

A4. INDUSTRIALIZACIÓN DEL RECURSO: ELABORACIÓN DE BIOMATERIALES PARA LA EXPLOTACIÓN COMERCIAL DE MEDUSAS

**A4.1 Elaboración de soluciones de colágeno para cultivos
celulares bidimensionales y ensayos de regeneración en
cultivo de fibroblastos.**



Cofinanciado por
la Unión Europea



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN



Fondos Europeos



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir



**Institut
de Ciències
del Mar**

**EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA**

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

1. ELABORACIÓN DE SOLUCIONES DE COLÁGENO PARA CULTIVOS CELULARES BIDIMENSIONALES Y ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR

1.1. OBJETIVO

Elaborar y evaluar soluciones de colágeno obtenidas a partir de medusas de la especie *Rhizostoma pulmo* para su aplicación en cultivos celulares bidimensionales y ensayos de adhesión celular, comparando su desempeño frente a colágeno comercial de rata.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Recogida de medusas

Los especímenes de *R. pulmo* se obtuvieron como captura accidental de la pesca artesanal en el marco del proyecto COLMED, con la colaboración de las cofradías de pescadores de Jávea y Moraira (Comunidad Valenciana). Las medusas se recolectaron durante faenas de pesca con redes de trasmallo, dirigidas a la captura de salmonete (*Mullus surmuletus*), frente a la costa de Jávea y Moraira (Alicante, España). Tras la captura, las medusas fueron retiradas cuidadosamente de las redes y transferidas a contenedores con agua de mar. En el laboratorio de la Universidad Católica de Valencia (UCV), los ejemplares se enjuagaron con agua de mar filtrada para eliminar sedimentos y residuos, se fragmentaron en porciones de aproximadamente 3 cm y se almacenaron en bolsas herméticas a -20 °C hasta su liofilización y posterior procesamiento.

1.2.2. Extracción de colágeno

La extracción de colágeno se realizó siguiendo el protocolo del proyecto COLMED (FV3.1). Brevemente, el colágeno se obtuvo a partir del polvo liofilizado de *R. pulmo* mediante un tratamiento alcalino para eliminar proteínas no colagénicas, seguido de extracción en 0.5 M de ácido acético bajo agitación continua. Tras la eliminación de residuos insolubles por centrifugación, el colágeno se precipitó mediante adición de sal, se recuperó por centrifugación, se solubilizó en ácido acético y se purificó mediante diálisis. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C para preservar la integridad del colágeno.

1.2.3. Caracterización del colágeno

La pureza y el peso molecular del colágeno extraído se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). La concentración de proteínas se determinó mediante ensayo colorimétrico comercial (*Rapid Gold BCA Protein Assay Kit*). Las muestras se mezclaron con tampón de carga con

SDS, se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos y se compararon con colágeno tipo I comercial utilizado como patrón. Tras la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida, los geles se fijaron y se tiñeron para visualizar las bandas correspondientes al colágeno.

1.2.4. Preparación de soluciones de colágeno

Una vez comprobada la integridad del colágeno extraído, se prepararon soluciones tanto del colágeno obtenido de *R. pulmo* como de colágeno comercial de rata. Ambos colágenos se diluyeron en agua estéril hasta alcanzar concentraciones finales de 0, 1, 5, 10 y 20 µg/ml, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso en los ensayos de adhesión celular.

1.2.5. Ensayo de adhesión celular

La adhesión celular se evaluó utilizando células HeLa (línea celular epitelial humana inmortalizada derivada de un carcinoma de cérvix) con el objetivo de comparar la capacidad adhesiva de placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno de *R. pulmo* y colágeno comercial de rata como control. Para cada tratamiento y concentración (0, 1, 5, 10 y 20 µg/ml) se realizaron tres réplicas experimentales. Las placas se lavaron con PBS y se recubrieron con las correspondientes soluciones, incubándose durante la noche a 4 °C. Tras el recubrimiento, los pocillos se lavaron con PBS y se bloqueó la unión inespecífica mediante incubación con BSA al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente.

Las células HeLa se desprendieron con tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio de cultivo sin suero a una concentración de 2×10^5 células/ml y se sembraron 2×10^4 células por pocillo. Después de una incubación de 30 min a 37 °C, las células no adheridas se eliminaron mediante lavados con PBS. Las células adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 min, se tiñeron con cristal violeta al 0,1 %, se lavaron y se dejaron secar. Finalmente, el colorante retenido se solubilizó con SDS al 1 %, y la adhesión celular se cuantificó midiendo la absorbancia a 550 nm mediante un lector de placas.

