



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Posgrado en Materiales Poliméricos**

**Síntesis y caracterización de un hidrogel a partir de colágena marina-  
poliuretano integrado con secretoma de células troncales con  
potencial aplicación en el tratamiento de úlceras venosas**

Tesis que presenta

**MARÍA ILEANA LEÓN CAMPOS**

En opción al título de


**MAESTRA EN CIENCIAS (MATERIALES POLIMÉRICOS)**

Mérida, Yucatán, México,

Enero 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:   
María Ileana León Campos

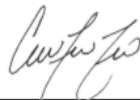
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **María Ileana León Campos** titulado "**Síntesis y caracterización de un hidrogel a partir de colágena marina-poliuretano integrado con secretoma de células troncales con potencial aplicación en el tratamiento de úlceras venosas**" fue realizado en la Unidad de Materiales Poliméricos, laboratorio de Biomateriales, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes**, perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro y la codirección del **Dr. Jesús Alejandro Claudio Rizo**, de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC).

**Atentamente**



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 19 de enero de 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante mis estudios de maestría con número de beca 958083.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por permitirme usar sus instalaciones y equipos.

A la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Coahuila, por permitirme realizar una estancia académica en el laboratorio de Química de Polímeros; en la cual se realizaron gran parte de los experimentos.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por darme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo.

Al Dr. Jesús Alejandro Claudio Rizo, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante mi estancia en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Coahuila. Sobre todo, gracias por su paciencia y dedicación ante todas mis dudas.

Al Dr. Tirso Flores Guía por su importante participación en las pruebas de caracterización realizadas en la Facultad de Ciencias Químicas, UAdeC.

Agradezco la colaboración del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por desarrollar en sus instalaciones la prueba de reometría oscilatoria necesaria para este trabajo de investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Beatriz Rodas, Dr. Manuel Cervantes, Dr. Fernando Hernández y Dra. Denis Cabrera por sus observaciones y aportaciones para mejorar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biomateriales del CICY, por los buenos ratos de risa.

A mis compañeros del laboratorio de Química de polímeros de la UAdeC, por ayudarme siempre.

## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE.....  | I   |
| LISTA DE TABLAS.....   | V   |
| LISTA DE FIGURAS.....  | VI  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | IX  |
| RESUMEN.....   | XI  |
| ABSTRACT.....  | XII |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES.....  | 3   |
| 1.1 Úlcera venosa.....   | 3   |
| 1.1.1 Tratamiento de la úlcera venosa.....   | 3   |
| 1.2 Células troncales.....   | 5   |
| 1.2.1 Clasificación de las células troncales.....  | 5   |
| 1.3 Membrana amniótica como fuente de células troncales.....                                 | 6   |
| 1.4 Secretoma de las CT de la membrana amniótica.....  | 7   |
| 1.4.1 Células troncales y su secretoma en la reparación dérmica.....                         | 8   |
| 1.5 Colágena.....  | 10  |
| 1.5.1 Tipos de colágena.....   | 11  |
| 1.5.2 Colágena marina.....   | 12  |
| 1.6 Poliuretano (PU).....  | 14  |
| 1.7 Hidrogeles.....  | 15  |
| JUSTIFICACIÓN.....   | 17  |
| HIPÓTESIS.....   | 18  |
| OBJETIVOS.....   | 19  |
| CAPITULO II. METODOLOGÍA.....  | 20  |
| 2.1 Síntesis del hidrogel de colágena marina-secretoma-poliuretano de células troncales. ... | 20  |
| 2.1.1 Extracción de colágena marina.....   | 20  |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.2 Aislamiento del secretoma de las células troncales mesenquimales.....                                       | 21 |
| 2.1.3 Elaboración de los agentes entrecruzantes.....  | 22 |
| 2.1.4 Entrecruzamiento químico en medio acuoso con poliuretano.....   | 22 |
| 2.1.5 Encapsulamiento del secretoma de TCs en el hidrogel de la colágena-poliuretano ..                           | 23 |
| 2.1.6 Análisis del índice de entrecruzamiento de la colágena por medio del ensayo de ninhidrina.....              | 24 |
| 2.1.7 Pruebas de hinchamiento y de degradación .....  | 24 |
| 2.2 Evaluación del comportamiento fisicoquímico y mecánico del hidrogel.....                                      | 25 |
| 2.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) .....                                       | 25 |
| 2.2.2 Análisis Termogravimétrico (TGA) .....  | 25 |
| 2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....   | 25 |
| 2.2.4 Dispersión de rayos X de gran angular (WAXS) .....  | 26 |
| 2.2.5 Comportamiento mecánico de los hidrogeles.....  | 26 |
| 2.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....  | 26 |
| 2.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana .....   | 27 |
| 2.4 Determinación de la biocompatibilidad <i>in vitro</i> del hidrogel.....                                       | 27 |
| 2.4.1 Viabilidad celular.....   | 27 |
| 2.4.2 Estudios de hemocompatibilidad <i>in vitro</i> . .....  | 28 |
| CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 30 |
| 3.1 Hidrogeles de colágena marina entrecruzados con poliuretano .....   | 32 |
| 3.1.1 Síntesis de hidrogeles de colágena marina entrecruzado con poliuretano por el método de polimerización..... | 32 |
| 3.1.2 Análisis del índice de entrecruzamiento de la colágena por medio del ensayo de ninhidrina.....              | 32 |
| 3.1.2.1 Determinación del grado de entrecruzamiento .....   | 33 |
| 3.1.3 Caracterización fisicoquímica y mecánica del hidrogel .....   | 35 |
| 3.1.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) .....                                     | 35 |
| 3.1.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....  | 37 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.1.3.3 | Análisis Termogravimétrico (TGA) .....   | 39 |
| 3.1.3.4 | Evaluación de la estructura semicristalina por dispersión de rayos X de gran angular (WASX).....                               | 41 |
| 3.1.3.5 | Microscopía electrónica de barrido (SEM).....  | 43 |
| 3.1.4   | Estudio del comportamiento mecánico de los hidrogeles.....   | 44 |
| 3.1.5   | Cinética de hinchamiento y degradación.....  | 46 |
| 3.1.6   | Ensayo de inhibición bacteriana.....   | 49 |
| 3.1.7   | Determinación de la biocompatibilidad del hidrogel.....  | 50 |
| 3.1.7.1 | Viabilidad de los monocitos humanos sobre los hidrogeles.....  | 50 |
| 3.1.7.2 | Viabilidad de los fibroblastos dérmicos porcinos .....   | 52 |
| 3.1.7.3 | Estudios de hemocompatibilidad <i>in vitro</i> .....   | 53 |
| 3.2     | Hidrogeles de colágena marina encapsulados con secretoma de células troncales .....  | 55 |
| 3.2.1   | Síntesis de hidrogeles de colágena marina-encapsulados con secretoma de células troncales y entrecruzado con poliuretano. .... | 55 |
| 3.2.2   | Caracterización fisicoquímica y mecánica de los hidrogeles .....   | 56 |
| 3.2.2.1 | Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) .....  | 56 |
| 3.2.2.2 | Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....   | 58 |
| 3.2.2.3 | Análisis Termogravimétrico (TGA) .....   | 59 |
| 3.2.2.4 | Evaluación de la estructura semicristalina por dispersión de rayos X de gran angular (WAXS).....                               | 61 |
| 3.2.2.5 | Microscopía electrónica de barrido (SEM).....  | 62 |
| 3.2.3   | Comportamiento mecánico de los hidrogeles.....   | 64 |
| 3.2.4   | Cinética de hinchamiento y degradación hidrogeles .....  | 65 |
| 3.2.5   | Ensayo de inhibición bacteriana.....   | 68 |
| 3.2.6   | Determinación de la biocompatibilidad del hidrogel.....  | 69 |
| 3.2.6.1 | Viabilidad de los monocitos humanos sobre los hidrogeles.....  | 69 |
| 3.2.6.2 | Viabilidad fibroblastos dérmicos porcinos.....   | 70 |
| 3.2.6.3 | Estudios de hemocompatibilidad <i>in vitro</i> .....   | 72 |

