado correctamente y que la muestra analizada tiene un contenido de colágeno que es representativo de este tipo de tejido. Además, el uso del factor de conversión 7.46 ha demostrado ser un método confiable para la cuantificación en este tipo de análisis, como lo han validado estudios mencionados anteriormente [58].

Los cocultivos de líneas celulares con colágeno mostraron cambios en la morfología de las líneas L929 y LAN-1. Las imágenes de microscopía óptica (Figura 11) muestran claramente que las células L929 cultivadas en presencia de 50 y 10 g/ml de colágeno presentan una morfología más extendida y una mayor densidad celular en comparación con las células cultivadas en concentraciones más altas. Las células se adhieren firmemente al sustrato y forman una monocapa celular más homogénea, lo que sugiere una mejor viabilidad y proliferación. Estos resultados son consistentes con los datos del ensayo MTT y con estudios previos que han demostrado que una mayor concentración de colágeno proporciona un mayor número de sitios de adhesión para las células, favoreciendo la formación de focos adhesivos y la activación de las vías de señalización involucradas en la proliferación celular. En particular,

el estudio de Madsen et al. (2014) [61] indicó que las concentraciones intermedias o bajas de colágeno favorecen la adhesión celular y mejoran la formación de una estructura homogénea en cultivos celulares. De manera similar, en el trabajo de Pham et al. (2015) [62] se observó que el colágeno, a concentraciones óptimas, promovió la adhesión y migración celular, lo cual es crucial para procesos como la cicatrización de heridas. Sin embargo, es importante considerar la posibilidad de que existan concentraciones óptimas de colágeno para cada tipo celular y aplicación, y que concentraciones excesivamente altas puedan inhibir la movilidad celular y afectar la diferenciación [63].

Las micrografías de las células LAN-1 expuestas a distintas concentraciones de colágeno (Figura 12) revelan patrones de crecimiento y morfología celular sorprendentemente heterogéneos. Es particularmente llamativo el contraste entre las células cultivadas en presencia de 100 g/ml (Figura 12B) y 1 g/ml (Figura 12E) de colágeno, en comparación con el control (Figura 12A). Las células cultivadas en presencia de 100 g/ml de colágeno exhiben un cambio drástico en su morfología, adoptando una forma más redondeada y circular, con una menor adhesión al sustrato y una disminución en la formación de prolongaciones celulares. Este fenómeno contrasta marcadamente con las células de control, que presentan una morfología más extendida y aplanada, característica de células adheridas y proliferantes. Este cambio morfológico sugiere una alteración en la capacidad de las células LAN-1 para interactuar con el sustrato de colágeno a altas concentraciones. En el contexto del neuroblastoma, se ha observado que estas células pueden no crecer adecuadamente en presencia de colágeno debido a la falta de una matriz extracelular que favorezca su proliferación en el entorno del sistema nervioso central (SNC). En el SNC, el colágeno es escaso comparado con otros tejidos, lo que podría interferir con la habilidad de las células del neuroblastoma para adherirse y proliferar en cultivos tridimensionales o en presencia de altas concentraciones de colágeno, como se ha sugerido en estudios previos sobre la interacción entre células de neuroblastoma y la matriz extracelular [63]. Esta limitación en la interacción con el colágeno podría estar relacionada con el entorno específico del SNC, que carece de las cantidades adecuadas de colágeno para facilitar el crecimiento celular. Es posible que la alta densidad de fibras de colágeno en este entorno dificulte la formación de adhesiones focales estables y la reorganización del citoesqueleto, lo que a su vez podría inhibir la señalización celular necesaria para la proliferación y migración [64]. Por otro lado, las células cultivadas en presencia de 1 g/ml de colágeno también muestran una morfología alterada en comparación con el control. En este caso, las células tienden a agruparse y formar cúmulos, sugiriendo una posible disminución en la adhesión celular individual. Esta observación podría estar relacionada con la escasez de sitios de unión para las integrinas en un entorno con baja concentración de colágeno, lo que limita la capacidad de las células para establecer contactos focales estables [65]. Los resultados obtenidos sugieren que tanto el exceso como la escasez de colágeno pueden tener efectos adversos sobre la morfología y comportamiento de las células LAN-1. La concentración óptima de colágeno para promover una adhesión y proliferación celular adecuadas parece estar en un rango intermedio.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la concentración de colágeno tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de las células L929. Las células expuestas a concentraciones de 100 g/ml de colágeno mostraron una disminución significativa en su viabilidad en comparación con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que altas concentraciones de colágeno pueden inducir estrés celular y, eventualmente, la muerte celular con la metodología de extracción utilizada. Este fenómeno ha sido reportado previamente en otros

estudios y se atribuye a diversos mecanismos, como la generación de especies reactivas de oxígeno, la alteración de la adhesión celular y la disrupción de la matriz extracelular [65]. Por otro lado, las células cultivadas en concentraciones más bajas de colágeno (50, 10 y 1 g/ml) mostraron una viabilidad similar al grupo control, indicando que estas concentraciones son bien toleradas por las células L929. Estos resultados sugieren que existe un rango óptimo de concentración de colágeno para promover la supervivencia y proliferación celular. La capacidad del colágeno para modular la viabilidad celular tiene implicaciones importantes en diversas aplicaciones biomédicas, como la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas.