Los datos de adhesión celular se expresaron como valores de absorbancia y se obtuvieron a partir de las tres réplicas independientes para cada tratamiento y concentración. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para evaluar el efecto de la concentración de colágeno sobre la adhesión celular. En aquellos casos en los que el ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar diferencias entre grupos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$. El análisis estadístico se realizó de forma independiente para el colágeno comercial de rata y para el colágeno de *R. pulmo*.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Caracterización del colágeno extraído

La concentración total de proteínas del extracto de colágeno obtenido a partir de *R. pulmo* se determinó mediante *Rapid Gold BCA Protein Assay Kit*, obteniéndose un valor medio de $1,82 \pm 0,43 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El análisis mediante SDS-PAGE se realizó con el objetivo de evaluar el perfil molecular del colágeno extraído de *R. pulmo*, procedente de capturas accidentales de la pesca artesanal, y compararlo con colágeno tipo I comercial de rata, utilizado como referencia (**Figura 1**). El colágeno extraído de *R. pulmo* mostró un patrón de bandas compatible con el de un colágeno fibrilar, caracterizado por la presencia de dos cadenas α principales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), con pesos moleculares aproximados de 150 y 160 kDa, respectivamente, así como una banda correspondiente a la cadena β , con un peso molecular cercano a 260 kDa.

En comparación, el colágeno tipo I de rata presentó las bandas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ esperadas, con pesos moleculares aproximados de 129 y 139 kDa, así como una banda β en torno a 260 kDa. La similitud en el patrón electroforético entre ambas muestras sugiere que el colágeno extraído de *R. pulmo* no se encuentra degradado y que el proceso de extracción mantiene su estructura nativa. Esto se evidencia por la ausencia de bandas de bajo peso molecular que normalmente indicarían fragmentación proteica o degradación del colágeno durante los diferentes tratamientos. No obstante, en el colágeno de *R. pulmo* se detectó una banda adicional en el rango de 90–100 kDa, ausente en el colágeno de rata, que podría corresponder a proteínas asociadas al colágeno propias de esta especie.

Cabe destacar que las bandas observadas en el gel correspondiente al colágeno de *R. pulmo* presentaron una intensidad relativamente baja en comparación con el control (colágeno comercial de rata). Esta menor intensidad podría atribuirse a problemas de solubilidad del extracto, observados durante la preparación de las muestras, que habrían impedido que la totalidad del colágeno cargado migrara de manera homogénea a través del gel.

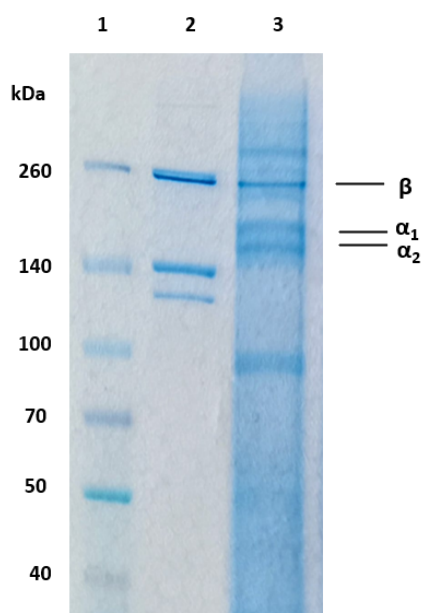


Figura 1. Análisis SDS-PAGE (1) Marcadores de peso molecular. (2) Colágeno tipo I de cola de rata (3) Colágeno de *Rhizotoma pulmo*.

1.3.2. ADHESIÓN CELULAR

La adhesión celular de células HeLa se evaluó en placas recubiertas con soluciones de colágeno a distintas concentraciones (0, 1, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), comparando colágeno comercial de rata y colágeno extraído de *R. pulmo*. La adhesión se cuantificó mediante medición de absorbancia tras tinción con cristal violeta.

En las placas recubiertas con colágeno de rata se observó un aumento significativo de la adhesión celular en función de la concentración de colágeno (**Figura 2A**). El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($P < 0,0001$), las cuales fueron confirmadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, indicando una respuesta de adhesión claramente dependiente de la concentración.

