

Desarrollo de un prototipo de película de matriz extracelular con el uso de Iresine herbstii

Pérez Chavero, María Fernanda

2023

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5708>

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

Desarrollo de un prototipo de película de matriz extracelular con el uso de *Iresine herbstii*

Marcos Morales Ariadna (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Chacón Quiñones Armando (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, González García Sofía (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Ordaz Carrera Vanessa Guadalupe (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Pérez Chavero María Fernanda (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1*}, Simpson y Reyes Amy Marie (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología), Rivas Arreola María Jose (profesor asesor)¹, Colin Ortega Juan Carlos (profesor responsable)¹.

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

Resumen

Las plantas poseen un sistema vascular complejo con estructuras definidas y especializadas que les permiten el transporte de nutrientes, sustancias vitales y desechos a lo largo de todo su organismo. El objetivo de este trabajo fue la obtención de una matriz descelularizada a partir de la especie de hoja vegetal *Iresine herbstii*. El proceso de descelularización permite obtener las estructuras organizadas del sistema vascular de las plantas libres de células, uno de los principales componentes de estas estructuras es la celulosa, que es un biomaterial que ha sido ampliamente usado en la ingeniería de tejidos ya que facilita la adhesión, proliferación y diferenciación celular. La estructura descelularizada se obtuvo utilizando una mezcla de soluciones de NaClO y NaHCO₃ (0.5 y 2 w/v %) a temperatura y agitación controlada (70°C, 250 rpm). La conservación de las hojas fue en PBS X1 a 20°C. Se realizó la caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar las dimensiones de las estructuras obtenidas, cuantificación de proteínas por el método de Bradford, para comparar que la hoja descelularizada tenga un contenido proteico menor que la hoja fresca, estudios de perfusión, para comprobar la conservación del sistema vascular de la hoja, así como pruebas mecánicas para evaluar la resistencia de las estructuras. Estos datos demuestran el potencial que posee el uso de los tejidos de plantas descelularizados como andamios celulares con posible aplicación en la ingeniería tisular, lo que podría proporcionar una importante estrategia para la regeneración de masa tisular vascularizada y la liberación de sustancias.

Palabras clave: descelularización, ingeniería de tejidos, biomateriales.

***Autor Corresponsal:** 192964@iberopuebla.mx

Introducción

Las plantas transportan nutrientes, sustancias vitales y desechos a lo largo de su organismo a través de una red de capilares subdivididos que componen su sistema vascular. Esta función a su vez permite el crecimiento y proliferación de las células a partir de los andamios celulares desarrollados por la matriz extracelular. Una estructura caracterizada por su estabilidad gracias a biomoléculas que la componen y le permiten ejercer las funciones celulares propias de la vida. Las paredes celulares de las plantas están formadas por polisacáridos, celulosa, pectina y proteínas que interactúan formando una red paracristalina entre tejidos según el estado de diferenciación celular, clasificación de la especie y los factores ambientales. Aún con las diferencias que existen entre plantas, las hojas poseen propiedades universales propias de las células vegetales; al interior de estas el transporte de nutrientes es dividido a través de venas que conforman el tejido vascular e interactúan con el tejido fundamental [1].

Las venas secundarias se conectan a la nervadura, una vena mayor unida al pecíolo y su vez al tallo de la planta permitiendo el transporte de nutrientes hasta las hojas. El sistema vascular de las plantas está compuesto por el xilema y el floema que además de participar en el crecimiento de las plantas también son tejidos de soporte de partes aéreas y

permiten la comunicación debido a las señales hormonales que viajan sobre estos conductos [2,3].

Uno de los componentes más importantes de la hoja es la celulosa, un biopolímero abundante en la naturaleza y ampliamente utilizado en la fabricación de biomateriales, es una sustancia fibrosa, resistente e insoluble en agua que se encuentra en las paredes celulares protectoras de las plantas. Su estructura es lineal y está formada por 2000 a 14000 unidades de β -(1,4) glucosa en cadenas no ramificadas, unidas entre sí con enlaces hidrógeno [4].