Los resultados de evaluación de morfología obtenidos (Figura 12) confirman lo observado en la prueba MTT para la línea celular LAN-1 en donde esta presenta una sensibilidad diferencial a las distintas concentraciones de colágeno en comparación con la línea celular L929. A una concentración alta de colágeno (100 µg/ml), ambas líneas celulares evidencian una disminución significativa en la viabilidad, con una reducción más marcada en LAN-1. A una concentración intermedia (50 µg/ml), la viabilidad de LAN-1 sigue siendo afectada significativamente, aunque en menor medida que a 100 µg/mL, mientras que la línea L929 experimenta una reducción menos pronunciada. En 10 µg/mL de colágeno, las células LAN-1 muestran una disminución altamente significativa en su viabilidad, mientras que esta concentración tiene un impacto menos severo en la línea L929. Finalmente, a la concentración más baja de colágeno (1 µg/ml), no se observa una diferencia significativa en la viabilidad celular de LAN-1, lo cual es consistente con la respuesta observada en L929 en esta misma concentración. Estos hallazgos sugieren que las células LAN-1 son más sensibles a cambios en la concentración de colágeno, requiriendo un rango estrecho de concentraciones óptimas para mantener su viabilidad. Esta mayor sensibilidad podría estar relacionada con diferencias en la expresión de receptores de adhesión, como las integrinas, o en la organización del citoesqueleto, lo que afectaría la capacidad de estas células para interactuar con la matriz extracelular y recibir señales de supervivencia [64]. Además, las células LAN-1 podrían tener necesidades nutricionales y metabólicas específicas, como una mayor demanda de nutrientes o factores de crecimiento, o una mayor sensibilidad a cambios en el pH o la osmolaridad del medio, factores que en conjunto podrían explicar su elevada sensibilidad a variaciones en la concentración de colágeno.

El ensayo de exclusión con azul de tripano permitió evaluar la viabilidad celular de las líneas LAN-1 y L929 en presencia de diferentes concentraciones de colágeno. Este colorante vital se une a las proteínas intracelulares de las células con membranas dañadas, lo que permite diferenciar entre células vivas y muertas. Los resultados obtenidos indican que la concentración de colágeno puede afectar la viabilidad celular, siendo la línea celular LAN-1 más sensible a los cambios en la concentración de colágeno en comparación con la línea celular L929. La disminución de la viabilidad celular observada en algunas condiciones puede estar relacionada con diversos factores, como la formación de agregados celulares, la alteración de la adhesión celular o la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por el colágeno. Estudios previos han demostrado que concentraciones elevadas de colágeno pueden inducir estrés oxidativo y apoptosis en células cultivadas [12]. Es importante destacar que en este estudio se utilizó el azul de tripano como colorante vital, ya que el azul de metileno no estaba disponible. Aunque ambos colorantes se utilizan comúnmente para evaluar la viabilidad celular, el azul de tripano es más específico para detectar células con membranas dañadas.

La morfología de la línea celular L929 sugiere que la concentración de colágeno en el medio afecta su comportamiento y morfología (Figura 11). Al analizar las micrografías, se observa que las concentraciones más altas de colágeno (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inducen la formación de cúmulos celulares y una disminución en la extensión de los procesos celulares, lo que sugiere una alteración en los mecanismos de adhesión, migración celular y el inicio de la apoptosis. La apoptosis, o muerte celular programada, puede ser inducida por la alteración en las interacciones de las células con la matriz extracelular. Se ha demostrado que la matriz extracelular, incluida el colágeno, inhibe la apoptosis de las células adheridas a través de mecanismos dependientes de NF-kappaB, lo que promueve la supervivencia celular [66]. Sin embargo, en concentraciones elevadas de colágeno, las células pueden perder la capacidad de mantener una adhesión adecuada, lo que podría activar vías apoptóticas. Estas concentraciones elevadas también alteran la dinámica de la adhesión celular, lo que puede llevar a la activación de cascadas de señalización apoptótica [67]. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que han demostrado que concentraciones excesivas de colágeno pueden inhibir la proliferación celular y promover la formación de una matriz extracelular densa y rígida, lo que restringe la movilidad celular [65]. Por otro lado, las concentraciones intermedias de colágeno (50 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) favorecieron una morfología celular similar a la del control, indicando que estas concentraciones podrían proporcionar un microambiente óptimo para el crecimiento y proliferación de las células L929. A pesar de la baja concentración de colágeno (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las células muestran una viabilidad alta, lo cual indica que la cantidad de colágeno es suficiente para mantener la supervivencia celular. Sin embargo, la morfología observada es más redondeada y menos adherida, lo que sugiere que, aunque las células permanecen viables, su interacción con la matriz extracelular es limitada. Esto podría estar relacionado con una menor disponibilidad de sitios de unión para las integrinas, lo cual reduce la capacidad de las células para formar contactos focales fuertes y organizar su citoesqueleto de forma óptima [64]. Estos resultados enfatizan la importancia de optimizar la concentración de colágeno en los cultivos celulares para obtener una morfología y función celular adecuadas, lo cual es fundamental para el éxito de diversos estudios *in vitro*, como la ingeniería de tejidos y los modelos de enfermedad

