

Evaluación de una matriz descelularizada de espinaca (*Spinacia oleracea*) como andamio celular con potencial para la regeneración de heridas

Borja González, Daynally Georgette

2023

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5699>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Evaluación de una matriz descelularizada de espinaca (*Spinacia oleracea*) como andamio celular con potencial para la regeneración de heridas

Borja González Daynally Georgette (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1*}, Herrera Morales Adell Victoria (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Ortiz Santos Arely Desirée (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Pino Hernández Lilian (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Rojas Díaz Javier (noveno semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Bernal Cuevas Ramiro Antonino (profesor responsable)¹, Cortés Ramírez Georgina Salud (profesora asesora)¹ y Rivas Arreola María José (profesora asesora)¹

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México.

Resumen

Los biomateriales se han definido como aquellos materiales cuyas aplicaciones están dirigidas para estar en contacto con sistemas biológicos. Actualmente existe una búsqueda para recrear el ambiente extracelular de los tejidos, como es el caso de los andamios celulares. Por ello, el objetivo de este proyecto es evaluar el potencial de una matriz descelularizada de hojas de *Spinacia oleracea* como andamio celular con posible potencial para la regeneración de heridas. En este estudio se evaluaron tres metodologías de descelularización. Para reforzar la matriz se realizaron recubrimientos con diferentes polímeros al 1% (quitosano, colágeno, colágeno-quitosano) y al 2% (gelatina). A las muestras obtenidas se les realizaron pruebas de secado, hinchamiento, y evaluación de difusividad en nervios foliares. Para los recubrimientos se realizaron pruebas para la cuantificación del recubrimiento en la matriz, estrés mecánico, y en el caso del quitosano un antibiograma para comprobar su actividad antimicrobiana. Por último, se evaluó la citotoxicidad del cultivo celular con la prueba MTT, y la adhesión celular a las matrices por medio de fluorescencia con tinción de naranja de acridina. A modo de conclusión, el método por calentamiento permite la obtención de una matriz descelularizada con buena difusividad a través de los nervios foliares que facilita la adhesión y organización de la línea celular 3T3. Las pruebas realizadas a los recubrimientos mostraron que existía la presencia de los biopolímeros en la matriz, y que el cultivo de fibroblastos contenía células viables, donde la gelatina y el colágeno tuvieron la mejor adhesión celular.

Palabras clave: Descelularización, andamio, cultivo celular, ingeniería de tejidos.

***Autor Corresponsal:** daynally.borja@iberopuebla.mx

Introducción

La ingeniería de tejidos hace referencia a la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas con el objetivo principal de reemplazar, reparar o regenerar un tejido dañado [1,2]. Su aplicación genera nuevas alternativas de tratamientos para pacientes con diversos tipos de condiciones médicas, lesiones tisulares u orgánicas [3]. Existe un gran interés en esta área de la bioingeniería, donde se han logrado muchos avances. Sin embargo, aún existen obstáculos por sobrepasar, como lo es la disponibilidad de biomateriales para la fabricación de andamios y terapias regenerativas.

Las células son los componentes fundamentales del tejido, y a su vez son la unidad básica de la funcionalidad del cuerpo. Normalmente, grupos de células forman y secretan sus propias estructuras de soporte, denominadas matriz extracelular, a partir de un amplio grupo de fuentes posibles, como lo pueden ser proteínas, carbohidratos o bioplásticos. Esta matriz o andamio también actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben señales de diferentes orígenes y cada señal deberá comenzar una cadena de respuestas que determina qué le sucede a cada célula [4]. Los andamios celulares son estructuras artificiales tridimensionales con poros interconectados, diseñados para

receptar células y favorecer el desarrollo de estas para la formación de tejidos y además protege la herida contra bacterias y otros organismos que tienden a colonizar la lesión [5]. Por estas razones, dentro de la ingeniería de tejidos el diseño de andamios es fundamental y la clave de su funcionamiento está en los materiales que la constituyen, ya que deben seguir los requerimientos físicos y bioquímicos que marcan cada tipo de tejido. La complejidad de estos materiales es muy alta, debido a que se necesitan estructuras que imiten perfectamente las naturales y formen un entramado de fibras, adecuadas de tal manera que en las células reconozcan la estructura como propia y la puedan utilizar como soporte. Para lograrlo, se ha optado por el uso de los biomateriales, sustancias que pueden ser naturales o sintetizados en laboratorio (no fármacos) a partir de componentes metálicos, polímeros, cerámicas o materiales compuestos [6]. Estos pueden utilizarse durante cualquier periodo de tiempo, con el fin de aumentar o sustituir parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, manteniendo la calidad de vida del individuo [7]. Específicamente, los biomateriales constituidos por compuestos de la matriz extracelular (MEC) pueden ser una alternativa para potenciar la actividad celular, debido a que la MEC permite a las células mejorar la viabilidad y su función [8].

Además, para que un andamio sea clínica y comercialmente viable, debe tener un costo efectivo y debe permitir su fabricación en pequeños lotes de producción en el laboratorio. Los andamios pueden estar producidos de diferentes maneras y de distintos materiales de acuerdo con los requerimientos de diseño. Algunas de las formas de fabricación se basan en la evaporación de solventes, lixiviación de partículas, inversión de fase, auto ensamblado molecular, espumado por gas, separación de fases, emulsificación y liofilización, y prototipado rápido (con impresión 3D) [9]. El uso de andamios de origen animal es una de las materias primas para andamios en el tratamiento de heridas y la regeneración de tejidos, sin embargo, estos presentan limitaciones debido a su escasa disponibilidad y biocompatibilidad, aunado a su alto costo [10].