Cuando un organismo sufre una lesión y la matriz extracelular queda expuesta, los tejidos vasculares pueden verse obstruidos en diversos grados y no permitir la circulación de nutrientes y sustancias orgánicas necesarias para la supervivencia de una planta o animal teniendo una respuesta coagulante [5].

El tratamiento para la cicatrización de heridas que dañan el tejido son procesos costosos, largos y dinámicos en los que intervienen distintos factores, por ejemplo, las características de la lesión y la zona en la que está ubicada. Una alternativa a la problemática antes mencionada es el cultivo de células en andamios colocados en el sitio dañado, esos andamios funcionan como soporte para células y proveen una base tridimensional para que las células proliferen produciendo matriz extracelular [6, 7].

La cicatrización es un proceso biológico que ocurre en respuesta a una lesión o daño en la piel o tejidos del cuerpo. Desde la antigüedad, la humanidad ha estado fascinada con el proceso de curación de heridas y ha buscado formas de acelerar y mejorar este proceso natural [8]. En el siglo XIX, el microbiólogo francés Louis Pasteur descubrió que las infecciones eran una de las principales causas de la falla en la cicatrización. A lo largo del siglo XX, se desarrollaron y refinaron diversas técnicas y productos para la curación de heridas, como las vendas adhesivas y los apósitos. En la actualidad, la investigación en cicatrización de heridas se enfoca en desarrollar tratamientos avanzados, como terapias génicas y terapias con células madre, para mejorar la curación de heridas en casos más graves y complejos [9].

Para esto, los andamios insertados en las zonas afectadas como soporte de estas redes celulares interconectadas deben ser capaces de tolerar la regeneración de dichos tejidos según sus propiedades físicas, biológicas, morfológicas y mecánicas, así como su capacidad para adaptarse al nuevo ambiente. Los andamios de polímeros naturales tienen una mejor respuesta biológica [10].

La descelularización es un proceso que implica el aislamiento de la matriz extracelular, en el que se elimina el material celular, dejando únicamente la estructura (celulosa) de la hoja [11]. Este proceso ha sido utilizado en la investigación médica y en ingeniería de tejidos para crear andamios para el crecimiento de células y tejidos artificiales. El concepto de descelularización surgió en la década de 1990 para producir un reemplazo sintético para los órganos dañados, sin tener que preocuparse por el rechazo del tejido por parte del sistema inmunológico del paciente. Desde entonces, la descelularización ha sido utilizada en una variedad de aplicaciones, incluyendo la creación de injertos vasculares y regeneración de cartílago y hueso. Sin embargo, aún hay desafíos técnicos que deben abordarse antes de que la descelularización se convierta en una opción viable para la medicina regenerativa [12].

La matriz extracelular es un conjunto multifuncional a partir de organismos pluricelulares, de suma importancia para obtener tejidos, obtenido a partir de la descelularización, al cual le quitan sus células nativas dejando únicamente el molde. En donde a partir de características morfológicas, permite mantener propiedades, así como funciones que caracterizan a los tejidos. Algunas de las propiedades que conforman a esta matriz extracelular es su capacidad para mantener la fisiología celular, así como su resistencia, dureza, hidratación y elasticidad las cuales dependen de ella. Por lo que su estudio y obtención cobra importancia al proporcionar a tejidos, así como a órganos su correcto funcionamiento [3].