Los resultados obtenidos en este estudio (Figura 12) evidencian que la concentración de colágeno en el medio de cultivo afecta la morfología y comportamiento de las células LAN-1. Las células LAN-1 son derivadas del sistema nervioso central, lo que plantea consideraciones importantes sobre el entorno celular y la disponibilidad de colágeno en este tejido. A diferencia de otros tejidos, el sistema nervioso central (SNC) tiene una cantidad limitada de colágeno, especialmente en la matriz extracelular, que juega un papel crucial en la regulación de la migración y proliferación celular. Estudios previos han demostrado que la matriz extracelular, incluida la presencia de colágeno, influye en el comportamiento celular. En el caso del SNC, las altas concentraciones de colágeno pueden inhibir la proliferación celular y la migración, ya que este exceso podría alterar las interacciones celulares normales y modificar la arquitectura de la matriz extracelular, lo que a su vez limita la capacidad de las células para crecer y diferenciarse adecuadamente [68]. Además, se ha observado que la densidad de colágeno puede regular la respuesta inmunitaria, lo que implica que en un entorno con colágeno más denso, las células pueden experimentar una activación o inhibición de rutas de señalización, afectando su capacidad para realizar funciones normales como la proliferación y la migración [64]. Estos resultados pueden ser relevantes al analizar cómo las células LAN-1, derivadas del SNC, responden a diferentes concentraciones de colágeno [68]. Al analizar las micrografías, se observa que las concentraciones más altas de colágeno

(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inducen una disminución marcada en la longitud y número de neuritas, así como una tendencia a la formación de agregados celulares más compactos. Estos hallazgos sugieren que altas concentraciones de colágeno pueden interferir con los procesos de neuritogénesis y afectar la adhesión celular, lo que podría estar relacionado con alteraciones en la organización del citoesqueleto y en la dinámica de los microtúbulos, fundamentales para el crecimiento y extensión de las neuritas [69]. Por otro lado, las concentraciones intermedias de colágeno (50 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron un efecto menos pronunciado, sugiriendo que estas concentraciones podrían proporcionar un microambiente más favorable para el mantenimiento de la morfología neuronal. Sin embargo, la concentración más baja de colágeno (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no mostró diferencias significativas en comparación con el control, lo que indica que una cantidad mínima de colágeno es necesaria para sustentar la adhesión y morfología neuronal.

El proceso de extracción enzimática utilizando enzimas proteolíticas resultó ser un método efectivo y eficiente para aislar colágeno de la piel de tilapia. Este método no sólo permite la recuperación de colágeno en cantidad adecuada, sino que además mantiene intactas sus propiedades estructurales, como la disposición fibrilar y la integridad de las proteínas. La elección de este método responde a la necesidad de obtener un colágeno que sea funcionalmente viable para aplicaciones biomédicas, dado que los tratamientos enzimáticos reducen impurezas sin comprometer la calidad del colágeno. En conclusión, este procedimiento garantiza que el colágeno aislado tenga potencial para aplicaciones en ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas, cumpliendo con los requisitos de calidad y pureza necesarios.

Mediante observaciones microscópicas, se logró examinar con detalle la interacción entre las células L929 y LAN-1 y el colágeno extraído de piel de tilapia. Se evidenció que ambas líneas celulares son capaces de adherirse de manera efectiva y distribuirse adecuadamente sobre la matriz de colágeno, lo cual indica que este material proporciona un entorno biológicamente compatible. La estructura fibrilar del colágeno actuó como una matriz tridimensional, facilitando la proliferación y disposición uniforme de las células, lo cual es un indicativo positivo para su uso en la ingeniería de tejidos. Este comportamiento sugiere que el colágeno de tilapia podría usarse como un biomaterial para la regeneración celular en heridas, ya que puede sostener la estructura celular de manera similar al tejido natural, promoviendo una cicatrización más eficiente.