Una alternativa es el uso de andamios de origen vegetal a través de la descelularización de tejidos vegetales, puesto que entre sus propiedades se encuentran redes vasculares preexistentes, transporte y retención de agua, alta disponibilidad, ausencia de restricciones éticas o de suministro, idoneidad para la producción e investigación a gran escala, por ende, estos factores permiten que los andamios celulares de origen vegetal tengan una mayor disponibilidad y sean más accesibles para personal del área de la salud y usuarios [11]. La selección de espinaca (*Spinacia oleracea*) como tejido vegetal para la obtención del andamio es gracias a su MEC formada en su mayor parte de celulosa, la cual cuenta con una robusta pared celular hidrofílica y resistente. Así mismo el uso de celulosa está documentado para aplicaciones biomédicas como sistemas de administración de fármacos, hueso/cartilago, tejido vascular, y cicatrización de heridas, entre otros, lo que indica que un andamio vegetal basado en celulosa de espinaca innovaría en la ingeniería de tejidos y podría ser biocompatible para aplicaciones en el mismo campo [12].

La descelularización es el proceso base para la obtención del andamio celular de origen vegetal, esta técnica elimina el material celular de un tejido u órgano, dejando atrás un andamiaje acelular que consiste en una MEC, cuya composición depende del tejido u órgano del que se deriva, mientras se preserva una red vascular intacta. Al eliminar el material celular del tejido, este puede recelularizarse con células de interés, en este caso los fibroblastos 3T3 (FB), células mononucleares, no polarizadas y concebidas como las células más numerosas presentes en los tejidos conjuntivos del organismo [13]. Los fibroblastos tienen una participación en la regulación de fenómenos como la embriogénesis, organogénesis y el desarrollo, además de ser conocidas por su participación en la homeostasis y remodelación de los tejidos del organismo.

El uso de biomateriales poliméricos como recubrimiento de los andamios se presenta como alternativa para brindarles resistencia, a su vez estos se clasifican en biomateriales naturales y sintéticos. Por un lado, los biomateriales naturales están compuestos por polisacáridos (quitosano, alginato o ácido hialurónico) o péptidos (colágeno o gelatina), mientras que el polietilenglicol, el poli (ácido láctico) o el poli (ácido láctico-co-glicólico) son algunos de los polímeros sintéticos. La ventaja de los biomateriales naturales radica en su alta biocompatibilidad, puesto que las

enzimas endógenas son capaces de degradar los biomateriales. [8] Por consiguiente, se trabajó con 4 recubrimientos distintos para el andamio desarrollado con base en biomateriales poliméricos naturales: quitosano, colágeno, grenetina y una mezcla de quitosano-colágeno.

El colágeno es una proteína cuyo objetivo es la unión de las diferentes estructuras del organismo, como molécula proteica es la más abundante en los vertebrados y se calcula que una de cada cuatro proteínas del cuerpo es colágeno. Esta proteína es responsable de unir los tejidos conectivos (músculos, tendones, ligamentos, piel, huesos, cartílagos, tejidos y órganos hematológicos y adiposos) y actúa como elemento de soporte que permite que todo el cuerpo se mantenga unido [14]. El Food Chemicals Codex define la grenetina como el producto obtenido de la hidrólisis del colágeno sea por uso de ácidos o álcalis o procesos enzimáticos. Este compuesto es capaz de agrupar en condiciones de temperatura específicas agua en forma de redes tridimensionales, también funcionando como soporte al estrés mecánico de la estructura formada. La grenetina es uno de los biopolímeros más versátiles y tiene numerosas aplicaciones en alimentos, confitería, farmacéutica, cosmética y productos técnicos [15].

Por último, la relevancia del quitosano como recubrimiento se basa en que cuenta con propiedades antimicrobianas y biodegradables. Se ha sugerido que las interacciones electrostáticas entre el grupo amino del quitosano y los grupos fosforilo de los lípidos de membrana de los microorganismos son en gran parte responsables de la actividad antimicrobiana de este biopolímero [16].

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo es evaluar una matriz descelularizada de espinaca (*Spinacia oleracea*) como andamio celular con potencial para la regeneración de heridas.

Metodología

Material Biológico

Las hojas de *Spinacia oleracea* se obtuvieron del supermercado local. Se seleccionaron las hojas que presentaban buena estructura visualmente, un tamaño aproximado de 7 cm y peso de 5 g.

Descelularización

Se evaluaron tres métodos de descelularización los cuales consistieron en:

- Método de goteo por cánula (MC): Se elaboró una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 6 p/v% e hipoclorito (Cl) al 4 v/v%. Se colocaron 150 mL de la solución a temperatura ambiente (24°C) en bolsas para suero y se canuló la hoja a un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta que la hoja no mostrara clorofila en sus tejidos.
- Método sumergido (MS): Se colocaron las hojas previamente seleccionadas en solución de bicarbonato al 6 p/v% y cloro al 4 v/v%. Se mantuvieron durante 5 semanas a 5 °C realizando un cambio de solución cada semana hasta observar la ausencia de clorofila.
- Método de calentamiento (MC): La solución de bicarbonato al 5 p/v% y cloro al 2 v/v% se colocó sobre

una parrilla de calentamiento la cual se elevó a 70°C con 140 rpm sumergiendo la hoja durante 3h o hasta la ausencia de clorofila.

Las hojas obtenidas se sumergieron en solución de tampón fosfato salino (PBS) al 1% hasta su posterior uso y se almacenaron en refrigeración a 5°C.