Metodología

Proceso de Descelularización

Se eligen hojas sanas, sin daños físicos, de un largo aproximado de 4 a 6 cm y de un ancho aproximado de 2 a 3cm, lavar las hojas *Iresine herbstii* bajo agua de la llave y detergente líquido por 1 minuto, posteriormente sumergir en

agua destilada de 2-4 minutos a temperatura ambiente, considerando un rango de temperatura de 25 a 30 °C, cuidando que todas las muestras se sumerjan completamente. Posteriormente se prepara una solución de NaClO (0.5w/v), NaHCO₃ (2w/v), en una solución de 500ml de H₂O. Las cantidades para la solución son 15g, 45ml y 440ml se coloca la concentración en la unidades correspondientes. Calentar la solución en una campana de humos a 70 °C y mantener en agitación durante todo el proceso a 250rpm de calentamiento. Una vez que la solución alcance la temperatura deseada, se sumergen las muestras y se baja la agitación a 60rpm. Posteriormente, cuando las muestras se hayan aclarado visiblemente, se retiran del baño con cuidado. Se incuban las muestras en una solución de PBS x1 hasta el momento de su uso. Las muestras fueron almacenadas en recipientes sellados a temperatura ambiente (considerando la temperatura de Puebla, México 25- 30°C) hasta su uso.

Para verificar que las hojas descelularizadas se obtuvieron de manera correcta se realizaron pruebas físicoquímicas.

Imágenes Microscópicas

Se retira la hoja descelularizada de la solución de PBS x1 y se coloca una muestra en un portaobjetos de vidrio, se ajusta para su observación en el microscopio óptico de campo claro, modelo Zeiss Primo Star Binocular Microscope a un aumento de 10x.

Cuantificación de Proteínas

Se realiza utilizando el método de Bradford, empezando por triturar de manera individual una hoja fresca y una hoja descelularizada, se colocan los volúmenes adecuados en cada tubo. En la Tabla 1, se registraron las cantidades utilizadas para llevar a cabo la prueba de Bradford. Los primeros seis tubos son de la hoja fresca, los siguientes tubos son de la hoja descelularizada.

Tabla 1: Tubos utilizados para la prueba de Bradford.

Muestra	1	2	3	4	5	6
Agua destilada (ul)	100	90	80	60	50	30
Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1
Alicuota (ul)	0	10	20	40	50	70
Volumen final (ml)	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Tubo	7	8	9	10	11	12
Agua destilada (ul)	100	90	80	60	50	30
Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1
Alicuota (ul)	0	10	20	40	50	70
Volumen final (ml)	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1

Después de agregar todo, se agita en un vórtex hasta visualizar la presencia de azul en el tubo, se observan las muestras en el espectrofotómetro de UV-visible. Para la absorbancia se calibra utilizando PBS x1, posteriormente se agregan 3ml del tubo de ensayo a la celda de cuarzo, se registra la lectura y se repite con cada tubo. Por último, se grafican los datos correspondientes de cada hoja estudiada.

Estudio de difusividad

La solución de PBS x1 se retira de la caja petri donde se conservó la hoja descelularizada. Luego se utiliza una jeringa nueva y estéril de 8-6mm, siendo preferible un diámetro más pequeño, y se llena con un tinte vegetal de color azul. Se introduce la jeringa en la entrada del tallo de la hoja y se observa cómo el tinte se desplaza a través de los canales vasculares de la hoja.

Prueba Mecánica

Se emplean pinzas de laboratorio, una espátula, un portaobjetos y guantes para el manejo manual. Para cada material, se selecciona la hoja del nervio central y se examina su manipulación física.

Prueba de Secado de Hoja

Se extrae la solución de PBS x1 de la caja petri donde se conservó la hoja descelularizada, y se repite el proceso con otra hoja. Luego, ambas hojas se dejan a temperatura ambiente durante alrededor de dos horas y media. Durante este tiempo, se pesan las hojas en una báscula digital analítica cada 10 minutos y se registran los valores de peso obtenidos.

Resultados y Discusión

Proceso de Descelularización

Tras el baño de cloro propuesto en la metodología se obtuvo la matriz extracelular observada en la Fig. 1 muestra a la hoja descelularizada, es decir, libre de clorofila.



Fig. 1. Matriz descelularizada de *Iresine herbstii* con dimensiones de 3 cm de largo y 3 cm de ancho.