Los ensayos de biocompatibilidad realizados mediante el método MTT y la tinción con Azul de Tripiano mostraron resultados prometedores, evidenciando que el colágeno en concentraciones medias, no presenta toxicidad para las células L929 y LAN-1. Estos ensayos confirmaron que las células mantenían su viabilidad y actividad metabólica sobre el colágeno, lo que sugiere que este biomaterial es seguro y compatible con el crecimiento celular. Esta característica es esencial para su aplicación en curación de heridas, ya que un biomaterial biocompatible minimiza el riesgo de reacciones adversas y facilita la integración del material en los tejidos del paciente. Además, los resultados respaldan la idea de que el colágeno de tilapia podría actuar como una plataforma de soporte para la regeneración ce-

lular, favoreciendo no solo la cicatrización sino también la recuperación funcional del tejido dañado.

Para determinar completamente la biocompatibilidad del colágeno de tilapia, es imprescindible ampliar los ensayos a diversas clases de líneas celulares, tales como fibroblastos humanos (como la línea celular HFF-1) y queratinocitos (HaCaT), puesto que estas células juegan un rol vital en la cicatrización y regeneración cutánea. Analizar la reacción de estas células proporcionará una perspectiva más integral acerca del comportamiento del colágeno en un entorno parecido al de la piel humana. Adicionalmente, investigaciones con células de sistemas inmunológicos, tales como macrófagos (THP-1) y células dendríticas, pueden contribuir a comprender si el colágeno desencadena alguna reacción inflamatoria o inmunitaria. Igualmente, es crucial llevar a cabo investigaciones en vivo en modelos animales, como ratones o cerdos, cuyos sistemas de piel son parecidos a los humanos en cuanto a estructura y proceso de cicatrización. Estas investigaciones posibilitarán la valoración de la incorporación del colágeno en los tejidos y examinar su biodegradabilidad, biocompatibilidad y efecto a largo alcance. Además, ofrecerán datos acerca de la habilidad del colágeno para fomentar la cicatrización en contextos reales, como lesiones o quemaduras, y de su habilidad para incorporarse a la matriz extracelular natural sin causar efectos nocivos.

Ya que el colágeno de tilapia ha demostrado una estructura y biocompatibilidad alentadoras, investigar su aplicación en hidrogeles y andamios representa una oportunidad significativa para usos en medicina regenerativa y curación de heridas. Los hidrogeles hechos de colágeno podrían ser perfectos para usos en quemaduras, dado que poseen una gran capacidad para absorber líquidos, lo que contribuye a mantener la herida húmeda y simplifica el proceso de curación. Además, los hidrogeles pueden funcionar como medios para la liberación regulada de medicamentos, tales como antibióticos o factores de crecimiento, lo que mejora la recuperación del tejido perjudicado. Para los andamios de ingeniería tejidos, es esencial llevar a cabo ensayos de resistencia mecánica y elasticidad, ya que estos materiales deben resistir las fuerzas y tensiones que se encuentran en los tejidos del cuerpo. El colágeno necesita mantener su integridad estructural y ofrecer un respaldo apropiado para la proliferación y diferenciación celular, facilitando de esta manera la regeneración de tejidos como la piel, el cartílago o el hueso. Adicionalmente, se aconseja valorar la habilidad del colágeno para absorber agua y su estabilidad bajo condiciones fisiológicas, dado que estos elementos

influyen directamente en su habilidad para integrarse y mantener el crecimiento celular de forma correcta.

Teniendo en cuenta que el colágeno de tilapia es asequible y una fuente bastante abundante, investigar colágenos de otras especies marinas, como la piel de bagre, el tiburón o incluso especies menos explotadas como la medusa, podría diversificar y abaratar aún más la producción de colágeno marítimo. El estudio de estos recursos alternativos permitirá valorar si también poseen características beneficiosas para usos biomédicos y podría disminuir la necesidad de especies particulares, aportando a una cadena de suministro más resistente y sustentable. Es aconsejable llevar a cabo estudios comparativos respecto a características mecánicas, pureza, composición de aminoácidos y facilidad de extracción. Además, sería provechoso analizar el efecto medioambiental y los gastos vinculados a la recolección y tratamiento de estos materiales en relación con el colágeno tradicional de ganado o porcino. Esto podría generar nuevas oportunidades en el sector biomédico, haciendo más accesibles los productos de colágeno para usos médicos para sistemas sanitarios de escasos recursos o en naciones en desarrollo.