Caracterización de hojas descelularizadas

Las hojas descelularizadas se observaron al microscopio óptico e invertido a 5, 10 y 40x. Una vez asegurada la ausencia de células vegetales se realizaron tres pruebas por triplicado para caracterizar las hojas:

- Prueba de secado: Las hojas se pesaron previa y posteriormente a su secado a temperatura ambiente (24°C) durante 8 h. Una vez obtenidos los datos, se calculó el promedio y su desviación estándar.
- Prueba de hinchamiento: Las hojas secas se rehidrataron en solución de PBS por 24 h a 5°C y se evaluó el porcentaje de hinchamiento con Eq(1) y Eq(2).

$$\%H = \frac{P_h - P_s}{P_s} \times 100 \quad (1)$$

$$\%H = \bar{x} \pm S \quad (2)$$

Donde:

H: porcentaje de hinchamiento

Ps: peso inicial

Ph: peso hidratado

\bar{x} : promedio

S: desviación estándar

- Evaluación de nervios foliales: Se realizó una solución de colorante azul con agua destilada al 5 v/v% la cual se inyectó a la nervadura de la hoja.

Recubrimiento

Se realizaron cuatro tratamientos etiquetándolos como quitosano (Q); colágeno (C); mezcla quitosano-colágeno (M); gelatina (G) y una muestra control de la matriz sin recubrimiento. La solución de quitosano (Sigma-Aldrich) de mediano peso molecular se preparó al 1 p/v% en ácido acético 0.5 M calentado a 70°C con 450 rpm durante 2 horas, una solución de colágeno hidrolizado tipo IV al 1 p/v% en agua calentado a 40°C con 450 rpm durante 30 min, una mezcla 1:1 v/v% de colágeno con quitosano y una solución de gelatina al 2 p/v% en agua calentado a 40°C con 450 rpm durante 30 min. Las hojas se sumergieron en las soluciones preparadas y se dejaron reposar por 24 h (quitosano, colágeno y la mezcla a 5°C y grenetina a 24°C). Para la cuantificación del recubrimiento en la matriz descelularizada se realizó una curva de calibración tomando como referencia los valores a distintas diluciones para cada biopolímero. Se cortaron trozos de hoja descelularizada de 1x1 cm sextuplicado y se sumergieron en solución del recubrimiento correspondiente durante 24 h. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente (24°C) y se sumergieron en el disolvente correspondiente. La solución obtenida se analizó en el espectrofotómetro UV/VIS (Agilent Technologies) y su valor se ubicó en la curva de calibración previamente realizada.

A las 4 muestras más la muestra sin recubrimiento se le realizó una prueba de estrés mecánico por duplicado la cual consistió en sumergir las muestras dentro de un volumen de 300 mL de agua destilada con agitación inicial de 100 rpm aumentando cada hora 100 rpm a temperatura ambiente (24°C). A partir de los resultados se calculó el porcentaje de humedad con Eq(3) y se estimó el porcentaje de celulosa restante.

$$\%h = \frac{\text{masa de agua}}{\text{masa total}} \times 100 \quad (3)$$

Finalmente, se realizó un antibiograma por triplicado con medio LB sembrando la cepa de *E. coli* de manera masiva para la solución de quitosano, mezcla y las hojas con dichos recubrimientos. Se incubaron en la estufa de calentamiento a 37°C y se observaron a las 12 y 24 h postincubación.

Evaluación de adhesión celular

Se utilizaron fibroblastos murinos 3T3 manteniéndolos en incubadora de CO₂ al 5% a 37°C y atmósfera humidificada con medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiótico cambiando medio cada tres días.

Para evaluar la citotoxicidad del cultivo celular de fibroblastos 3T3 se realizó la prueba de MTT siguiendo el protocolo del proveedor (Sigma Aldrich MTT Assay M5655) evaluando a 24h. Finalmente, se evaluó la adhesión celular a las matrices descelularizadas con y sin recubrimiento por medio de fluorescencia haciendo una tinción con naranja de acridina (Sigma Aldrich MTT Assay M01640) [17].

Resultados y Discusión

Descelularización

De acuerdo con los métodos evaluados para la descelularización se realizó una tabla comparativa (Tabla 1) donde se resumen los resultados obtenidos.

El método MG presenta dificultades como la formación de burbujas de aire en la hoja causando su ruptura. El método MS presenta buenos resultados en cuanto a la estructura de la hoja, sin embargo, es un proceso lento. Y el método MC logró la descelularización en 3 horas aproximadamente, la desventaja que presenta es la fragilidad de la celulosa.

A partir de la comparación de metodologías (Tabla 1), se propone una nueva en la cual se destaca la ventaja de cada una de ellas, donde la solución es inyectada hasta observar el inicio de la descelularización, posteriormente, se colocan en calentamiento durante 1 hora y finalmente se colocan en cajas Petri con la misma solución para que se termine el proceso de descelularización.




Caracterización de hojas descelularizadas

De la observación al microscopio (Fig.1) se determinó que no existía la presencia de células vegetales ni pigmentos. Se puede observar que la estructura de la hoja está en buen estado debido a que se ven estomas, éstos se encuentran en la epidermis de la hoja y las nervaduras están intactas.

En la Fig. 2 se observan los resultados obtenidos de la prueba de hinchamiento, a partir de la Eq(2) el porcentaje promedio

de hinchamiento resultó de $348.33\% \pm 115.38$, mientras que, la prueba de secado dio un valor de $0.0792g \pm 0.0294$. Mediante la evaluación de los nervios foliales (Fig. 3) se demostró que los canales estaban limpios y libres determinando así, que es posible el paso de las células. El pigmento mostró una estructura permeable y una buena difusividad en la hoja.

Tabla 1: Comparación de metodologías de descelerización.