En contraste, en las placas recubiertas con colágeno extraído de *R. pulmo* no se detectaron diferencias significativas en la adhesión celular entre las distintas concentraciones ensayadas (**Figura 2B**). El análisis mediante ANOVA de un factor no mostró efectos estadísticamente significativos ($P = 0,5394$), lo que sugiere una respuesta de adhesión similar a lo largo de todo el rango de concentraciones evaluado. Dado que el colágeno es un componente ampliamente reconocido por su capacidad para promover la adhesión celular, cabría esperar un comportamiento dependiente de la concentración similar al

observado con el colágeno de rata. Sin embargo, esta tendencia no se evidenció en el caso del colágeno de *R. pulmo*.

Este trabajo constituye un estudio preliminar sobre la preparación y evaluación de soluciones de colágeno obtenidas a partir de medusas de captura accidental. La ausencia de diferencias significativas en el caso del colágeno de *R. pulmo* podría estar relacionada con limitaciones en la solubilidad y homogeneidad de las soluciones de colágeno obtenidas. Durante la preparación de las soluciones se observó la presencia de material no completamente solubilizado, lo que podría haber afectado a la concentración efectiva de colágeno disponible para el recubrimiento de los pocillos. Esta falta de homogeneidad podría dificultar la correcta correlación entre la concentración de colágeno y la respuesta de adhesión celular, enmascarando posibles efectos dependientes de la concentración. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de seguir trabajando en la optimización de las condiciones de solubilización del colágeno de medusa antes de su evaluación funcional en sistemas celulares.

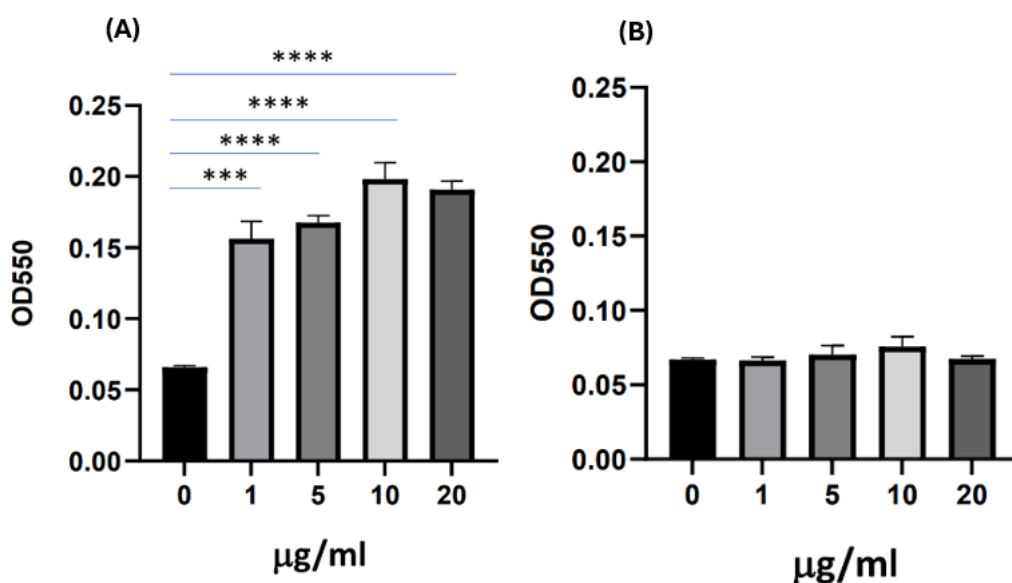


Figura 2. Ensayo de adhesión celular de células HeLa en placas recubiertas con colágeno. **(A)** Adhesión celular en función de la concentración de colágeno de rata, evaluada mediante medición de absorbancia. (***) $P = 0,0001$; (****) $P < 0,0001$). **(B)** Adhesión celular en función de la concentración de colágeno de *Rhizostoma pulmo*.

2. ENSAYOS DE REGENERACION EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS

2.1. OBJETIVO

Este estudio tiene como objetivo determinar si existen diferencias en la adhesión celular y la capacidad de cicatrización (wound healing) en fibroblastos humanos cultivados sobre recubrimientos de colágeno de *R. pulmo*.

2.2. METODOLOGÍA

Los especímenes de *R. pulmo* se obtuvieron en el marco del proyecto COLMED, gracias a la colaboración de las cofradías de pescadores de Roses y Port de la Selva (Cataluña). El colágeno empleado fue previamente extraído en la Universidad de Oviedo por el personal científico del ICM-CSIC. Finalmente, para verificar la integridad del colágeno obtenido antes de su uso en el ensayo de regeneración, se realizó una caracterización mediante SDS-PAGE.