- [1] A. E. al. Muacevic, *Fish Skin Grafts Versus Alternative Wound Dressings in Wound Care: A Systematic Review of the Literature*. Abr. de 2023. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10111873/>.
- [2] G. Borkow, *The Use of Acellular Fish Skin Grafts in Burn Wound Management—A Systematic Review*. Mayo de 2022. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9323726/>.
- [3] OMS, *Quemaduras*, mayo de 2023. dirección: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
- [4] A. Miranda, *Uso de apósitos en quemaduras*. 2020. dirección: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922020000200008.
- [5] S. Shi, *Recent progresses of collagen dressings for chronic skin wound healing*, 2023. dirección: <https://link.springer.com/article/10.1186/s42825-023-00136-4>.
- [6] Chattopadhyay, *Review collagen-based biomaterials for wound healing*. 2014. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203321/>.
- [7] F. E. al. Ramírez, *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*, 2022. dirección: https://repository.unab.edu.co/bitstream/handle/20.500.12749/16892/2022_Tesis_David_Fernando_Ramirez.pdf?sequence=1.
- [8] R. E. al. Xiong, *Naturally-derived biopolymer nanocomposites: Interfacial design, properties and emerging applications*. 2018. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927796X18300184>.
- [9] R. E. al. Tylingo, *Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the Skin of African Catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic Cod (*Gadus morhua*)*. Jul. de 2016. dirección: https://www.researchgate.net/profile/Szymon-%20Mania/publication/342247889_Isolation_and_Characterization_of_Acid_Soluble_Collagen%20_from_the_Skin_of_African_Catfish_Clarias_gariepinus_Salmon_Salmo_salar_and_Baltic%20_Cod_Gadus_morhua.

- [10] W. E. al. Song, *Physicochemical and Biocompatibility Properties of Type I Collagen from the Skin of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) for Biomedical Applications*. 2019. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471296/>.
- [11] A. E. al. Madrigal, *Tilapia skin-based occlusive dressings for deep burns*, jul. de 2000. dirección: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10829416/>.
- [12] H. E. al. Wang, *Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (Oreochromis niloticus) Collagen Hydrogels for Wound Dressings*. Ago. de 2020. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7230254/>.
- [13] G. Biloba, *La piel de tilapia, fuente de colágeno para cosmética*. 2014. dirección: <https://www.macroestetica.com/quimica-cosmetica/la-piel-de-tilapia-fuente-de-colagenopara-cosmetica>.
- [14] N. E. al. Lima, *Nile tilapia skin (Oreochromis niloticus) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen*. Jun. de 2021. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065128121000842#previewsection-introduction>.
- [15] T. Market, *El uso de la piel de Tilapia en medicina*. 2019. dirección: <https://tilapiamarket.rodaint.com/es/tilapia-in-medicine/>.
- [16] N. E. al. Gallo, *Aquaponics-Derived Tilapia Skin Collagen for Biomaterials Development*. 2022. dirección: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/9/1865>.
- [17] A. E. al. Affah, *Utilization of fish skin waste as a collagen wound dressing on burn injuries: a mini review*. 2019. dirección: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/335/1/012031/pdf>.
- [18] *Quemaduras: MedlinePlus enciclopedia médica ilustración*. dirección: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/1078.htm.
- [19] C. Vivó, R. Galeiras y M. D. P. del Caz, "Initial evaluation and management of the critical burn patient," eng, *Medicina Intensiva*, vol. 40, n.º 1, págs. 49-59, 2016, ISSN: 1578-6749. DOI: [10.1016/j.medin.2015.11.010](https://doi.org/10.1016/j.medin.2015.11.010).
- [20] J. Toussaint y A. J. Singer, "The evaluation and management of thermal injuries: 2014 update," en, *Clinical and Experimental Emergency Medicine*, vol. 1, n.º 1, pág. 8, sep. de 2014. DOI: [10.15441/ceem.14.029](https://doi.org/10.15441/ceem.14.029). visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5052819/>.
- [21] *Quemaduras - Lesiones y envenenamientos*, es. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.msmanuals.com/es/professional/lesiones-y-envenenamientos/quemaduras/quemaduras>.
- [22] *TEMA 3. FISIOPATOLOGÍA DE LAS QUEMADURAS | Salusplay*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.salusplay.com/apuntes/cuidados-intensivos-uci/tema-3-fisiopatologia-de-las-quemaduras/resumen>.
- [23] *Fire Safety and Burns Overview - Stanford Medicine Children's Health*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=fire-safety-and-burns-overview-90-P09593>.
- [24] C. E. Ramírez, N. Ramírez y K. Vélez, "Fisiopatología del paciente quemado," es,
- [25] *Burns: Types, Symptoms & Treatment*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/12063-burns>.