Imágenes Microscópicas

En la Fig. 2 a escala microscópica dentro de la matriz descelularizada de la hoja se puede visualizar el sistema vascular que en la mayoría de los ejemplares se encontraban intactos. Sin embargo, en algunos ensayos muchas de las hojas descelularizadas presentaban mínimos restos de clorofila que no afectaban al flujo de los canales.



Fig. 2. Matriz descelularizada al microscopio

Cuantificación de Proteínas

Los niveles de absorbancia de las hojas descelularizadas y frescas son comparados según los resultados de la prueba de Bradford donde se reconoció que las mayores concentraciones de proteínas se encuentran las hojas frescas. En la Fig. 3 muestra el comportamiento gráfico de la absorbancia de la hoja fresca, en la que se tiene un comportamiento ascendente, con ligeras variaciones. Mientras que en la Fig.4 de igual forma se muestra la absorbancia obtenida a partir de la hoja descelularizada en la que de igual forma se tiene un incremento que tiende a lineal.



Fig. 3. Comportamiento gráfico de la absorbancia de la hoja fresca



Fig. 4. Comportamiento gráfico de la absorbancia de la hoja descelularizada

Estudio de difusividad

La funcionalidad de los canales vasculares pudo ser comprobada a partir de esta prueba que a escala microscópica en la Fig. 5 se observa la perfusión del colorante desde el peciolo hacia el ápice, pasando por el tejido vascular. En la Fig. 6 se observa una vista microscópica que muestra la difusión del colorante en una vista desde el peciolo, este colorante también se difunde por las vasculares.



Fig. 5. Estudio de difusividad visto desde el peciolo, microscopio de disección “LEIKA”.

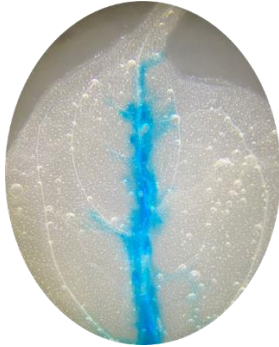


Fig. 6. Estudio de difusividad visto desde el ápice, microscopio de disección “LEIKA”.

A partir de la Eq (1) se obtuvo el coeficiente de difusividad, para ello fue necesario obtener los pesos moleculares presentados en la Eq (2), a partir de la cual se sustituyó en la Eq (1), teniendo como resultado la Eq (3), en la cual se tiene como producto el valor del coeficiente de difusividad. La Eq (4) muestra el resultado.

$$D_{AB} = \frac{0.001858 T^{\frac{3}{2}} \left[\frac{1}{MA} + \frac{1}{MB} \right]^{\frac{1}{2}}}{P \sigma_{AB}^2 \Omega_D} \quad (1)$$

Donde:

D_{AB} = Difusividad en masa de A a través de B (cm^2/s)

T = Temperatura absoluta (K)

MA = Peso molecular de A (g/mol)

MB = Peso molecular de B (g/mol)

P = Presión absoluta (atm)

σ_{AB} = Diámetro de colisión (Parametro de Lennard-Jones)

Ω_D = Integral de choque para la difusión molecular (Parametro de Lennard-Jones)

$$\sqrt{AB} = \frac{\sqrt{78.11 \text{ g/mol}} + \sqrt{172.98 \text{ g/mol}}}{2} \quad (2)$$

Donde:

A = Peso molecular de Celulosa (g/mol)

B = Peso molecular de Agua/Colorante (g/mol)

$$D_{AB} = \frac{0.001858 (299.75 \text{ K})^{\frac{3}{2}} \left[\frac{1}{78.11} + \frac{1}{172.98} \right]^{\frac{1}{2}}}{(0.77878 \text{ atm})(10.99)^2 (2.641)} \quad (3)$$

$$D_{AB} = 0.0052913 \text{ cm}^2/\text{s} \quad (4)$$

En el caso de este proyecto, significa mayor selectividad y distribución puntual del colorante vegetal azul en los canales vasculares de la matriz extracelular.