Metodología	Descripción	Observaciones
Goteo (MG) 	6% bicarbonato 4% cloro Temperatura: ambiente (24°C) Descelularización completa en 1 hora. Flujo de 2 gotas por minuto.	Formación de burbujas de aire en la hoja debido a la falta de una bomba peristáltica con flujo adecuado.
Sumergido (MS) 	6% bicarbonato 4% cloro Temperatura: 4°C Descelularización completa en 5 semanas	Mantiene intacta la estructura de la hoja dejándola más firme. Es un proceso tardado.
Calentamiento (MC) 	5% bicarbonato 2% de cloro Temperatura y agitación: 73°C y 140 rpm.	Método agresivo debido a que la estructura de la celulosa es muy frágil y resulta complicada su manipulación.

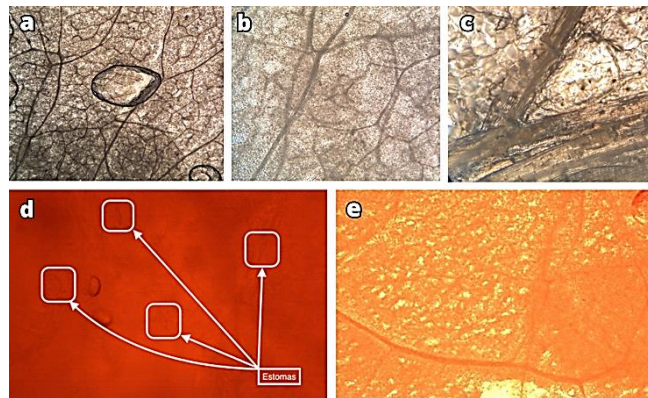


Fig. 1. Observación al microscopio, a) objetivo 4x, b) objetivo 10x, c) objetivo 40x, d) estomas bajo el microscopio, e) nervaduras de la hoja descelerizada.

Tabla 2: Concentración absorbida del polímero.

Polímero	Concentración a las 24 h (g/mL)
Quitosano	0.0121
Colágeno	3.0354
Gelatina	2.78e-5
Mezcla	11.6100

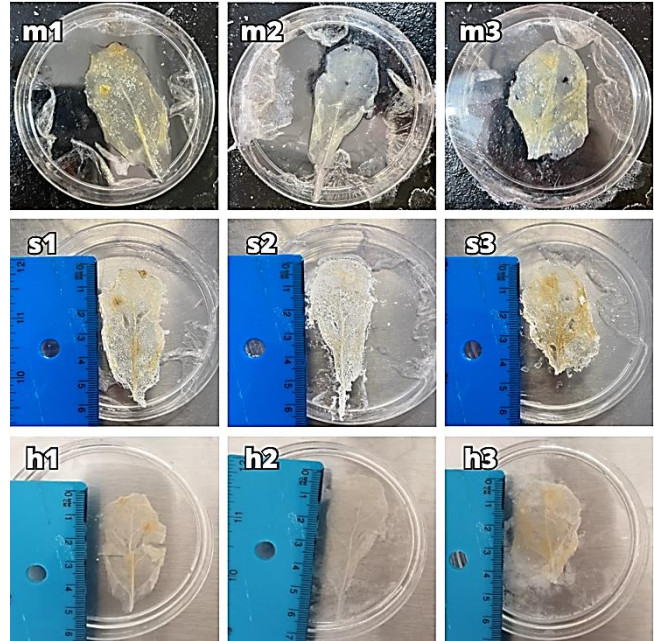


Fig. 2. Hojas descelerizadas para prueba de hinchamiento donde m es la muestra, s indica la hoja secada y h una vez hidratada. m1-m3 muestras de hojas descelerizadas, s1-s3 hojas secadas a temperatura ambiente por 8 h, h1-h3 hojas hidratadas en solución de PBS.

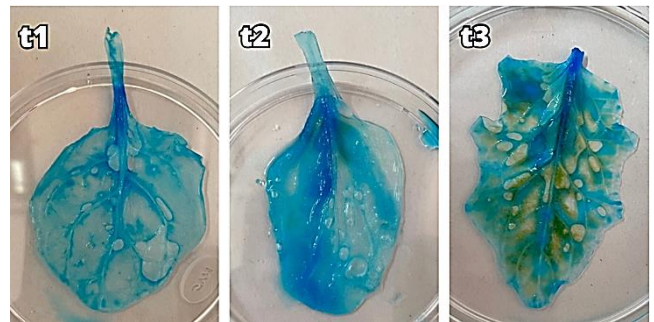


Fig. 3. Evaluación de nervios foliales con colorante azul.

Recubrimiento

Para determinar la absorbancia de cada uno de los polímeros se elaboró un barrido en el espectrofotómetro de 200 a 800 nm (Fig. 8). A partir de la solución de cada polímero se realizó una curva de calibración (Fig. 9) lo que permitió conocer la concentración que absorbe la hoja en 24h por cada polímero (Tabla 2).

Al someterse a la prueba de estrés mecánico se obtuvieron datos para estimar el porcentaje de humedad y celulosa que existía en las muestras (Tabla 3) donde se consideró la desviación estándar para conocer la variabilidad que existía en los ensayos. En el caso de aquellas muestras con una desviación estándar mayor se debe intentar reducir la variabilidad seleccionando las muestras más homogéneas entre sí en peso y tamaño.

Del antibiograma (Fig. 4) se comprobó la actividad antimicrobiana del quitosano. Por ende, el recubrimiento de mezcla tiene un menor diámetro de inhibición de crecimiento alrededor de dicha hoja a comparación de la de quitosano. Tal y como afirma Anaya [16] la relevancia del quitosano como recubrimiento se basa en sus propiedades antimicrobianas y

biodegradables, dicha actividad antimicrobiana se puede atribuir a las interacciones electrostáticas entre el grupo amino del quitosano y los grupos fosforilo de los lípidos de membrana de los microorganismos en gran parte responsables de la actividad antimicrobiana de este biopolímero.