2.2.1. Ensayo de viabilidad

Para evaluar la viabilidad celular en cultivos de fibroblastos humanos sembrados sobre distintos recubrimientos, se utilizó un ensayo con resazurina, un indicador redox sensible a la actividad metabólica. La resazurina, en su forma oxidada (color azul), es reducida por enzimas mitocondriales de células viables a resorufina, un compuesto de color rosa y fluorescente. Este cambio de color permite cuantificar indirectamente el número de células vivas, ya que las células no viables no generan fluorescencia. El ensayo es no destructivo, lo que permite realizar lecturas repetidas en distintos tiempos.

Los fibroblastos se cultivaron sobre placas de cultivo recubiertas con colágeno de *R. pulmo*, colágeno comercial de rata y un control sin recubrimiento (blanco). En cada uno de los tiempos de muestreo (0 h, 24 h y 48 h), se añadieron 10 µL de resazurina a cada pocillo con 100 µL de medio. Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 12 horas antes de la lectura. Posteriormente, se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas. La intensidad de absorbancia es proporcional a la actividad metabólica de las células: valores bajos indican posible toxicidad del sustrato o baja viabilidad celular.

2.2.2. Ensayo de adhesión

Se preparó una placa de 24 pocillos recubierta (coating) con colágeno de rata y colágeno de *R. pulmo*, utilizando dos réplicas por condición. En cada pocillo se depositaron 30 µg de colágeno y se dejaron a 37 °C durante una hora para favorecer la adsorción a la superficie plástica.

Tras este periodo, se lavaron los pocillos con PBS para eliminar el exceso de colágeno, y se sembraron 40.000 fibroblastos humanos por pocillo. Una hora después, momento en el que ya se observaba una adhesión celular incipiente, se aspiró cuidadosamente el medio para no desprender las células adheridas, y se procedió a la tinción con cristal violeta.

Se añadieron aproximadamente 500 μ L de cristal violeta a cada pocillo, vertiendo el colorante lentamente contra la pared para evitar la alteración del cultivo. La placa se dejó reposar durante 20 minutos bajo campana. A continuación, se retiró el colorante y se realizaron lavados suaves con agua para eliminar el exceso. Una vez retirada toda el agua, se dejó secar la placa durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 300 μ L de metanol por pocillo para solubilizar el cristal violeta fijado a las células adheridas. La placa se cubrió con film y se agitó a 50 rpm durante 15 minutos. Como la disolución del colorante no fue completa, se extendió la agitación 15 minutos adicionales. Finalmente, se transfirieron 200 μ L del metanol de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. La intensidad de la señal es proporcional al número de células adheridas en cada condición.

2.2.3. Ensayo de cicatrización (scratch wound healing)

Se preparó una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno de rata y colágeno de *R. pulmo*, incluyendo un control sin recubrimiento (Blanco), con dos réplicas por condición. En cada pocillo se añadieron 20 μ g de colágeno disueltos en 400 μ L de PBS, y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Tras eliminar el sobrenadante y realizar un lavado con PBS, las placas se almacenaron a 4 °C con PBS hasta el momento de sembrar las células. Posteriormente, se sembraron 300.000 fibroblastos humanos por pocillo y se incubó la placa durante toda la noche para favorecer la adhesión y expansión celular.

Al día siguiente, se realizó un "scratch" (herida) vertical en el centro de cada pocillo utilizando una punta de pipeta estéril. Tras el raspado, se lavaron los pocillos con PBS para eliminar las células desprendidas y se añadió medio fresco. La placa se colocó en un microscopio de fluorescencia con control ambiental (37 °C, 5 % CO₂, atmósfera húmeda) y se programó para capturar imágenes de cada pocillo durante un periodo de 24 horas.

Finalizado el experimento, se exportaron los archivos en formato ".czi" y se seleccionaron imágenes correspondientes al tiempo 0 h y a un punto intermedio

antes del cierre completo de la herida (aproximadamente 7 h). Las imágenes se procesaron con el software ImageJ: se aplicó corrección de fondo y filtrado de banda mediante macros automatizadas, seguido de la aplicación de un umbral manual para resaltar el área libre de células. Finalmente, se utilizó el plugin de wound healing descrito por Suarez-Arnedo et al. (2020) para medir el área sin células. Se calculó el porcentaje de cierre de la herida como:

$$\% \text{ wound healing} = (\text{Área}_{0h} - \text{Área}_{7h}) / \text{Área}_{0h} \times 100.$$