CONCLUSIONES..... 74  
PERSPECTIVAS..... 75  
BIBLIOGRAFÍA ..... 76



## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.1 Clasificación de medicamentos empleados en el tratamiento de la UV .....  | 4  |
| Tabla 1.2 Tipos de tejidos animales de los cuales se ha extraído la colágena.....   | 12 |
| Tabla 1.3 Ejemplos de los diferentes tipos de colágena marina que se han aislado y la variedad de fuentes marinas que se han utilizado..... | 13 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 Clasificación de las células troncales de acuerdo a su origen y capacidad de diferenciación celular.....  | 5  |
| Figura 1.2 Composición de la membrana amniótica humana (MAH) .....   | 7  |
| Figura 1.3 Fibra de colágena. La molécula de colágena es una triple hélice compuesta por tres cadenas $\alpha$ . Cada tercer aminoácido de una cadena $\alpha$ es una glicina. La posición x que sigue a la glicina, con frecuencia corresponde a una prolina y la posición Y que precede a la glicina, con frecuencia corresponde a una hidroxiprolina .....                      | 11 |
| Figura 1.4 Reacción de síntesis de un poliuretano .....  | 14 |
| Figura 2.1 Monómeros de HDI e IPDI.....  | 22 |
| Figura 2.2 Síntesis de hidrogeles de colágena de medusa entrecruzados con prepolímeros de PU mediante entrecruzamiento químico.....  | 23 |
| Figura 3.1 Esquema general para la síntesis del entrecruzamiento químico en estado hidrogel basado en CLG de marina y prepolímeros de PU. ....   | 31 |
| Figura 3.2 Síntesis de los hidrogeles de colágena marina entrecruzados. (a) hidrogeles basados en CLG-PU (HDI) (b) hidrogeles basados en CLG-PU (IPDI).....  | 32 |
| Figura 3.3 Ensayo de ninhidrina. (a) hidrogeles basados CLG-PU (HDI) y (b) hidrogeles basados CLG-PU (IPDI). ....  | 33 |
| Figura 3.4 Determinación de los índices de reticulación mediante el ensayo de ninhidrina de los hidrogeles CLG-PU (HDI) y de CLG-PU (IPDI). El hidrogel CLG-PU (HDI) produjo un índice de reticulación de $56 \pm 6$ % en contraste, el CLG-PU (IPDI) presentó un índice de reticulación de $47 \pm 5$ %, determinados considerando una muestra de CLG marina sin entrecruzar..... | 34 |
| Figura 3.5 Espectros FTIR de la colágena marina y los hidrogeles CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (IPDI).....  | 36 |
| Figura 3.6 Termograma DSC de la colágena marina y del entrecruzamiento de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI). ....   | 38 |
| Figura 3.7 Termograma de la CLG marina y la CLG de marina entrecruzada con PU.....   | 39 |
| Figura 3.8 Termograma de la primera derivada del hidrogel de CLG y de los hidrogeles entrecruzados.....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.9 Patrones de difracción de rayos X de la colágena marina (CLG), CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).....   | 42 |
| Figura 3.10 Micrografía de SEM de los hidrogeles. (a) hidrogeles de CLG, (b) y (c) representan los hidrogeles entrecruzados con poliuretano.....  | 43 |
| Figura 3.11 Propiedades reológicas: módulo de almacenamiento vs la frecuencia de los materiales estudiados.....   | 44 |
| Figura 3.12 Estudio del comportamiento de hinchamiento y degradación de los hidrogeles de CLG marina: (a) PBS 1X, (b) HCl, (c) NaOH, (d) papaína y (e) colagenasa tipo I.....                 | 48 |
| Figura 3.13 Efecto de la inhibición bacteriana de los hidrogeles. (a) CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (HDI), b) determinación de la capacidad de inhibición (*p < 0.05, n=3).....                      | 49 |
| Figura 3.14 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad in vitro, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para monocitos (*p < 0.05, n=3). ...  | 51 |
| Figura 3.15 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad in vitro, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para fibroblastos (p < 0.05, n=3).... | 53 |
| Figura 3.16 Capacidad hemolítica (%) de los hidrogeles (*p < 0.05, n=3).....  | 54 |
| Figura 3.17 (a) encapsulación de los hidrogeles con secretoma, (b) el hidrogel encapsulado CLG-PU (HDI)/S y (c) se presenta el hidrogel CLG-PU (IPDI)/S.....                                  | 55 |
| Figura 3.18 Espectros FTIR de los hidrogeles CLG-PU (HDI) y de los hidrogeles CLG-PU (HDI)/S .....  | 56 |
| Figura 3.19 Espectros FTIR de los hidrogeles CLG-PU (IPDI) y de los hidrogeles CLG-PU (IPDI)/S.....   | 57 |
| Figura 3.20 Termograma DSC de los hidrogeles encapsulados CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.....   | 58 |
| Figura 3.21 Termograma de los hidrogeles encapsulados con secretoma.....  | 59 |
| Figura 3.22 Curvas de la primera deriva del TGA de CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S .....   | 61 |
| Figura 3.23 Patrones de difracción de rayos X de la colágena de marina (CLG), CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.....   | 62 |
| Figura 3.24 Micrografía de SEM. (a) hidrogeles de CLG-PU (IPDI) /S y (b) hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S.....   | 64 |

Figura 3.25 Propiedades reológicas: módulo de almacenamiento vs la frecuencia angular de los materiales estudiados..... 65

Figura 3.26 Estudio del comportamiento de hinchamiento y degradación de los hidrogeles encapsulados de CLG-PU (IPDI)/S y CLG-PU (HDI)/S en soluciones de colagenasa tipo I y papaína ..... 67

Figura 3.27 Efecto de la inhibición bacteriana de los hidrogeles. (a) CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, b) determinación de la capacidad de inhibición (\*p < 0.05, n=3). ..... 68

Figura 3.28 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad in vitro, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para monocitos (\*p < 0.05, n=3). ... 69

Figura 3.29 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad in vitro, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para fibroblastos (p < 0.05, n=3).... 71

Figura 3.30 Capacidad hemolítica (%) de los hidrogeles encapsulados (p < 0.05, n=3). ..... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>BTERM</b>                   | Biomedicina, Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa   |
| <b>CLG</b>                     | Colágena   |
| <b>CLG-PU (HDI)</b>            | Hidrogeles de colágena entrecruzados con poliuretano (diisocianato de hexametileno)                            |
| <b>CLG-PU (IPDI)</b>           | Hidrogeles de colágena entrecruzados con poliuretano (diisocianato de isoforona)                               |
| <b>CLG-PU (HDI) /S</b>         | Hidrogeles de colágena entrecruzados con poliuretano (diisocianato de hexametileno) encapsulados con secretoma |
| <b>CLG-PU (IPDI) /S</b>        | Hidrogeles de colágena entrecruzados con poliuretano (diisocianato de isoforona) encapsulados con secretoma    |
| <b>C=O</b>                     | Carbonilo  |
| <b>-COOH</b>                   | Ácido carboxílico  |
| <b>CT</b>                      | Células troncales  |
| <b>CTMs</b>                    | Células troncales mesenquimales  |
| <b>DMEM</b>                    | Medio Eagle modificado   |
| <b>DSC</b>                     | Calorimetría diferencia de barrido   |
| <b>ECM</b>                     | Matriz extracelular  |
| <b>EGF</b>                     | Factor de crecimiento epidérmico   |
| <b>FGF2</b>                    | Factor de crecimiento básico de fibroblastos   |
| <b>EMB</b>                     | Agar de eosina y azul de metileno  |
| <b>FTIR</b>                    | Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier   |
| <b>GAG</b>                     | Glicosaminoglicanos  |
| <b>Gly</b>                     | Glicina  |
| <b>HAECs</b>                   | Células epiteliales humanas  |
| <b>HAMSC</b>                   | Células amnion mesenquimatosas del estroma   |
| <b>HDI</b>                     | Diisocianato de hexametileno   |
| <b>Hyp</b>                     | Hidroxyprolina   |
| <b>IL-1<math>\alpha</math></b> | Interleucina 1 alfa  |
| <b>IPDI</b>                    | Diisocianato de isoforona  |
| <b>IPN</b>                     | Redes interpenetradas  |
| <b>-NCO</b>                    | Isocianato   |
| <b>-NH<sub>2</sub></b>         | Grupo funcional amino  |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>-NHCOO-</b> | Enlace de hidrogeno intermolecular entre el uretano     |
| <b>-OH</b>     | Hidroxilos  |
| <b>PDGFB</b>   | Factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B |
| <b>PU</b>      | Poliuretano   |
| <b>PPU</b>     | Poliuretanos acuosos                                    |
| <b>Pro</b>     | Prolina   |
| <b>SEM</b>     | Microscopia electrónica de barrido                      |
| <b>SFB</b>     | Suero fetal bovino                                      |
| <b>TGA</b>     | Análisis termogravimétrico                              |
| <b>TGFβ1</b>   | Factor de crecimiento transformante beta                |
| <b>TPU</b>     | Prepolímeros de poliuretano trifuncionales              |
| <b>UFC</b>     | Unidades formadoras de colonias                         |
| <b>UV</b>      | Úlcera venosa   |
| <b>UVB</b>     | Rayos ultravioleta B de onda corta                      |
| <b>WAXS</b>    | Dispersión de rayos X de gran angular                   |

## RESUMEN

La úlcera venosa (UV) es una lesión dolorosa que cursa con pérdida de continuidad dérmica y no cicatriza espontáneamente, por lo que representa un problema de salud pública debido a su creciente incidencia, así como a la necesidad de un tratamiento complejo. Una alternativa para el tratamiento de la UV es el uso de secretoma de células troncales (CT), debido a que se ha demostrado su actividad en procesos de reparación-regeneración de lesiones dérmicas. El objetivo del presente trabajo fue sintetizar un hidrogel a base de colágena (CLG) marina, prepolímeros de poliuretanos (PU) y secretoma de CT.