- [26] wcv-admin-support, *10 Different Types of Wound Care Dressings and Their Uses*, en-US, abr. de 2023. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://westcoastwound.com/types-of-wound-dressings-and-when-to-use-them/>.
- [27] APÓSITOS. SACYL - GNEAUPP, es, Section: Guías de apósitos y medicamentos, ene. de 2023. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://gneaupp.info/apositos-sacyl/>.
- [28] *Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322020000100005.
- [29] R. Burgos, *Tipos de vendajes y vendas*, es, mar. de 2023. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.ulceras.info/divulgacion/tipos-de-vendajes-y-vendas/>.
- [30] *Cinco tipos de vendajes y otras recomendaciones*, es, Section: Sin categoría, jul. de 2021. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://suministrosmedicosjmedis.com/cinco-tipos-de-vendajes-y-otras-recomendaciones/>.
- [31] *Biomateriales*, es, abr. de 2015. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://es.slideshare.net/slideshow/biomateriales-47446530/47446530>.
- [32] *Biomaterials: Basic principles / An Introduction to Biomaterials Science and Engineering*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/9789811228186_0004?srsltid=AfmB0orfr-GBsS0eLgAcaudUFL_yNB7_ESAhFbGh9Dmca0vGTx5QdZce.
- [33] *Biomaterials: Basic principles / An Introduction to Biomaterials Science and Engineering*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/9789811228186_0004?srsltid=AfmB0oqTNTc0qbw2ADJpu5fAPNrcJYzYKn5rdNn8S7WRHI7de.
- [34] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair y H. Tamura, "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications," eng, *Biotechnology Advances*, vol. 29, n.º 3, págs. 322-337, 2011, ISSN: 1873-1899. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2011.01.005](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005).
- [35] E. A. Kamoun, E.-R. S. Kenawy, T. M. Tamer, M. A. El-Meligy y M. S. Mohy Eldin, "Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, n.º 1, págs. 38-47, ene. de 2015, ISSN: 1878-5352. DOI: [10.1016/j.arabjc.2013.12.003](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.003), visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213004310>.
- [36] *Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322016000300235.
- [37] *Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing - PubMed*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289206/>.
- [38] *A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/22/3868>.

- [39] *La importancia del colágeno en los tejidos conectivos*, es-ES. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/colagenos-tipos-composicion-caracteristicas-y-distribucion-en-tejidos>.
- [40] *Figura 1. Estructura de la triple hélice del colágeno Fuente: (Meyer, 2019)*, en. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estructura-de-la-triple-helice-del-colageno-Fuente-Meyer-2019_fig1_373396511.
- [41] S. Ricard-Blum, “The collagen family,” eng, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, n.º 1, a004978, ene. de 2011, ISSN: 1943-0264. DOI: [10.1101/cshperspect.a004978](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978).
- [42] *Figura 1. Estructura de la triple hélice del colágeno Fuente: (Meyer, 2019)*, en. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estructura-de-la-triple-helice-del-colageno-Fuente-Meyer-2019_fig1_373396511.
- [43] K. S. Cheah, “Collagen genes and inherited connective tissue disease,” eng, *The Biochemical Journal*, vol. 229, n.º 2, págs. 287-303, jul. de 1985, ISSN: 0264-6021. DOI: [10.1042/bj2290287](https://doi.org/10.1042/bj2290287).
- [44] *The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration - ScienceDirect*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X17300506>.
- [45] E. Salamanca et al., “In Vitro and In Vivo Study of a Novel Porcine Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration,” en, *Materials*, vol. 9, n.º 11, pág. 949, nov. de 2016. DOI: [10.3390/ma9110949](https://doi.org/10.3390/ma9110949). visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5457258/>.
- [46] *Why Use Collagen Biomaterials for Regenerative Medicine?* en, ago. de 2018. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.collagensolutions.com/collagen/applications/>.
- [47] *Caracterización de la Pesca Artesanal del Pacífico de Guatemala tercer cuatrimestre / Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.undp.org/es/guatemala/publicaciones/caracterizacion-de-la-pesca-artesanal-del-pacifico-de-guatemala-tercer-cuatrimstre>.
- [48] *Guatemala - Fishery and Aquaculture Country Profiles*. visitado 15 de nov. de 2024. dirección: <https://www.fao.org/fishery/en/facp/gtm>.
- [49] *Isolation and characterization of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) extracted from silver catfish (Pangasius sp.) skin | Request PDF*. visitado 2 de dic. de 2024. dirección: https://www.researchgate.net/publication/330344135_Isolation_and_characterization_of_acid_soluble_collagen_ASC_and_pepsin_soluble_collagen_PSC_extracted_from_silver_catfish_Pangasius_sp_skin.
- [50] G. A. R. López, P. N. Villaseñor, A. Y. A. Romero y N. D. R. Trujillo, “The Use of Fish Skin (Tilapia) in Burn Patients as a New Therapy Under Study,” en, *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*, vol. 3, n.º 05, págs. 832-835, mayo de 2023, Number: 05, ISSN: 2767-8342. DOI: [10.47191/ijmscrs/v3-i5-09](https://doi.org/10.47191/ijmscrs/v3-i5-09). visitado 28 de nov. de 2024. dirección: <https://ijmscr.org/index.php/ijmscrs/article/view/769>.