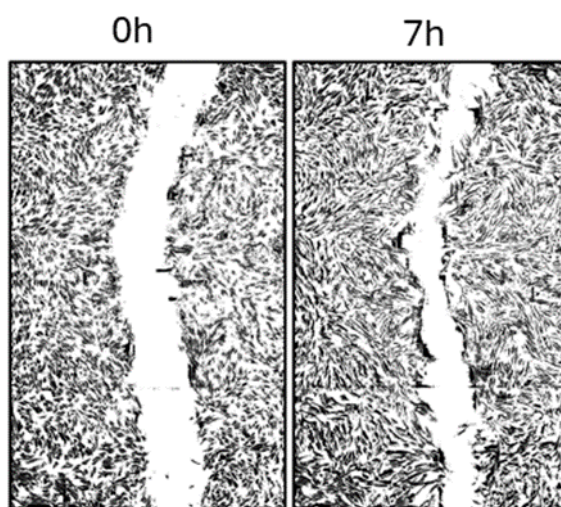


Figura 3. Fotografías después del tratamiento de imagen del mismo cultivo de fibroblastos humanos en el momento de la herida (0h) y tras 7 horas de cicatrización (7h).

2.3. RESULTADOS

En relación con la integridad del colágeno de *R. pulmo* extraído, el gel SDS-PAGE mostró varias bandas correspondientes a distintos pesos moleculares: tres bandas bien definidas, con pesos moleculares aproximados de 15, 25 y 37 kDa (**Figura 4**). Este patrón indica que el colágeno utilizado se encuentra parcialmente degradado. En consecuencia, los ensayos posteriores deben considerarse como una prueba de concepto, teniendo en cuenta el estado de degradación del colágeno empleado y, por tanto, que las conclusiones derivadas deben interpretarse con cautela.

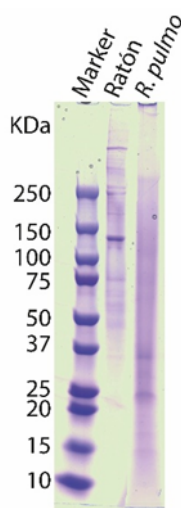


Figura 4. SDS-PAGE del colágeno extraído comparado con el colágeno control (Ratón).

2.3.1. Ensayo de viabilidad

La evolución de la actividad metabólica en los fibroblastos humanos cultivados bajo distintas condiciones experimentales se evaluó mediante el ensayo con resazurina (**Figura 5**). No se observa una disminución de la señal en ninguna de las condiciones a lo largo del tiempo, lo que indica que los recubrimientos de colágeno de *R. pulmo* no generan efectos tóxicos sobre los fibroblastos humanos y, por tanto, son viables como soporte celular.

A las 48 horas, se observa un aumento generalizado de la actividad metabólica, probablemente asociado al inicio de la proliferación celular. Aunque no puede establecerse una comparación directa en cuanto a eficacia debido a la posible degradación del colágeno de medusa durante el proceso de extracción, los datos sugieren una tendencia hacia una mayor proliferación en los recubrimientos con colágeno de medusa en comparación con los de colágeno de rata.

Esta observación debe interpretarse con cautela, ya que el análisis estadístico realizado no mostró diferencias significativas entre condiciones ($p = 0,179$), aunque sí entre los distintos tiempos de incubación ($p < 0,05$), lo cual es coherente con el patrón observado en el gráfico.