Los hidrogeles de CLG-PU secretoma fueron sintetizados mediante copolimerización aleatoria, donde prepolímeros de PU basados en polietilenglicol (1000 g/mol) y diisocianato de hexametileno (HDI) o diisocianato de isoforona (IPDI) fueron generados como primera etapa; posteriormente en una segunda etapa la CLG fue usada como extensor de la cadena de PU para generar la síntesis del entrecruzamiento químico en estado hidrogel, por último, se encapsularon los hidrogeles con secretoma obtenido de cultivos celulares de CT de membrana amniótica humana en el 5º pase de cultivo. Los hidrogeles obtenidos fueron caracterizados mediante pruebas fisicoquímicas, mecánicas y biológicas.

Se logró el entrecruzamiento químico de los hidrogeles de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), obteniéndose un índice de reticulación de  $56 \pm 6 \%$  y  $47 \pm 5 \%$  respectivamente, comparado con una muestra de CLG marina sin entrecruzar. El índice de entrecruzamiento indica que la estructura química lineal del prepolímero de HDI tiene alta afinidad para generar enlaces urea de reticulación con los grupos amino primarios de la CLG marina; generando superficies con microporosidad y estructura esférica. En contraste el hidrogel CLG-PU (IPDI) presentó una morfología plana y homogénea, con porosidad irregular, debido a la composición química del prepolímero lo cual está asociado con el contenido de estructuras cicloalifáticas en la estructura del prepolímeros de IPDI.

La morfología que presentaron los hidrogeles favoreció el metabolismo de monocitos humanos, como se demostró en el ensayo de viabilidad celular, en el cual los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S presentaron un 50 % de aumento en su viabilidad a las 48 h respecto al control (100 %). De manera conjunta, los ensayos de hemocompatibilidad que se realizaron a los hidrogeles, demostraron que CLG-PU (IPDI)/S y CLG-PU (HDI) resultaron no hemolíticos de acuerdo con la norma ASTM 756-00 (2000).

## ABSTRACT

Venous ulcer (UV) is a painful lesion that occurs with loss of dermal continuity and does not heal spontaneously, therefore it represents a public health problem due to its increasing incidence, as well as the need for complex treatment. An alternative for the treatment of UV is the use of stem cell secretome (TC), due to its activity in dermal lesions repair-regeneration processes has been shown. The objective of the present work was to synthesize a hydrogel based on marine collagen (CLG), polyurethanes (PU) and secretome from CT.

The CLG-PU secretome hydrogels were synthesized by random copolymerization, where prepolymers of PUs based on polyethylene glycol (1000 g/mol) and hexamethylene diisocyanate (HDI) or isophorone diisocyanate (IPDI) were generated as the first step; Later, in a second stage, the CLG was used as an extender of the PU chain to generate the synthesis of chemical crosslinking in the hydrogel state, finally, the hydrogels were encapsulated with secretome obtained from cell cultures of human amniotic membrane CT in the 5th passage cultivation. The hydrogels obtained were characterized by physicochemical, mechanical and biological tests.

The chemical crosslinking of CLG-PU (HDI) and CLG-PU (IPDI) hydrogels was achieved, obtaining a crosslinking index of  $56 \pm 6\%$  and  $47 \pm 5\%$  respectively, compared to a sample of marine CLG without crosslinking. The crosslinking index indicates that the linear chemical structure of the HDI prepolymer has high affinity for generating crosslinking urea bonds with the primary amino groups of marine CLG; generating surfaces with microporosity and spherical structure. In contrast the CLG-PU (IPDI) hydrogel presented a flat and homogeneous morphology, with irregular porosity, due to the chemical composition of the prepolymer, which is associated with the content of cycloaliphatic structures in the structure of the IPDI prepolymers.

The morphology presented by the hydrogels favored the metabolism of human monocytes, as demonstrated in the cell viability assay, in which the CLG-PU (IPDI) / S hydrogels presented a 50% increase in viability at 48 h with respect to the control (100%). Together, the hemocompatibility tests carried out on the hydrogels showed that CLG-PU (IPDI) / S and CLG-PU (HDI) were non-hemolytic according to the ASTM 756-00 (2000) standar.



## INTRODUCCIÓN

La úlcera venosa (UV) es una lesión dolorosa que cursa con pérdida de continuidad dérmica, no cicatriza espontáneamente por lo que representa un problema de salud pública debido a su creciente incidencia, así como a la necesidad de un tratamiento prolongado, complejo y costoso, con altos índices de reincidencia [1]. En México, una de cada 10 personas es diabética; y de cada 20 diabéticos, uno sufre alguna amputación a causa de procesos ulcerantes. Hasta el 67.8% de los mexicanos tienen algún grado de úlcera venosa, de acuerdo con el estudio Vein Consult [2].

Actualmente se estima que 1 a 2% de la población general padece úlceras crónicas en los miembros inferiores, definidas como pérdida de continuidad en la piel por más de seis semanas sin cicatrización después de tres meses; son predominantemente de etiología venosa (70%), seguidas por las arteriales (20%) y neuropáticas [2]. Se estima que el 22% de los pacientes presenta una primera (UV) antes de los 40 años, aumentando la frecuencia de casos a mayor edad; asimismo, la mayoría de los estudios manifiesta mayor número de pacientes de sexo femenino con una razón que varía de 1.5:1 hasta 10:1 con respecto al sexo masculino [3].

Entre las posibles causas de las UVs se encuentran los procesos inflamatorios que dan como resultado la activación de leucocitos, daño endotelial, agregación plaquetaria y edema intracelular. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de UVs son: la edad avanzada, obesidad, lesiones previas en las piernas, la trombosis venosa profunda y la flebitis [4].

La terapéutica actual se ha enfocado en el manejo de los signos de la enfermedad, como lo es el uso de apósitos de espuma, hidrocoloides, apósitos de alginato, películas de polímeros sintético, ungüentos de propolio, gel de papaína e Hidroderm® promoviendo una disminución en el tiempo de cicatrización de las heridas, sin embargo, la tasa de recidivas de este tipo de lesiones es alta [5-6].

Una alternativa para el tratamiento de la UV es el uso de células troncales (CT), debido a que se ha demostrado que las CT participan en procesos de reparación-regeneración de lesiones dérmicas [7-8] a través de la liberación de secretoma, el cual hace referencia a grupos completos de biomoléculas secretadas por las células [9-10]. Recientemente se ha demostrado que el secretoma de las CT de la membrana amniótica, promueve la reparación-regeneración de heridas

en modelos animales, así como en estudios de fase clínica [3-6]. En este sentido, derivados de secretoma, como medios acondicionados o exosomas, puede presentar ventajas considerables en la fabricación, manipulación y almacenamiento de productos con potencial biológico en el ámbito de estrategias terapéuticas y de la medicina regenerativa [11].

De manera conjunta, el uso de biomateriales en estado hidrogel resulta una alternativa efectiva para el tratamiento de este tipo de lesiones, debido al control de sus propiedades fisicoquímicas, y dependiendo de su composición química permite la regularización de la respuesta biológica de las células vinculadas con los procesos de curación de heridas. Por otra parte, el uso de hidrogeles en estrategias de biomedicina e ingeniería tisular ha permitido la encapsulación de células y moléculas bioactivas, permitiendo un desempeño eficiente en aplicaciones clínicas. Debido a ello, recientemente se han desarrollado estrategias de diseño de hidrogeles que permiten modular su estructura y propiedades, lo cual representa un área de investigación prometedora [12].

La presente propuesta, pretende sintetizar un hidrogel a base de colágena (CLG) marina, debido a que este tipo de polímero proteico mantiene su estructura tridimensional específica en ambientes de alta humedad, como lo es la UV, además de que ha sido demostrado que la CLG favorece los procesos cicatrizantes [11]. El hidrogel fungirá como contenedor del secretoma de células troncales de la membrana amniótica y sus propiedades serán moduladas empleando entrecruzantes basados en prepolímeros de poliuretanos, además serán caracterizados fisicoquímicamente mediante pruebas químicas, mecánicas y morfológicas, análisis de inhibición bacteriana y biológicamente mediante ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular.

## **CAPITULO I. ANTECEDENTES**

### **1.1 Úlcera venosa**

Las úlceras venosas (UVs) representan la complicación más grave de la insuficiencia venosa crónica. Se definen como una pérdida de sustancia dermoepidérmica de las partes declives de la pierna, que no cicatriza espontáneamente y tiene una gran tendencia a la recidiva [12-13].

En lo que respecta a su localización, si bien pueden aparecer en cualquier zona del tercio distal de la extremidad inferior, en el 90% de los casos se localiza en la cara lateral interna, la zona supramaleolar, la zona pretibial y en la cara lateral externa de la pierna [12-13].