- [51] Y.-S. Lim, Y.-J. Ok, S.-Y. Hwang, J.-Y. Kwak y S. Yoon, "Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications," en, *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 8, pág. 467, ago. de 2019. DOI: [10.3390/md17080467](https://doi.org/10.3390/md17080467). visitado 14 de nov. de 2024. dirección: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6723527/>.
- [52] M. Sadowska, I. Kołodziejska y C. Niecikowska, "Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*)," *Food Chemistry*, vol. 81, págs. 257-262, mayo de 2003. DOI: [10.1016/S0308-8146\(02\)00420-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00420-X).
- [53] L. Ch, S. A y L. Y, "Biomedical applications of collagen," en, *International journal of pharmaceutics*, vol. 221, n.º 1-2, jun. de 2001, Publisher: Int J Pharm, ISSN: 0378-5173. DOI: [10.1016/s0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00691-3). visitado 14 de nov. de 2024. dirección: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11397563/>.
- [54] U. K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," en, *Nature*, vol. 227, n.º 5259, págs. 680-685, ago. de 1970, Publisher: Nature Publishing Group, ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0). visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://www.nature.com/articles/227680a0>.
- [55] *A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION*. visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/o59-099>.
- [56] M. D. Shoulders y R. T. Raines, "Collagen Structure and Stability," en, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, n.º Volume 78, 2009, págs. 929-958, jul. de 2009, Publisher: Annual Reviews, ISSN: 0066-4154, 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833). visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
- [57] M. D. Shoulders y R. T. Raines, "Collagen structure and stability," eng, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, págs. 929-958, 2009, ISSN: 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833).
- [58] O. E. Morón-Fuenmayor y N. F. González-Méndez, "CONTENIDO DE COLÁGENO Y SUS FRACCIONES EN TRES MÚSCULOS DE TORETES COMERCIALES," es,
- [59] M. Guadalupe y A. Cristina, "Extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia," es, 2015.
- [60] *Extracción de colágeno tipo I de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por los métodos acuoso y enzimático*. visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://dspace.unitru.edu.pe/items/0d5b49d5-7b56-43d5-ad5a-c4581d8fbbbe>.
- [61] *Inflammasomes in wound healing and fibrosis - Artlett - 2013 - The Journal of Pathology - Wiley Online Library*. visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4116>.
- [62] J. Kanta, "Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior," *Cell Adhesion & Migration*, vol. 9, n.º 4, págs. 308-316, mar. de 2015, ISSN: 1933-6918. DOI: [10.1080/19336918.2015.1005469](https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1005469). visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594574/>.
- [63] A. M. H. Larsen et al., "Collagen Density Modulates the Immunosuppressive Functions of Macrophages," eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 205, n.º 5, págs. 1461-1472, sep. de 2020, ISSN: 1550-6606. DOI: [10.4049/jimmunol.1900789](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900789).

- [64] (PDF) Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 21-33. visitado 2 de dic. de 2024. dirección: https://www.researchgate.net/publication/23983670_Geiger_B_Spatz_JP_Bershadsky_ADEnvironmental_sensing_through_focal_adhesions_Nat_Rev_Mol_Cell_Biol_10_21-33.
- [65] F. Grinnell, "Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction," eng, *The Journal of Cell Biology*, vol. 124, n.º 4, págs. 401-404, feb. de 1994, ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.124.4.401](https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.401).
- [66] L. D. Campos, V. d. A. Santos Junior, J. D. Pimentel, G. L. F. Carregã y C. B. B. Cazarin, "Collagen supplementation in skin and orthopedic diseases: A review of the literature," eng, *Heliyon*, vol. 9, n.º 4, e14961, abr. de 2023, ISSN: 2405-8440. DOI: [10.1016/j.heliyon.2023.e14961](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14961).
- [67] A. W. Orr, J. M. Sanders, M. Bevard, E. Coleman, I. J. Sarembock y M. A. Schwartz, "The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow," *The Journal of Cell Biology*, vol. 169, n.º 1, págs. 191-202, abr. de 2005, ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.200410073](https://doi.org/10.1083/jcb.200410073). visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2171897/>.
- [68] A. M. A. Rømer, M.-L. Thorseth y D. H. Madsen, "Immune Modulatory Properties of Collagen in Cancer," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, pág. 791 453, dic. de 2021, ISSN: 1664-3224. DOI: [10.3389/fimmu.2021.791453](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.791453). visitado 2 de dic. de 2024. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8692250/>.
- [69] I. Kaverina y A. Straube, "Regulation of cell migration by dynamic microtubules," eng, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 22, n.º 9, págs. 968-974, dic. de 2011, ISSN: 1096-3634. DOI: [10.1016/j.semcdb.2011.09.017](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.017).