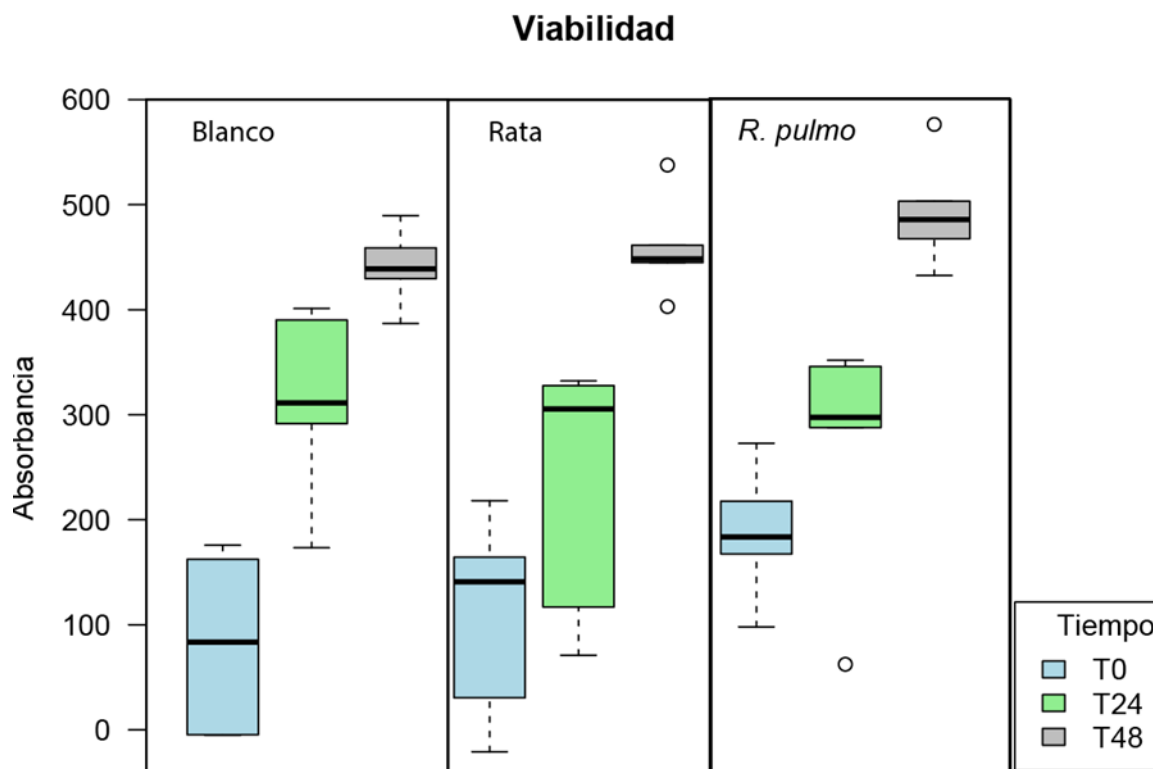


Figura 5. Resultados del ensayo de viabilidad en fibroblastos humanos

2.3.2. Ensayo de adhesión

Los resultados del ensayo de adhesión, obtenidos mediante tinción con cristal violeta, indican que los fibroblastos se adhieren en menor proporción al colágeno de *R. pulmo* en comparación con el colágeno de rata, que se utilizó como control positivo (**Figura 6**). Esta diferencia sugiere que la estructura del colágeno influye de forma importante en la capacidad de adhesión celular.

No obstante, las diferencias observadas entre condiciones no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,27$), por lo que se requeriría un mayor número de réplicas o una mejora en la calidad del colágeno de medusa para confirmar esta tendencia.

En este caso, el colágeno de *R. pulmo* presentaba signos de degradación, mientras que el colágeno de rata mantenía su integridad estructural. Es probable que dicha degradación haya afectado negativamente la interacción célula-matriz, reduciendo la eficiencia de adhesión de los fibroblastos sobre el recubrimiento de medusa.

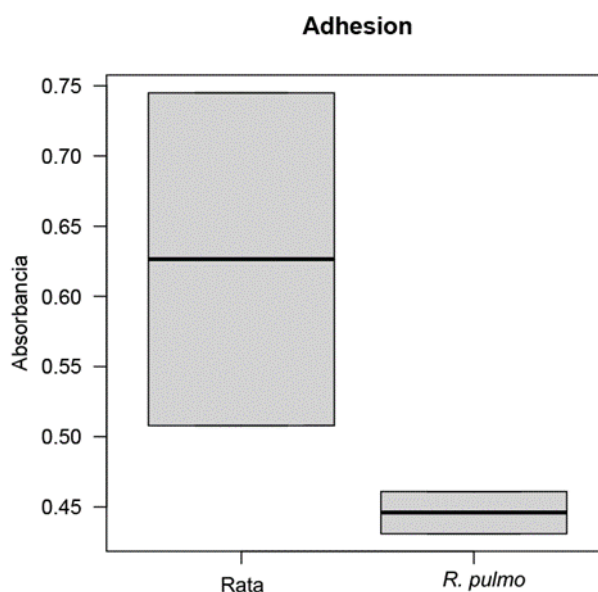


Figura 6. Resultados del ensayo de adhesión en fibroblastos humanos

2.3.3. Ensayo de cicatrización (scratch wound healing)

La regeneración celular tras la realización de la herida (scratch) se cuantificó a las 7 horas, revelando una mayor recuperación de superficie celular en los pocillos recubiertos con colágeno de medusa en comparación con los de colágeno de rata y el control sin recubrimiento (**Figura 7**). En general, se observa una tendencia a una mayor capacidad de cierre de la herida en los pocillos recubiertos con colágeno derivado de *R. pulmo*, en comparación con el colágeno de rata y el control sin recubrimiento (blanco).