Las úlceras venosas varicosas crónicas representan complicaciones recurrentes e incapacitantes de la enfermedad venosa crónica y afectan a 1-2% de la población general, de acuerdo con un informe reciente de la Sociedad Europea de Cirugía Vascul. Su importancia radica en el hecho de que las úlceras venosas varicosas crónicas difícilmente cicatrizan, producen mala calidad de vida a los pacientes, requieren una enorme utilización de recursos humanos y materiales, producen síntomas incapacitantes y graves que, a su vez, son responsables directos de ausentismo y costos laborales elevados [14].

Las úlceras venosas tienen su origen en la hipertensión venosa condicionada por múltiples circunstancias como disfunción de la bomba muscular, reflujo venoso condicionado por disfunción valvular e hiperlaxitud de la pared venosa (sistema superficial, perforante o profundo), obstrucción condicionada por trombosis venosa previa (síndrome postrombótico) o una mezcla de ellas [14].

#### **1.1.1 Tratamiento de la úlcera venosa**

La existencia de úlceras y heridas crónicas cutáneas constituye un problema sociosanitario de primer orden por varias razones, entre ellas porque su prevalencia es elevada y porque deteriora la calidad de vida de los pacientes que las padecen. Es por ello que el cuidado de las heridas sigue siendo un reto para todos los profesionales de la salud.

El tratamiento de las UVs tiene por objeto eliminar el tejido desvitalizado, controlar el exudado, fomentar la granulación, favorecer la epitelización y maduración de la herida, así como reducir la carga bacteriana. Para ello, la terapéutica actual emplea conjuntamente hidrogeles, enzimas como la colagenasa y la urokinasa, polihexidina-betaína, apósitos absorbentes a base de alginatos y siliconas, andamios a base de componentes de la matriz extracelular, principalmente

a base de CLG tipo I, así como apósitos antimicrobianos. En la Tabla 1.1 se presentan algunos medicamentos empleados para tratar la UV de acuerdo con su clase. El éxito en el tratamiento de las UVs frecuentemente está en función de establecer la combinación adecuada de estas alternativas terapéuticas, con la finalidad de promover la reparación del tejido lesionado, mantener el estado del tejido sano circundante (perilesional), conservar y modular la presencia del exudado y disminuir la proliferación bacteriana. La modulación de estos procesos a nivel tisular y celular, son la base de la complejidad en el tratamiento de las UVs. En respuesta a este panorama, recientemente se ha propuesto el empleo de células troncales y sus productos, proteínas, factores de crecimiento, su secretoma para el tratamiento de las UVs, bajo la hipótesis de que estos elementos podrían orquestar todos los procesos involucrados en la reparación-regeneración del tejido lesionado [15-16].

Tabla 1.1 Clasificación de medicamentos empleados en el tratamiento de la UV [15].

| <b>Clase</b>            | <b>Medicamentos</b>   |
|-------------------------|---|
| Alfa-benzopironas       | Cumarisina  |
| Gamma-benzopironas      | Fracción purificada de flavonoides micronizada (MPFF).<br>Oxerufin, rutin, rutósidos.<br>Diosmina<br>Extracto de <i>Ruscus</i> , escino |
| Extractos de plantas    | Extracto de pepino marino   |
| Flebotónicos sintéticos | Dobesilato de calcio  |
| Misceláneos             | Pentoxifilina<br>Aspirina<br>Stanozolol<br>Defibrotide<br>Zinc (II)<br>Sulodexina   |

## 1.2 Células troncales

Las células troncales (CT) son aquellas células indiferenciadas con capacidad de proliferación y que se pueden diferenciar en distintos tipos celulares dependiendo de los estímulos externos. Su descubrimiento y caracterización han revolucionado la comunidad científica gracias a tres aspectos que las hacen únicas en la medicina regenerativa: su estado de indiferenciación, su capacidad para proliferar indefinidamente y, por último, su plasticidad y capacidad de dar origen a otros tipos celulares [16].

### 1.2.1 Clasificación de las células troncales

En la figura 1.1 se presenta la clasificación de las CT por su capacidad de diferenciación en: totipotentes, pluripotentes, oligopotentes y unipotentes [16].

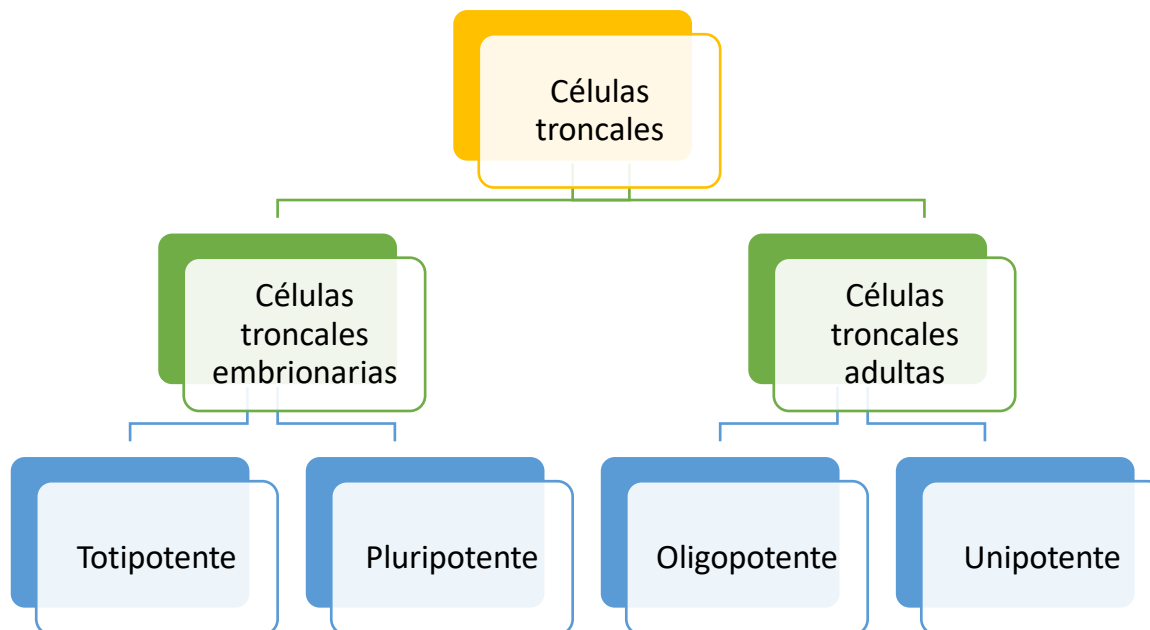


Figura 1.1 Clasificación de las células troncales de acuerdo a su origen y capacidad de diferenciación celular [16].

Las CT totipotentes son capaces de formar todos los tejidos en un organismo. En los mamíferos solamente lo son el cigoto y los primeros blastómeros [16].

Las CT pluripotentes son capaces de formar células de todos los linajes del organismo, son las denominadas CTs embrionarias. Las CT unipotentes son células adultas que producen células de solo un linaje, como las células CT germinales, entre ellas la esperma que contiene espermatogonias [16].

Las células oligopotentes pueden auto-renovarse y diferenciarse, sólo están limitadas a tipos de células estrechamente relacionadas [16].

Los reportes actuales sobre células CT mencionan que éstas se han aislado a partir de varios tejidos adultos, incluyendo médula ósea, tejido neural, músculo, piel, retina, folículos pilosos, intestino, tejido adiposo, pulpa dental, hígado, páncreas y membrana amniótica [17-18].

### **1.3 Membrana amniótica como fuente de células troncales**

La membrana amniótica humana (MAH), también conocida como amnios, es la capa más interna de las membranas fetales. Está ligeramente adherido a la membrana coriónica o corion. Juntas, estas membranas fetales forman el saco amniótico, que contiene el embrión y el líquido amniótico durante el embarazo. Ambas membranas están conectadas libremente a través de una capa de CLG esponjosa [19].

La MAH contiene dos tipos de células, de orígenes embrionarios diferentes, que muestran algunas propiedades características de las CT.

Las células epiteliales humanas (hAECs) se derivan del embrión del ecto embrionario, mientras que las humanas las células amnion mesenquimatosas del estroma (hAMSC) se derivan del mesodermo embrionario [20].

La MAH es un biomaterial translúcido y avascular con un grosor de 20 a 50  $\mu\text{m}$ . Como se ve en la figura 1.2. La MAH consiste en una monocapa de epitelio en contacto con el líquido amniótico, una membrana basal, una capa compacta, una capa de fibroblastos y luego una capa esponjosa conectada al corion.