Tabla 3: Porcentaje de celulosa restante.

Muestra	% humedad	% celulosa
Quitosano	50% ± 0.17	50%
Colágeno	18% ± 0.18	82%
Mezcla	39% ± 0.04	61%
Gelatina	26% ± 0.12	74%
Control	19% ± 0.11	81%

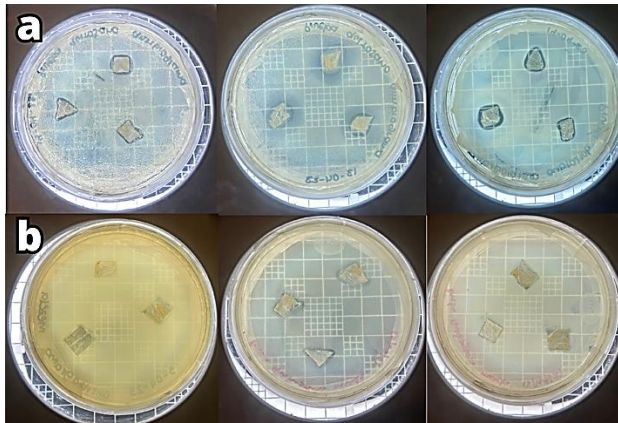


Fig. 4. Antibiograma para quitosano. a) Recubrimiento de quitosano en matriz descelularizada. b) Recubrimiento de mezcla de quitosano-colágeno en matriz descelularizada.

Evaluación de adhesión celular

Se realizaron dos cultivos celulares y 28 pases, transfiriendo las células a medio nuevo evitando una alta densidad celular, los cuales no presentaron contaminación durante 5 semanas. En el último pase se realizó el conteo de células, obteniendo un total de 1,448,000 células entre ambos cultivos.

Citotoxicidad

Los pozos de la microplaca se observaron al microscopio invertido a 40x (Fig. 5). Donde se puede determinar que el colágeno y la gelatina favorecen la adhesión celular. Con ayuda del lector de placas se obtuvieron los resultados de la figura 6. evaluado a 565 nm. Se comprueba que la gelatina y el colágeno son los polímeros con mejor respuesta a la adhesión celular con un porcentaje de 741 y 648% respectivamente. A las 24 h se incluye el tiempo de duplicación de la línea celular (12-18 h) por lo que los resultados sugieren que hay adhesión y proliferación celular en las matrices descelularizadas con y sin recubrimiento. Se

demuestra que una desventaja del quitosano es que al encontrarse a un pH ácido impide la proliferación celular con un 188% de citotoxicidad.

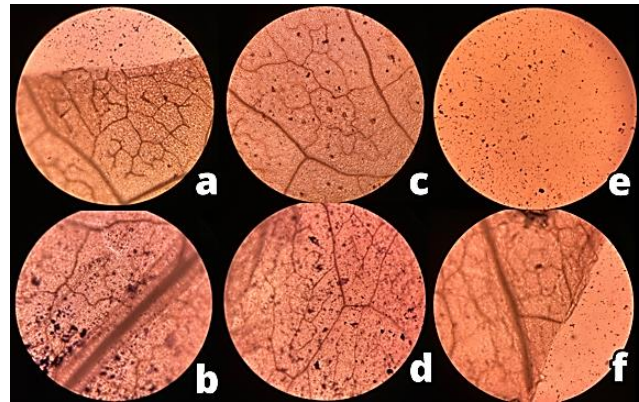


Fig. 5. Ensayo MTT a las 24 h. a) muestra quitosano, b) muestra de colágeno, c) muestra mezcla colágeno-quitosano, d) muestra gelatina, e) blanco f) matriz sin recubrimiento.

En la mezcla, el colágeno permite un incremento en la adhesión celular aumentando el valor a 563%. Según el reporte de Castro [18] a pesar de que el colágeno y el quitosano no existen juntos como mezcla en la naturaleza, se ha reportado que matrices que combinan ambos componentes son excelentes candidatos para la adhesión celular, ya que proveen mayor bioestabilidad y excelente biocompatibilidad. Se determina que el colágeno, la gelatina y la mezcla muestran un comportamiento similar debido al porcentaje de error estimado.

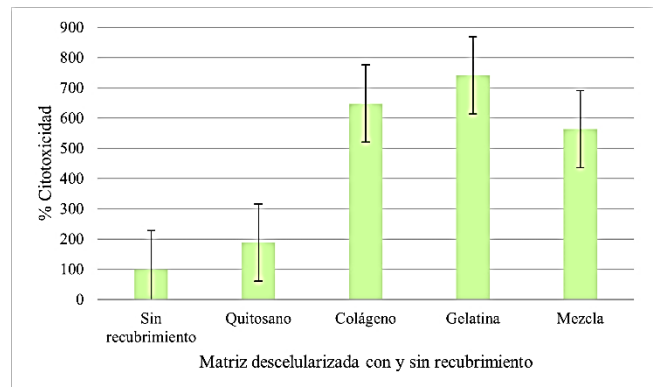


Fig. 6. Evaluación del ensayo MTT a las 24h.

Fluorescencia

Se observaron las muestras en el microscopio bajo la técnica de fluorescencia. Se presentaron dificultades para distinguir las células en los distintos recubrimientos, los cuales se pueden atribuir a la falta de estandarización de la técnica de naranja de acridina en el laboratorio en el que se llevó a cabo. También influye el hecho de que, al observar mediante el microscopio, las células quedan en segundo plano y la hoja en primer plano, restando visibilidad. Como se puede observar en la Fig. 7 el recubrimiento con mejores resultados visualmente fue el de gelatina.