13.1. Preparación de la muestra



Figura 13: Piel de tilapia posterior de 3 horas de remojo en solución de hidróxido de sodio (NaOH)

13.2. Desengrasado

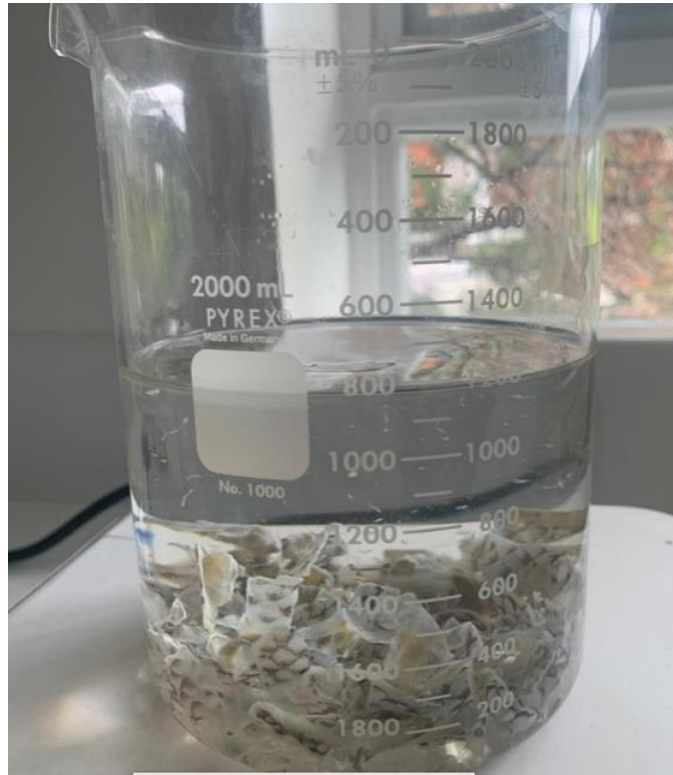


Figura 14: Piel de tilapia en remojo en etanol durante 24 horas

13.3. Extracción de colágeno con ácido acético



Figura 15: Colágeno extraído de la piel de tilapia soluble en ácido acético

13.4. Liofilización de la muestra



Figura 16: Muestra liofilizada en liofilizador (Pro Freeze Dryer, Harvest Right, Utah, USA)

13.5. Incubación de líneas celulares LAN-1 y L929

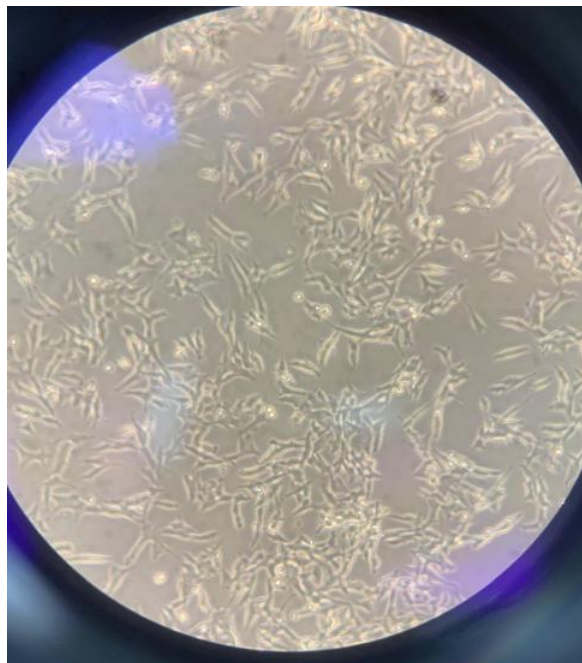


Figura 17: Células LAN-1 bajo microscopio invertido (x100) con un período de incubación en medio DMEM de 24 horas

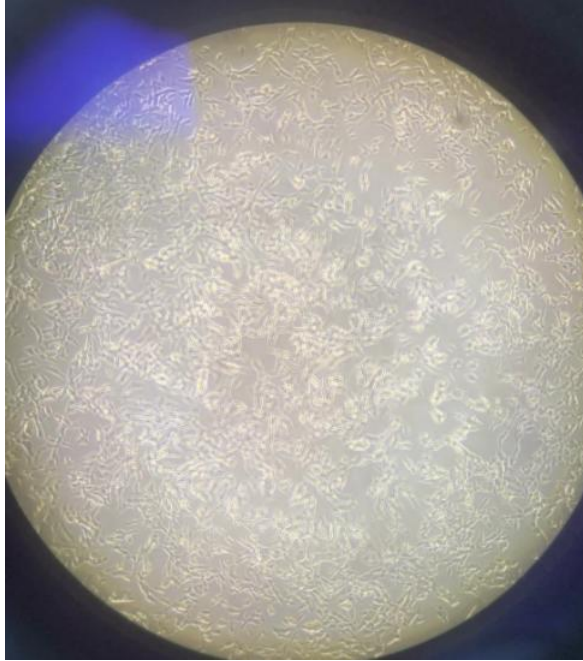


Figura 18: Células L929 bajo microscopio invertido (x100) con un período de incubación en medio DMEM de 24 horas