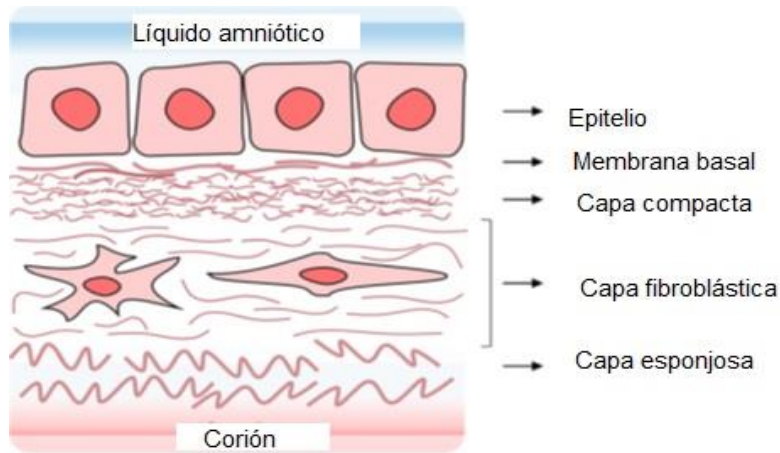


Figura 1.2 Composición de la membrana amniótica humana (MAH) [19].

#### 1.4 Secretoma de las CT de la membrana amniótica

La palabra "secretoma" se introdujo por primera vez por Tjalsma y sus colegas en un estudio sobre una encuesta global basada en el genoma de proteínas secretadas de *Bacillus subtilis* [19].

El secretoma hace referencia a grupos completos de biomoléculas, pro y antiinflamatorias, secretadas por las células que contribuyen a modular el proceso inflamatorio [19-20].

El secretoma constituye el conjunto completo de proteínas secretadas, que representan el 30% del proteoma de un organismo. Entre los grupos completos de biomoléculas se encuentran: proteínas solubles, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas de la matriz extracelular, proteasas, péptidos, factores de crecimiento, hormonas proteicas, citocinas inmunorreguladoras, quimiocinas u otras moléculas bioactivas que tienen un impacto directo en el fenotipo de la célula diana; y vesículas extracelulares. Estos últimos pueden subdividirse en cuerpos apoptóticos, micropartículas y exomas. El secretoma de células y tejidos individuales es específico y cambia en respuesta a fluctuaciones en los estados fisiológicos o patológicos [19-20].

El secretoma constituye una clase importante de proteínas que controlan y regulan una multitud de procesos biológicos y fisiológicos, convirtiéndolo en una fuente clínicamente relevante de biomarcadores y descubrimientos de dianas terapéuticas. Existen varios enfoques que se están implementando para estudiar tal clase de proteínas; sin embargo, cada uno de estos enfoques tiene sus ventajas y limitaciones. Mientras los estudios de todo el genoma que utilizan

predicciones de señales pueden proporcionar un análisis completo del secretoma, la detección y cuantificación de las proteínas secretadas reales en un tejido sería más relevante.

El análisis computacional basado en microarreglos puede proporcionar alguna información sobre el secretoma de diferentes tejidos bajo condiciones dadas, pero el análisis real de proteínas y su modificación postraduccional es mucho más relevante [21].

Algunas de estas proteínas están involucradas en una serie de procesos biológicos diversos y vitales, que incluyen la adhesión celular, la migración celular, la comunicación célula-célula, la diferenciación, la proliferación, la morfogénesis, la supervivencia y la defensa, los factores de virulencia en las bacterias y las respuestas inmunitarias [22].

El secretoma aislado de CT mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano podría acelerar la cicatrización de heridas cutáneas *in vitro* e *in vivo* [20]. Es importante destacar que el secretoma mejora las capacidades proliferativas y migratorias de varios componentes celulares de la dermis, como los fibroblastos dérmicos, los queratinocitos y las células endoteliales, *in vitro* activando la señalización de fosfoinositol 3- cinasa (PI3K) y la cinasa de adhesión focal (FAK) [21-22].

Hant *et al.*, 2016, en su estudio usaron las células troncales mesenquimales (hMSC) extraídas de la cola de rata; las cuales fueron encapsuladas en microesferas de CLG para la deposición de la nueva matriz de CLG II.

Se demostró que la inhibición de las proteasas extracelulares afecta a la diferenciación condrogénica de hMSC al favorecer el fenotipo de fibrocartilago con CLG I regulado por el incremento de deposición y expresión del gen de CLG tipo II.

Este estudio sugiere el potencial de manipular las proteasas extracelulares para diferenciar las hMSC hacia la formación de fibrocartilago en el disco intervertebral [23].

#### 1.4.1 Células troncales y su secretoma en la reparación dérmica

El empleo de CT en los procesos de reparación-regeneración de la piel se ha acrecentado en la última década debido a los avances de la ingeniería de tejidos. Sin embargo, las aplicaciones médicas presentan un escaso avance. Un estudio realizado en modelos *in vitro* con fibroblastos de pacientes sanos y con cicatrización hipertrófica, demostró que la administración de células troncales mesenquimales (CTMs) tiene un papel importante en el cierre de las heridas al facilitar



la migración de fibroblastos dérmicos de un modo dependiente del número de células administradas [24].

Estudios realizados en conejo sobre cicatrización hipertrófica develaron que la administración intradérmica de CT disminuye la presencia de cicatrización patológica e incrementa la tensión de la piel. Actualmente se emplean con éxito CT epidérmicas basales e interfoliculares cultivadas para la generación de injertos en pacientes quemados [20-24].

Recientemente se ha demostrado que la participación de las CTs sobre los procesos reparativos y/o regenerativos, se efectúan a través de diversas biomoléculas liberadas por este tipo de células. Un estudio realizado con CT de ratón, develo que los marcadores CD271<sup>+</sup>, de la epidermis y la dermis son las células que están directamente relacionadas con la regeneración dérmica. Dado que su presencia induce la expresión de factores de crecimiento como: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF2), factor de crecimiento transformante beta (TGFβ1), factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B (PDGFB), así como interleucina 1 alfa (IL-1α) [24]. De manera conjunta, se ha demostrado que el secretoma de las CT, participa en procesos de protección celular. Estudios realizados en fibroblastos de ratón sometidos a envejecimiento por radiación de rayos ultravioleta B de onda corta (UVB), demostraron que al ser cultivados en presencia del secretoma de CT disminuyen los efectos de envejecimiento ocasionados por la radiación, incrementando la proliferación celular, así como la síntesis de CLG y elastina, [24].

El interés en los factores secretados por las CT, y a su indudable participación en la modulación de la homeostasis celular y tisular surgen de la necesidad de la liberación de factores tróficos, o del secretoma celular, por lo que se han empleado sistemas poliméricos para su liberación. Derivado de esta necesidad, se han diseñado sistemas de liberación de secretoma a base de microsferas en estado hidrogel de componentes de la matriz extracelular, como la CLG [17-24].

## 1.5 Colágena

La CLG es un término general para definir un grupo de proteínas estructurales de la matriz extracelular, organizadas en una disposición fibrilar. Se encuentran ubicuamente en seres vivos, en formas bastante conservadas, tanto en términos de secuencias de genes como de aminoácidos, especialmente en la estructura de triple hélice [24].

Las cadenas de CLG se observan en la figura 1.3, estas tienen una estructura primaria que consisten en la secuencia Gly-X-Y-Gly-Pro-Hyp-Gly-X-Y donde cada tercer aminoácido es glicina (Gly). La glicina comprende aproximadamente el 33% de la cadena de aminoácidos, mientras que la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp) comprenden aproximadamente el 20%. El resto del porcentaje está compuesto por los aminoácidos polares, tanto ácidos como básicos, representados como X e Y [25]. La cadena polipeptídica de CLG tiene grupos funcionales amino (-NH<sub>2</sub>), ácidos carboxílicos (-COOH) e hidroxilos (-OH) como sustituyentes, que junto con los enlaces amida del esqueleto polimérico representan centros reactivos [24-25].

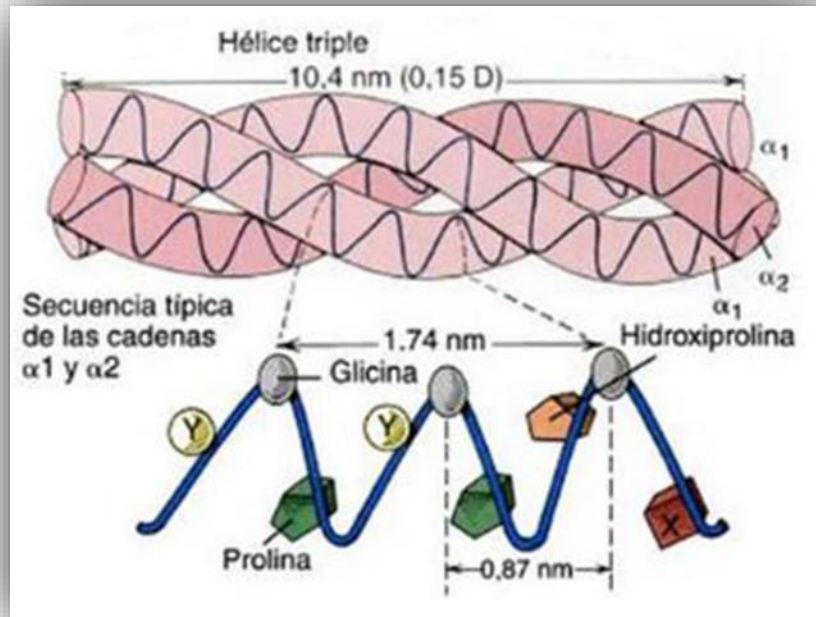


Figura 1.3 Fibra de colágeno. La molécula de colágeno es una triple hélice compuesta por tres cadenas  $\alpha$ . Cada tercer aminoácido de una cadena  $\alpha$  es una glicina. La posición x que sigue a la glicina, con frecuencia corresponde a una prolina y la posición Y que precede a la glicina, con frecuencia corresponde a una hidroxiprolina [26].