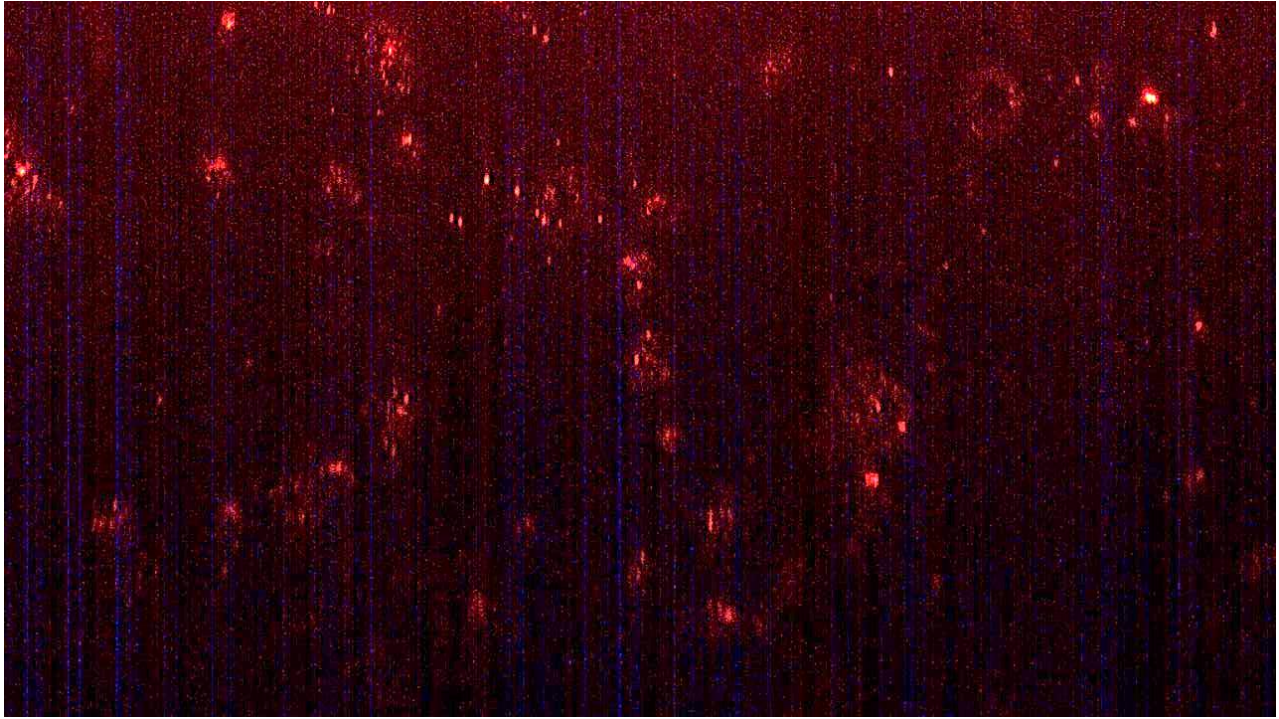


Fig. 7. Células de fibroblastos 3T3 adheridas en la matriz recubierta con gelatina observadas en microscopio de fluorescencia con objetivo 40x.