Esta diferencia sugiere que el colágeno de medusa podría favorecer procesos clave como la migración y la proliferación celular durante la regeneración. No obstante, el análisis estadístico indica que las diferencias entre condiciones no alcanzan significación ($p = 0,0613$), por lo que se requieren experimentos adicionales con un mayor número de réplicas para confirmar esta posible tendencia.

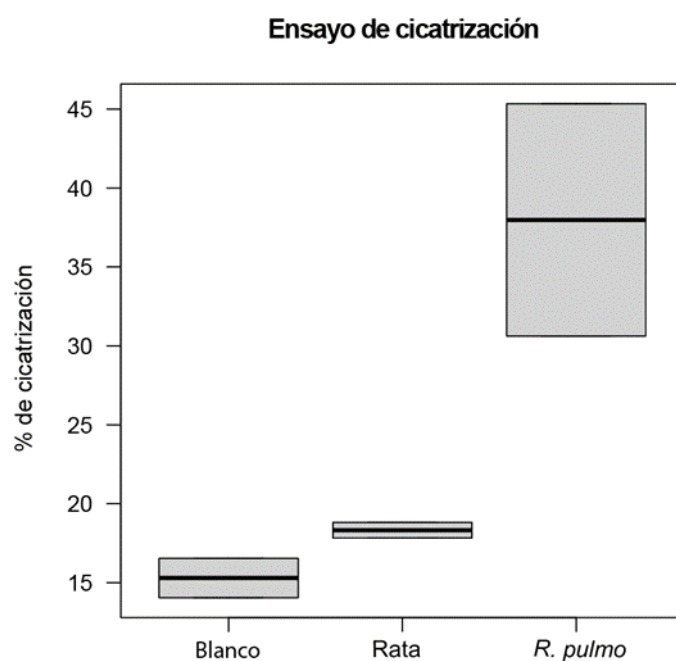


Figura 7. Resultados del ensayo de cicatrización en fibroblastos humanos

ANEXO I: Fotografías

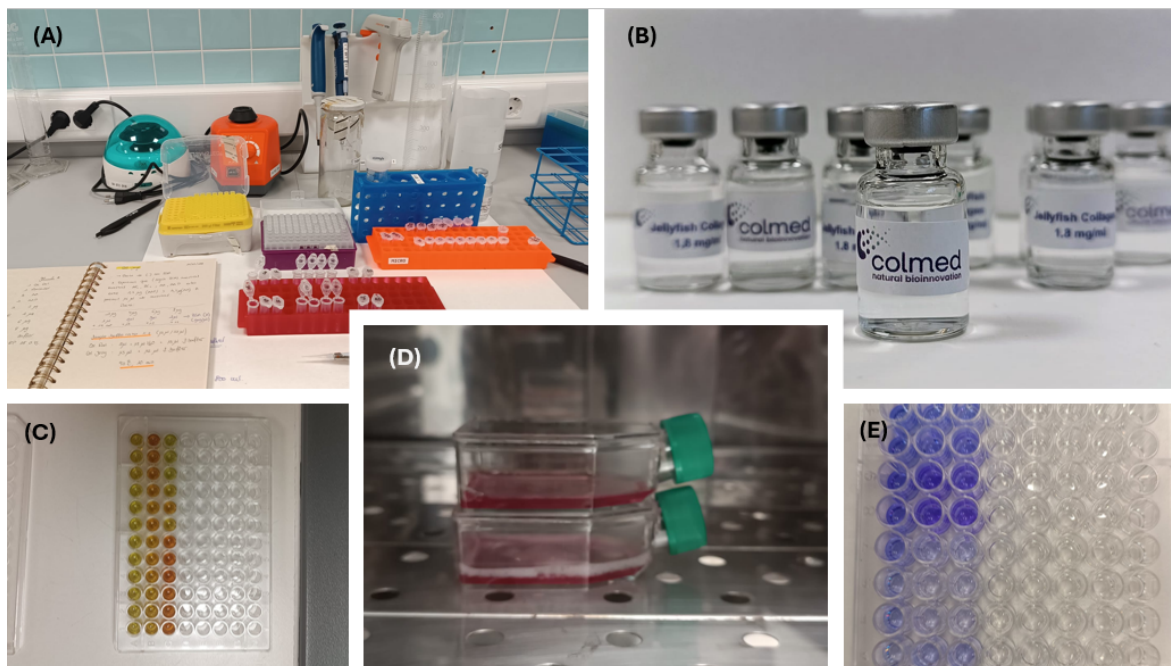


Figura 1. Desarrollo de los ensayos de adhesión celular. (A): preparación de muestras; (B): soluciones de colágeno; (C): determinación de proteínas mediante BCA; (D): cultivos celulares; (E): Células adheridas teñidas con cristal azul.