### 1.5.1 Tipos de colágeno

En la literatura se ha reportado al menos 20 tipos de colágeno. El cuerpo humano está compuesto principalmente de CLG tipo I, II y III, sin embargo, muchos otros tipos están presentes. En la tabla 1.2 se presentan los tipos de tejidos animales de los cuales se ha extraído la CLG. La CLG tipo I y III son las principales CLGs fibrilares en los vasos sanguíneos, donde representan 60% y 30% de las CLGs vasculares, respectivamente. La unidad básica de CLG fibrilar es la triple hélice formada por tres cadenas de aminoácidos entrecruzadas. Cada cadena tiene aproximadamente 330 aminoácidos de longitud y la molécula total, llamada tropocolágeno, tiene 300 nm de longitud y un diámetro de aproximadamente 1.5 nm [27].

Pulkkinen *et al.* 2010 reportaron la funcionalidad y la biocompatibilidad de la CLG tipo II para la fabricación de cartílago, en la cual lograron la mineralización y formación de hueso [28].

Tabla 1.2 Tipos de tejidos animales de los cuales se ha extraído la colágena [27].

| <b>Fuente de colágena</b>   | <b>Composición bioquímica</b>   | <b>Ventajas</b>  |
|-----------------------------|---|--|
| Hueso bovino                | Colágena tipo I, glicosaminoglicanos (GAG); proteínas sin colagenasa            | Mejora la mineralización.  |
| Cartílago porcino           | Colágena tipo II, laminina y elastina   | Estimula la condrogénesis y previene la angiogénesis.                              |
| Esófago de porcino (mucosa) | Colágena tipo I, II y III, elastina   | Mejora la migración esoflagelal de células troncales y soporte de orgánulos 3D.    |
| Hígado porcino              | Colágena tipo I, III, IV, VI, XI y XIX, proteoglicanos, factores de crecimiento | Soporte para células, segrega tejido, regula la comunicación intracelular.         |
| Piel porcina                | Colágena tipo I, III, IV  | Induce la miogénesis, ayuda a la función de los mioblastos.                        |
| Pescado                     | Colágena tipo I   | Exhibe baja inmunogenicidad y alta biodegradabilidad.                              |
| Tendón                      | Colágena tipo I, fibronectina   | Induce diferenciación osteogénica de células troncales y la regeneración de hueso. |

### 1.5.2 Colágena marina

La CLG marina se pueden obtener de diferentes fuentes como peces o animales marinos invertebrados, como esponjas marinas o medusas en la tabla 1.3 se presentan algunos ejemplos, se usa en biomateriales para la fabricación de andamios, hidrogeles, entre otros, predominando el uso de CLG tipo I. La CLG marina generalmente se extrae usando ácidos suaves como el ácido acético o enzimas, a baja temperatura, para prevenir la desnaturalización y los cambios en las propiedades moleculares. La CLG tiene una amplia aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y biomédica [29]

Tabla 1.3 Ejemplos de los diferentes tipos de colágena marina que se han aislado y la variedad de fuentes marinas que se han utilizado [30].

| Tipo de colágena | Fuente de colágena                   | Origen del Tejido    | Rendimiento |
|------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tipo I           | Pargo de patudo                      | Hueso                | 1.59%       |
|                  | Bagre de barba larga                 | Piel                 | 28%         |
|                  | Pez pipo                             |                      | 33.2%       |
|                  | Pez sapo de espalda marrón           |                      | 54%         |
|                  | Pez globo ocelado                    |                      | 44.7%       |
|                  | Pez lagarto                          |                      | Escamas     |
|                  | Caballas                             | 1.51%                |             |
|                  | Salmonete gris                       | 0.43%                |             |
|                  | Pez volador                          | 0.72%                |             |
|                  |                                      | Atún patudo          | Hueso       |
| Tipo I, II y V   | R pulmo                              | Piel, hueso y tendón | 46.7%       |
| Tipo II          | Tiburón de bambú con bandas marrones | Cartílago            | 9.59%       |
|                  | Tiburón de puntas negras             | Cartílago            | 10.30%      |
|                  | Medusa de cinta                      | Cartílago            | 9%          |
| Tipo IV          | Esponja marina                       |                      | 30%         |

En el presente trabajo se utilizará la CLG marina de la especie *C. andromeda* debido a que este organismo presenta una distribución abundante en zonas de manglar de los trópicos, así como de áreas de arrecifes y en algunas zonas costeras de profundidad media. Sus poblaciones son amplias, las cuales se albergan en nuestro país en el Caribe Mexicano y principalmente el Golfo de México. Además, de ser un organismo interesante para su estudio y aplicación para la generación de biomateriales [31]. A la fecha, no está reportado el uso de este tipo de CLG en el diseño de hidrogeles para aplicaciones en el tratamiento de UVs; por lo que la adaptación de su

estructura y propiedades permitirá generar innovadores hidrogeles que cumplan con los requisitos necesarios para combatir la problemática relacionada con las UVs.

### 1.6 Poliuretano (PU)

Los poliuretanos (PU) son polímeros termoplásticos y termoestables obtenidos por reacciones de policondensación de un alcohol con el disocianato [32]. Sus propiedades mecánicas, térmicas y químicas pueden guiarse por la reacción entre los diisocianatos y los polioles, generando grupos uretano. En la figura 1.4 se presenta la reacción de síntesis del poliuretano.

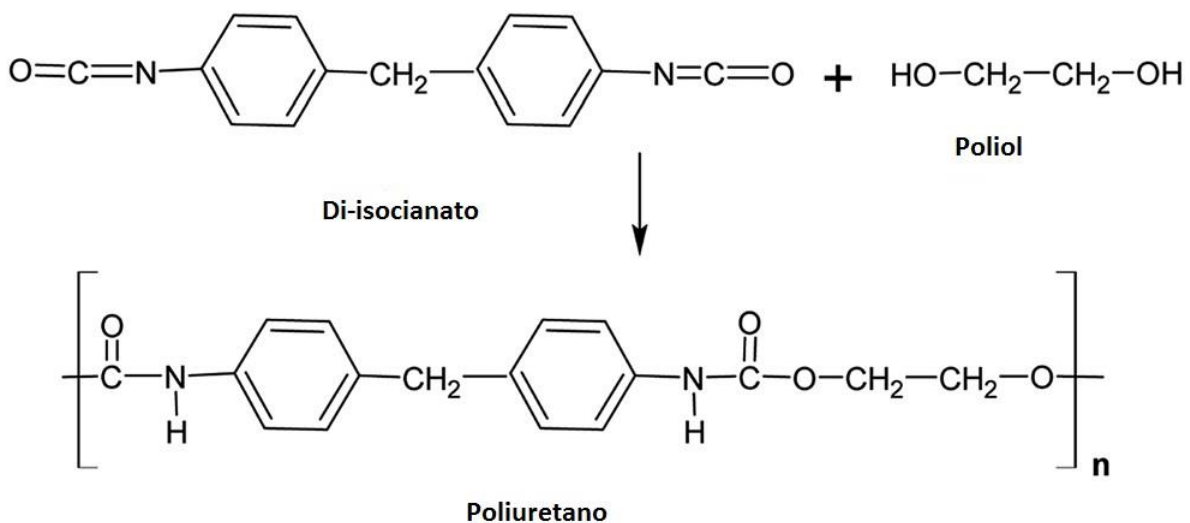


Figura 1.4 Reacción de síntesis de un poliuretano [32].

Los PU son empleados en numerosas aplicaciones biomédicas tanto por sus excelentes propiedades mecánicas como por su biocompatibilidad. Los PU tienen un historial comprobado como biomateriales ya que pueden ser diseñados para mejorar el crecimiento y proliferación celular. Además, las propiedades mecánicas de los PUs se pueden adaptar para su uso como biomateriales sustitutivos de tejidos duros o blandos [32]. Los PU son usados en la fabricación biomédica de regeneración de hueso, aisladores para cables de estimulación cardíaca, catéteres, diafragmas, materiales ortopédicos, implantes, recubrimiento de implantes y adhesivos tisulares entre otros [33-34]. Los PU elastoméricos biodergradables pueden ser diseñados para nuevas aplicaciones que requieran flexibilidad y elasticidad en ingeniería de tejidos. Recientemente, se ha reportado la síntesis y caracterización de dispersiones acuosas de PU que tienen la capacidad

de generar enlaces de entrecruzamiento urea con grupos amino presentes en biopolímeros, tales como la CLG [35].