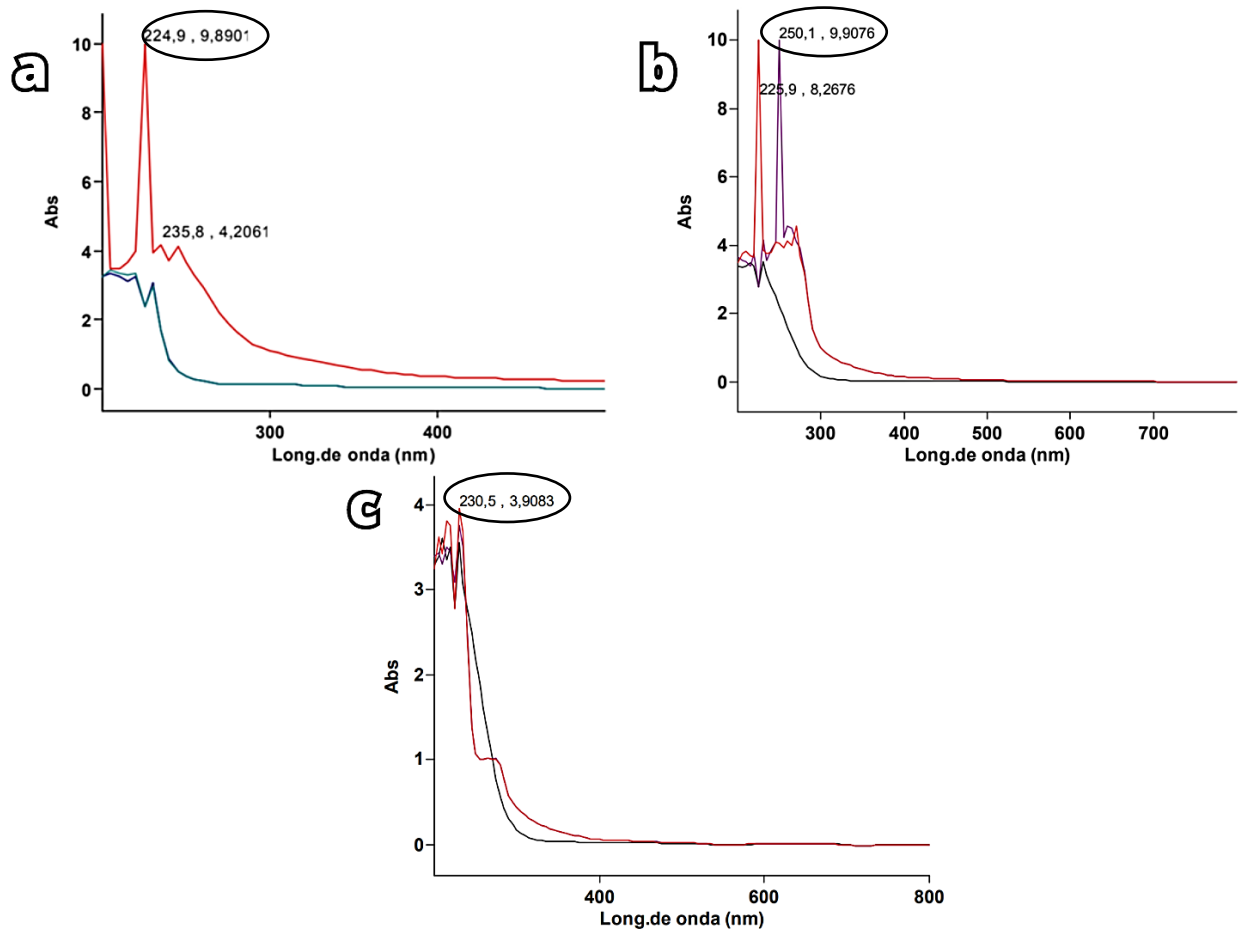


Fig. 8. Barrido en el espectrofotómetro UV-VIS para cada biopolímero. a) quitosano 225 nm, b) gelatina 250 nm, c) colágeno 230 nm. Se puede apreciar la presencia de picos en los cuales los valores encerrados determinan el valor de absorbancia para realizar las lecturas en el espectrofotómetro.

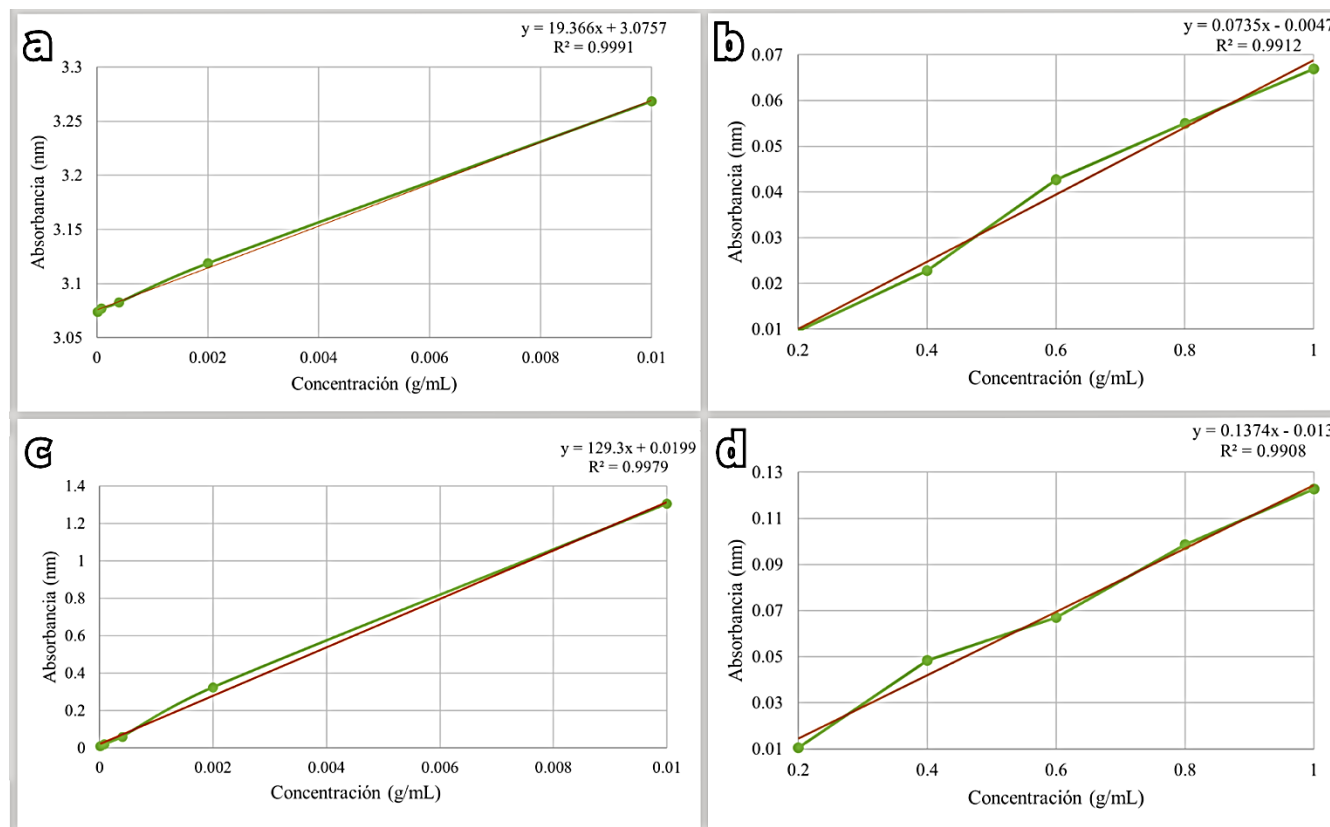


Fig. 9. Curvas de calibración. a) quitosano, b) colágeno, c) gelatina, d) mezcla quitosano-colágeno.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

El método de descelularización por calentamiento a 70°C con 140 rpm sumergiendo durante 3h permite la obtención de una matriz descelularizada con buena difusividad a través de los nervios foliares que facilita la adhesión y organización de la línea celular 3T3. Se propone la aplicación de una nueva metodología en la que se incluyan las ventajas de cada método evaluado para estandarizar la descelularización de las hojas de espinaca.