Prueba Mecánica

Una vez que las hojas descelerizadas fueron incubadas en PBS X1. En la fig. 7 se muestra una comparación del estado de la hoja descelerizada antes y después de ser sumergida en PBSX1. En la figura 8 se observa la manipulación por parte del equipo donde se observa la resistencia de la hoja tras su tratamiento con PBS adquiriendo una mayor estabilidad para su manipulación sin romperse ni perder grosor ante el movimiento y la aplicación de fuerza

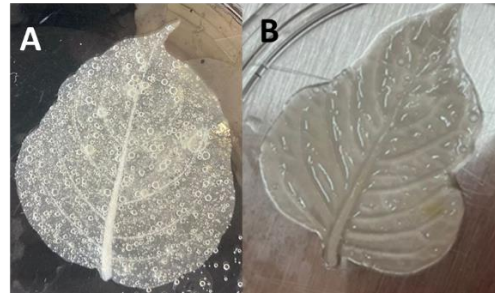


Fig. 7. A) Matriz recién descelerizada. B) Matriz descelerizada conservada en PBS x1.

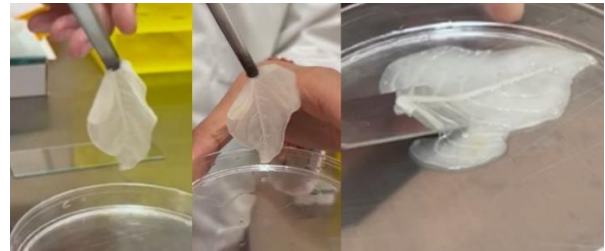


Fig. 8. Pruebas mecánicas

Prueba de Secado de Hoja

Prueba realizada por duplicado con dos hojas descelerizadas con características similares de acuerdo con su peso y tamaño donde su peso neto disminuyó conforme a la evaporación del agua en condiciones de 26.6°C y 20% de humedad. Al ser observadas microscópicamente ambas hojas, se obtuvo en la Fig. 9 el resultado de secado durante dos horas con 40 minutos en el que los canales vasculares están sin daños, al igual que en la Fig. 10 con la diferencia de que, al ser 0.5cm más grande y 0.4056gr más pesada, contaba con mayor gramaje.

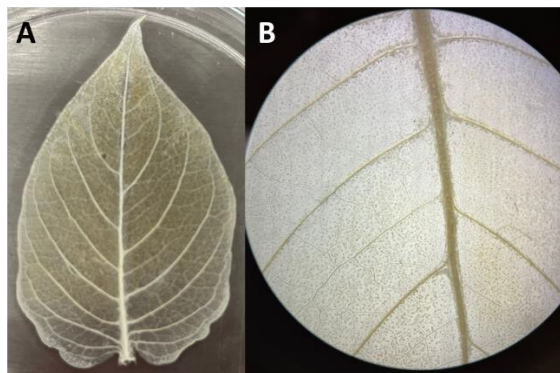


Fig. 9. A) Hoja 1 descelularizada seca. B) Vista microscópica de la hoja 1 descelularizada seca, microscopio de disección "LEIKA".

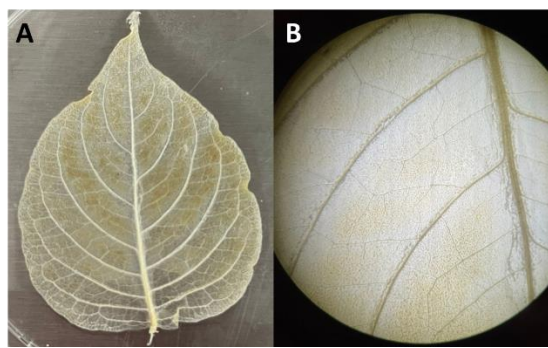


Fig. 10. A) Hoja 2 descelularizada seca. B) Vista microscópica de la hoja 2 descelularizada seca, microscopio de disección "LEIKA".