### **1.7 Hidrogeles**

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas tridimensionales de naturaleza altamente hidrofílica. Son materiales muy adecuados para aplicaciones BTERM (Biomedicina, Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa); debido a su buena interacción con los tejidos vivos, ya que, muestran buenas propiedades de biocompatibilidad. Además, su característica de hinchamiento les brinda la propiedad de absorber, retener y liberar, en condiciones controladas, cantidades de agua que regulan su conformación estructural, propiedades deseables para aplicaciones BTERM [36].

Los hidrogeles de CLG han demostrado tener propiedades que los hacen candidatos para su aplicación en BTERM; sin embargo, su rápida degradación y sus propiedades mecánicas limitan su uso. Un control preciso de las características y propiedades estructurales de los hidrogeles basados en CLG podría proporcionar la clave para regular su comportamiento en las aplicaciones mejoradas de BTERM [36].

Los hidrogeles pueden contener aditivos para generar cremas y productos cotidianos que mejoran la calidad de vida de las personas con problemas dermatológicos, heridas en la piel y quemaduras, entre otros. En la industria alimentaria, los hidrogeles podrían utilizarse como espesantes en alimentos para el consumo diario. En el área de ingeniería tisular los hidrogeles han funcionado como vehículos de liberación de células y biomoléculas con interés terapéutico para mejorar la respuesta biológica deseada [36]. Por otro lado, debido a sus propiedades resultan ser los biomateriales ideales para la curación de heridas crónicas. Sin embargo, es necesario modular tanto sus propiedades mecánicas como su velocidad de degradación [36].

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de CLG deben ser reguladas para permitir una adecuada encapsulación de agentes externos tales como: polímeros, biomoléculas y células permitiendo controlar su hinchamiento. La velocidad de degradación de los hidrogeles basados en CLG debe ser controlada para diseñar materiales que puedan ser usados como apósitos en heridas en largos periodos de uso, donde la degradación del hidrogel no sea una limitante para un exitoso desempeño.

Además, las matrices 3D en estado hidrogel basadas en CLG pueden utilizarse para la inmovilización de células que no soportan un alto esfuerzo de corte para la producción de interleucinas, interferones, hormonas y otros productos biofarmacéuticos cuyo costo de producción es elevado [36]. Con esto en mente, resulta innovador la encapsulación de CTs dentro de una matriz de CLG que cuente con propiedades fisicoquímicas reguladas que permita la liberación del secretoma para acelerar los procesos de curación de UVs. Para ello la modulación de las propiedades de la matriz 3D colagénica puede ser logrado usando estrategias que involucren entrecruzamiento químico.

El entrecruzamiento químico del hidrogel de CLG se basa en la generación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales amina o ácido carboxílico de la CLG con moléculas exógenas. Los entrecruzantes de CLG más estudiados son el glutaraldehído (GLU), las carbodiimidias (específicamente, 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) es una carbodiimida soluble en agua (EDC), genipina (GEN), ácido 1,3 fenilendiacético (APH), diacrilato de polietilenglicol (PEGDA) y prepolímeros acuosos de poliuretano (PPU) [36].



## JUSTIFICACIÓN

La terapéutica de la UV se ha enfocado principalmente al tratamiento de la hipertensión y el daño del tejido circundante, a través del empleo de andamios a base de componentes de la matriz extracelular, como la CLG, y en algunos casos, la aplicación concomitante de células adultas y troncales, así como factores de crecimiento, todo ello en aras de mejorar la calidad de la reparación y deseablemente inducir la activación de los mecanismos fisiológicos de regeneración dérmica [1-14]. Sin embargo, la deficiente cicatrización relacionada con este tipo de lesiones representa una limitante para un tratamiento exitoso.

Bajo este contexto, en esta propuesta se contempla generar una estrategia terapéutica integral que promueva la reparación-regeneración de la UV, a través de la síntesis de un hidrogel basado en CLG marina entrecruzada con poliuretanos acuosos (PPU) que permitan regular su estructura y propiedades para lograr la correcta encapsulación y disponibilidad de secretoma de CT para su potencial aplicación en el tratamiento de UVs. A la fecha, este tipo de sistema no ha sido reportado en la literatura y representa una estrategia innovadora y potencial para el tratamiento de UVs. Para lograr esta meta, se emplearon polímeros biocompatibles como la CLG marina, un polímero sintético que refuerce las propiedades fisicoquímicas y mecánicas, como el PU y un componente bioactivo, como el secretoma de células troncales de la membrana amniótica, y que ha demostrado participar en la activación de los procesos fisiológicos de la reparación-regeneración dérmica.

## **HIPÓTESIS**

El diseño de este sistema polimérico, colágena-secretoma de células troncales entrecruzado con poliuretanos, en estado hidrogel, representará una alternativa para el tratamiento de la UV, que promoverá la reparación del microambiente alterado en la herida dérmica.

La estructura química del agente entrecruzante modulará la capacidad de encapsulación y disponibilidad de células troncales de la membrana amniótica; además de favorecer el entrecruzamiento con colágena marina; obteniéndose un hidrogel con mejores propiedades mecánicas y biológicas, representando un hidrogel con potencial aplicación para la curación de UVs.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Sintetizar y caracterizar un hidrogel a partir de colágena marina-poliuretano integrado con secretoma de células troncales con potencial aplicación en el tratamiento de la úlcera venosa.

### Objetivos específicos

- ❖ Sintetizar hidrogeles de colágena marina-secretoma de células troncales entrecruzado con poliuretano por el método de polimerización por condensación.
- ❖ Evaluar el comportamiento fisicoquímico y mecánico del hidrogel mediante FTIR, TGA, SEM, DSC, WAXS, reología oscilatoria y cinéticas de hinchamiento y degradación.
- ❖ Analizar la capacidad antibacteriana del hidrogel usando la cepa de *E. coli*.
- ❖ Determinar la biocompatibilidad *in vitro* del hidrogel mediante pruebas de viabilidad celular usando fibroblastos porcinos y monocitos humanos, así como el ensayo de hemólisis.

## CAPITULO II. METODOLOGÍA

### 2.1 Síntesis del hidrogel de colágena marina-secretoma-poliuretano de células troncales.

#### 2.1.1 Extracción de colágena marina

Medusas de la especie *C. andrómada* fueron colectadas de manera aleatoria en la laguna de Chelem con el permiso de colecta SGPA/DGVS/011043/17. Una vez colectado el espécimen, se separó manualmente la campana de los tentáculos y se procedió a la extracción mediante hidrólisis enzimática usando pepsina [37].

Posteriormente, la campana de la medusa fue lavada con abundante agua y limpiada con filos finos hasta eliminar el color café característico, se guardó el tejido limpio por lotes de 250 g, en bolsas herméticas (ziplok) para su conservación a 4 °C.

Para poder realizar la extracción de la colágena, se tomaron lotes de 250 g de medusa congelada, y se dejaron descongelar por aproximadamente 2 horas sumergidas en agua, posteriormente, se procedió a licuar el tejido durante 30 segundos

El licuado se dejó incubar en una solución de ácido acético a una concentración de 0.5M en una proporción 1:1 w/v, durante 24 horas con el fin de ayudar a la solubilización de la colágena y a la eliminación sustancias externas a la misma; pasado el tiempo la suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, para eliminar residuos, se eliminaron los botones resultantes y se conservó el líquido sobrenadante [38].

Posteriormente se procedió a agregar pepsina en proporción 1:30 w/w, y se dejó en agitación por 24 horas para poder lograr que la proteína se hidrolice con el fin de ayudar a la digestión de los telopéptidos.

Posterior a este tratamiento se llevó a cabo una segunda centrifugación en los mismos parámetros que el paso anterior (1200 rpm durante 10 minutos) y de nuevo se recuperaron los sobrenadantes.

Para poder recuperar la colágena resultante de los procedimientos anteriores, se procedió a precipitar en una solución de 1M de NaCl en agitación contante durante 24 h; el precipitado resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se obtuvieron botones de colágena [38].

### 2.1.2 Aislamiento del secretoma de las células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales humanas (hMSC) se obtuvieron de membranas amnióticas de cinco mujeres sanas, con previo consentimiento informado para participar en el experimento. El estudio se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM (proyecto 101-2012). Se fragmentaron muestras de membranas amnióticas (5 cm<sup>2</sup>) con un bisturí hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>. Los fragmentos obtenidos se incubaron con una solución enzimática, que contenía 0.01% de colagenasa de tipo II en medio Eagle modificado (DMEM) sin suero bovino fetal (SFB), y se incubaron durante 1 h a 37 °C a 5 % de CO<sub>2</sub> con agitación constante. Después de este tiempo, la suspensión celular resultante de la digestión enzimática se centrifugó a 1200 rpm, a 25 °C, durante 15 minutos. Finalmente, el botón celular se resuspendió en DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C a 5 % de CO<sub>2</sub> en DMEM hasta alcanzar el 80 % de confluencia para experimentos posteriores, con cambio de medio cada tercer día.