Se requieren estudios posteriores para ampliar la caracterización de la matriz obtenida y estandarizar el proceso de selección de material biológico para homogeneizar las muestras de las pruebas, así como realizar

la cuantificación de celulosa en las matrices secas con y sin recubrimiento.

Se determinó que los recubrimientos de gelatina y colágeno presentaron una mayor adhesión celular con un porcentaje de citotoxicidad de 741 y 648% respectivamente. Sin embargo, se propone el uso de la mezcla quitosano-colágeno ya que esta tiene un porcentaje de 563% y aporta propiedades antimicrobianas a la matriz.

A su vez se espera repetir el ensayo MTT ampliando el tiempo a 72 h y observar las muestras en un microscopio electrónico de barrido (SEM) para determinar el tamaño de los poros de la matriz descelularizada, la preservación de la vascularización.

Referencias

1. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. **Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa**. U.S. Department of Health and Human Services, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenieria-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>. [Accedido: 20-abr-2023]
2. M. C. González y C. A. Grillo. **Desarrollo de nanocompositos basados en hidroxiapatita/hidroxiapatita dopada con metales y/o biomoléculas como materiales de recubrimiento de andamios para implantes ortopédicos**. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.35537/10915/97656>. [Accedido: 20-abr-2023]
3. B. J. González y J. Romero. **Ingeniería de los tejidos en Cirugía Maxilo Facial. Desarrollo en nuestro contexto social**. *Revista Universidad y Sociedad*, vol.13, n.4, pp.41-48, 2016. [En línea]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2218-36202021000400041. [Accedido: 20-abr-2023]
4. A. Villa-Forte. **Las células-fundamentos**. *Cleveland Clinic*, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/fundamentos/el-cuerpo-humano/las-c%C3%A9lulas>. [Accedido: 20-abr-2023]

5. A. Cárdenas. **Desarrollo y evaluación in vitro de andamios a base de colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización.** Tesis de maestría, *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California*, 2019. [En línea] Disponible en: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3059> [Accedido: 16-mar-2023]
6. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. **Biomateriales.** *U.S. Department of Health and Human Services.* [En línea]. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/biomateriales#:~:text=Los%20biomateriales%20pueden%20ser%20naturales,suturas%20hechas%20de%20tendones%20animales.> [Accedido: 20-abr-2023]
7. R. Ruíz. **Desarrollo y caracterización de nanocompuesto pva/hap por electrohilado y su respuesta biológica.** Tesis doctoral, *Centro de Investigación de Materiales Avanzados*, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/773>. [Accedido: 20-abr-2023]
8. T. Nii and Y. Katayama, **Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine.** *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 16, p. 8657, 2021. [En línea] Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/8657>. [Accedido: 20-abr-2023]
9. F. G. Barezzi y A. B. Gonzalez. **Caracterización física y biológica de andamios impresos 3D de colágeno obtenidos a partir de piel porcina para uso biomédico.** *Universidad Nacional de Córdoba*, 2018. [En línea]. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/11349/Proyecto%20Integrador%20BAREZZI%20-%20GONZALVEZ%20version%20final.pdf?isAllowed=y&sequence=1> [Accedido: 22-abr-2023]
10. M. Adamski, G. Fontana, JR. Gershlak, GR. Gaudette, H. D. Le y W.L. Murphy. **Dos métodos para la descelularización de tejidos vegetales para aplicaciones de ingeniería de tejidos.** *National Library of Medicine J Vis Exp.*, 2018. [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6101437/> [Accedido: 17-mar-2023]
11. Z. Yiwei, Q. Zhang, S. Wang, J. Zhang y S. Fan, X. Lin. **Avances actuales en el desarrollo de la matriz extracelular vegetal descelularizada.** *Frontiers in Bioengineering and biotechnology Sec. Tissue Engineering and Regenerative Medicine* vol. 9, 2021. [En línea] Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.712262/full>. [Accedido: 22-abr-2023]
12. A. F. Harris, J. Lacombe y F. Zenhausern. **El papel emergente de los andamios basados en plantas basados en plantas descelularizados como un nuevo biomaterial.** *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms22212347> [Accedido: 22-abr-2023]
13. V. Simancas y A. Díaz. **Fisiología y usos terapéuticos de los fibroblastos gingivales.** *Odous Científica*, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/vol20n1/vol20n12019.pdf#page=42> [Accedido: 15-mar-2023]
14. M. Martínez. **Elaboración de recubrimiento para heridas, a base de poli-octilcianoacrilato y glicina.** Tesis de licenciatura, *Instituto politécnico Nacional*, 2020. [En línea]. Disponible en: https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/29534/tesis_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [Accedido: 11-mar-2023]
15. J.C. Ortíz. **Elaboración y caracterización de geles mixtos de grenetina tipo B y proteína concentrada de suero pretratada por ultrasonido de alta potencia.** Tesis de licenciatura, *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/10200>. [Accedido: 25-abr-2023]
16. L. Anaya, A. Pérez, J. Ruvalcaba, J. Sánchez, R. Romero, y E. Yontalvo. **Funcionalización de los recubrimientos a base de quitosano para la conservación postcosecha de frutas y hortalizas.** *TIP, Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, e20200241, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.241>. [Accedido: 08-mar-2020]
17. Sigma Aldrich. **Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT.** *SigmaAldrich.com*. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt> (accedido el 4 de abril de 2023).
18. S.E. Castro, L.A. Calvo, S. Alvarenga, C. Centeno, M. Ramos, J. Vega, V. Zamora, y M. Rojas. **Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas: evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos.** *Tecnología en Marcha. Edición especial Ingeniería de Tejidos.* Pág 58-68, 2015. [En línea]. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v28s1/0379-3982-tem-28-s1-58.pdf>. [Accedido: 25-abr-2023]