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Este artículo se centra en la importancia del sistema vascular en las plantas, específicamente en la hoja, y cómo esto ha inspirado la creación de andamios celulares para el tratamiento de lesiones y heridas en humanos y animales. El artículo destaca la importancia de la celulosa, un biopolímero que se encuentra en las paredes celulares de las plantas, y cómo la descelularización puede utilizarse para crear andamios para el crecimiento de células y tejidos artificiales. Además, se menciona la historia de la cicatrización de

heridas y cómo la investigación actual se enfoca en desarrollar tratamientos avanzados como terapias génicas y terapias con células madre para mejorar la curación de heridas en casos más graves y complejos. La descelularización es una técnica prometedora que puede revolucionar la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Sin embargo, se necesita más investigación de este tema, para conocer con certeza sus posibles alcances y usos a nivel médico e industrial.

Referencias

1. Streuli, C., Bailey, M. y Bissell, M., 1991. **Control of Mammary Epithelial Differentiation: Basement Membrane Induces Tissue-specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell Interaction and Morphological Polarity.** *The Journal of Cell Biology*, vol. 115, no. 5, pp. 1383-1395
2. Gonzalez, A., 2019. **Parénquima.** *Morfología de Plantas Vasculares.*
3. Crang, R., Lyons-Sobaski, S., Wise, R. y Sachs, J. 2018. **Sostén- Tejidos vegetales.** *Atlas de histología vegetal.* https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guیدا_v_sosten.php (Activo Abril de 2023).
4. Pineda, L., Caicedo, M. y Riascos, M. 2012. **Técnicas de fermentación y aplicaicones de la celulosa bacteriana: una revisión.** *Ing. Cienc*, vol. 8, no. 16, p. 28
5. Taylor, D. y Kren, S., 2016. **Métodos de recelularización de un tejido u órgano para una mejor capacidad de transplante.** *España Patent 2 562 707.*
6. Courtenat, M., Johns, F., Galembeck, C. Deneke, E., Lazoni, C., Costa, J., Scott, J. y Sharma, R. 2017. **Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering.** *Cellulose*, no. 24, p.14.
7. Carrillo, K., Peralta, E., González, L., Espinosa, J., Cuevas, D., Gastelum, J., Osornio, A., Calderón, A., Donohue, C. y Valera, E. 2021. **Elaboración de matrices de celulosa con propiedades antimicrobianas para su aplicación en periodoncia.** *Rev Mex Periodontol*, no. 12, p.5.
8. Guo, S. y Diprieto, L. 2010. **Factors affecting wound healing.** *Journal of Dental Reserarch*, 89 (3), 219-229. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20139336/> (Activo Abril de 2023).
9. Singer, A., Clark, R. 1999. **Cutaneous wound healing.** *The New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10471461/> (Activo Abril de 2023).
10. Negrini, C., Toffoletto, N., Farè, S. y Altomare, N. 2020. **Plant Tissues as 3D Natural Scaffolds for Adipose, Bone and Tendon Tissue Regenation.** *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*, vol.8, no. 723, p.15.
11. Crapo, M., Gilbert, W. y Badylak, F. 2011. **An overview of tissue and whole organ decellularization processes.** *Biomaterials*, 32(12), 3233-3243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296410/> (Activo Abril de 2023).
12. Baptista, M., Siddiqui, M., Lozier, G., Rodriguez, R., Atala, A. y Soker, S. 2011. **The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid.** *Hepatology*, 53(2), 604-617. [The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296410/) (Activo Abril de 2023).

13. Hickey, R. y Pelling, A. 2019. **Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7.
14. Adamski, M. 2018. **Two Methods for Decellularization of Plants Tissue Engineering Applications**. *Journal of Visualized Experiments*, vol.1, no. 135, pp. 1-7.