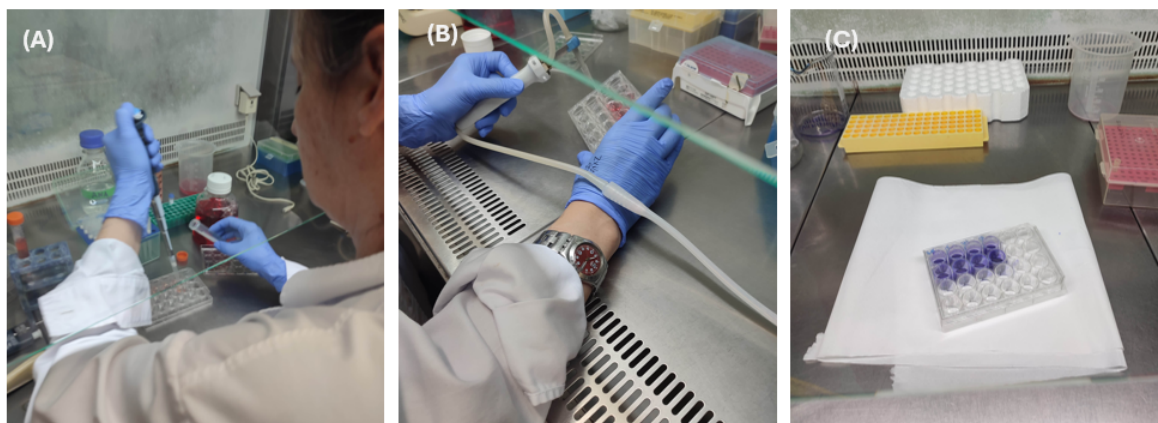


Figura 2. Desarrollo de ensayos de regeneración en cultivos de fibroblastos. (A): recubrimiento de placas de cultivo; (B): aspiración del medio para no desprender las células adheridas; (C): ensayo de viabilidad con resorufina.

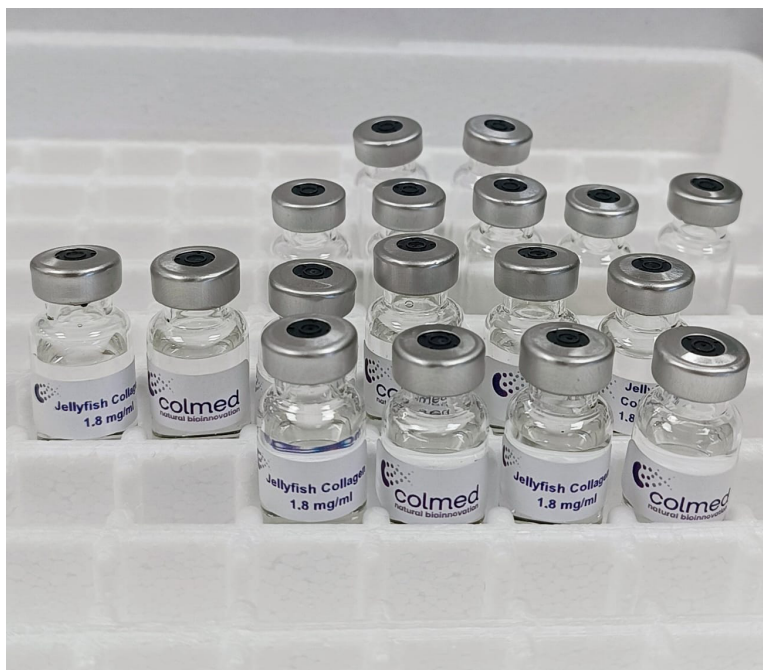


Figura 3. Soluciones de colágeno elaboradas en la UCV.



Figura 4. Soluciones de colágeno elaboradas en el ICM-CSIC.



Cofinanciado por
la Unión Europea



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN



Fondos Europeos



Universitat
Catòlica de
València
San Vicente Mártir