Las células obtenidas se caracterizaron de acuerdo con los estándares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Brevemente, se evaluó el ensayo de la Unidad formadora de colonias (UFC) mediante tinción con violeta cristal. Para ello, se cultivaron 0, 25, 50, 100 y 200 células / cm<sup>2</sup> en una placa de cultivo de 6 pocillos por triplicado, y se cultivaron durante 14 días a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con metanol durante 5 min antes de teñir con violeta cristal al 0.5 % (p / v) durante 5 min. El exceso de colorante se eliminó con lavados consecutivos con PBS y se contaron manualmente las UFC (puntos violetas).

Para la caracterización inmunofenotípica, se resuspendieron alícuotas de células 1X10<sup>6</sup> (pase 3) en PBS y se incubaron con anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína monoclonal contra CD90, anticuerpo conjugado con ficoeritrina contra CD73 y CD34, y anticuerpos conjugados con PECy5 y PECy7 contra CD105 y CD44 respectivamente 30 min a 4 ° C en la oscuridad. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 0.5% (p/v) y se analizaron mediante citometría de flujo en un sistema BD FACS Calibur (BDBIOSCIENCES, San José, CA, EE. UU.). Finalmente, las células fueron sometidas a diferenciación osteogénica y adipogénica. Las células (2X10<sup>3</sup>) se sembraron por triplicado en una placa de cultivo de 24 pocillos y se incubaron en condiciones osteogénicas y adipogénicas. Para la condición osteogénica, las células se cultivaron en DMEM que contenía 82 µg / ml de ácido

ascórbico, dexametasona 100 nM y  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM. Para la diferenciación adipogénica, las células se incubaron en DMEM que contenía 5  $\mu$ g / ml de insulina, isobutil-metil-xantina 0.5 mM e indometacina 60  $\mu$ M. Los cultivos celulares se mantuvieron durante 14 días en condiciones de cultivo estándar con cambios de medio cada 3 días.

### 2.1.3 Elaboración de los agentes entrecruzantes

Se hicieron 2 tipos de agentes entrecruzantes variando la estructura química del agente entrecruzante (PU); el primer entrecruzante se formó a partir de glicerol etoxilato (1000 g mol<sup>-1</sup>) como polioliol y diisocianato de hexametileno, mientras que el segundo entrecruzante se sintetizó usando diisocianato de isoforona. Estos entrecruzantes se sintetizaron mediante una reacción de condensación de los grupos hidroxilos del polioliol con los isocianatos para generar prepolímeros, este proceso se llevó a cabo a 100 °C por 2 h en una parrilla de calentamiento [39]. Posteriormente, los grupos isocianatos en los extremos de los prepolímeros sin reaccionar se bloquearon con una solución de NaHSO<sub>3</sub> (35 %m/v) para formar carbamoilsulfonatos altamente solubles [39].

### 2.1.4 Entrecruzamiento químico en medio acuoso con poliuretano

El proceso de entrecruzamiento químico se llevó a cabo usando prepolímeros de PU para entrecruzarlos con la CLG.

Al comparar las estructuras químicas de los prepolímeros, se encuentra que el monómero HDI es una molécula lineal, mientras que el monómero IPDI es cicloalifático (75 % en forma del isómero cis y 25 % como el isómero trans) (figura 2.1). Esto significa que el monómero IPDI tiene una estructura más rígida, debido a que los dos grupos isocianato de IPDI no son similares [40], afectando considerablemente la capacidad de formación de enlaces urea con la CLG marina, y limitando su capacidad de polimerización por condensación; lo cual repercutirá directamente sobre las propiedades de los hidrogeles obtenidos.

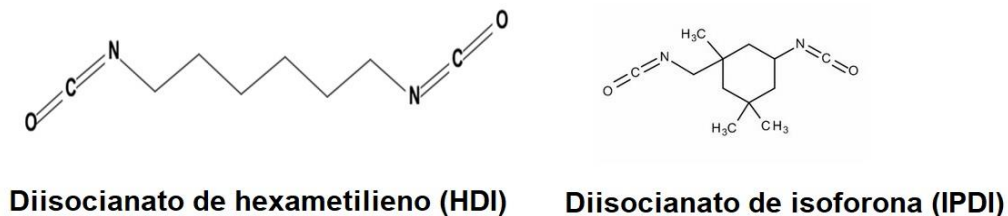


Figura 2.1 Monómeros de HDI e IPDI.

Para ambos tipos de entrecruzantes se usó una concentración de CLG de  $6 \text{ mg mL}^{-1}$  con una concentración de PU del 20 % (m/m) con respecto a la masa de CLG [41-42]. En la síntesis de los hidrogeles se hizo un entrecruzamiento químico en donde se combinó la CLG con el entrecruzante de PU (figura 2.2). Se realizó en un matraz erlenmeyer de 125 mL, se usaron 20 mL de CLG de marina, 5 mL de entrecruzante HDI e IPDI según la reacción que se llevó a cabo, se ajustó el pH a 7 y posteriormente se le adicionaron 8 mL de PBS 10X. Luego, la solución se puso en una parrilla de calentamiento y en agitación durante aproximadamente 2 horas hasta alcanzar una temperatura de  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y por último el producto resultante se filtró en tamiz de malla fina ( $2 \text{ }\mu\text{m}$ ).



Figura 2.2 Síntesis de hidrogeles de colágena de medusa entrecruzados con prepolímeros de PU mediante entrecruzamiento químico.

### 2.1.5 Encapsulamiento del secretoma de TCs en el hidrogel de la colágena-poliuretano

El encapsulamiento de los hidrogeles diseñados se llevó a cabo en condiciones estériles, previamente los hidrogeles se lavaron tres veces con PBS 1X. Luego, fueron expuestos a radiación UV durante 20 minutos y por último, los hidrogeles se encapsularon a  $37^{\circ}\text{C}$  usando una concentración de secretoma de  $200 \text{ }\mu\text{l/mL}$  para cada hidrogel [43].

### 2.1.6 Análisis del índice de entrecruzamiento de la colágena por medio del ensayo de ninhidrina.

La evaluación del índice de reticulación del hidrogel se realizó con la prueba de ninhidrina (1 %, 1 mL, pH 5, 90 °C, 2 h) usando 10 mg de cada hidrogel y luego la mezcla se enfrió y se diluyó con 2 mL de agua destilada. La absorbancia de la mezcla se determinó a 567 nm. El contenido de los bloques de colágena-aminas, utilizado como indicador del índice de entrecruzamiento, se definió como:

$$\text{Índice de entrecruzamiento } \% = \left[ \frac{NH_0 - NH_t}{NH_0} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $NH_0$  es la cantidad de grupos amino libres en las muestras no tratadas y  $NH_t$  es la cantidad de grupos amino libres en las muestras reticuladas [42].

### 2.1.7 Pruebas de hinchamiento y de degradación

Los hidrogeles son asociados con propiedades hidrofílicas, debido a éstas, al momento de encontrarse en contacto con el agua, esta comienza a penetrar en su interior. Para este estudio, se usaron 100 mg de cada tipo de hidrogel por triplicado y se pusieron en vasos de plástico con tapa. Luego, se evaluaron los cambios en el peso de la muestra durante el tiempo de inmersión de 24 h en diferentes medios variando el pH (2, 7.4 y 12) cambiando diariamente el medio durante 30 días con 3mL de solución a 25°C. La variación en masa de los hidrogeles se calculó con la ecuación:

$$\text{Variación en masa } (\%) = \left[ \frac{W_t - W_0}{w_0} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

donde  $W_0$  es el peso de la muestra seca y  $W_t$  es el peso de la muestra hinchada en un tiempo determinado.

La degradación *in vitro* de hidrogeles encapsulados con secretoma se realizó usando papaína y colagenasa tipo I. Los hidrogeles se incubaron en estas soluciones proteolíticas (3 mL, 25 °C, de 15 y 15 U por cada gel, respectivamente), y se pesaron diariamente durante 30 días. El grado de



degradación se calculó como la diferencia de peso entre los hidrogeles antes y después de la degradación [42].

## **2.2 Evaluación del comportamiento fisicoquímico y mecánico del hidrogel**

### 2.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Se evaluó la estructura química de los hidrogeles usando FTIR. Para ello se utilizó un espectrómetro Frontier, sistema Perkin Elmer. Los espectros de FTIR se registraron en muestras de hidrogeles en estado xerogel empleando un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante en un rango espectral de  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  y  $16\text{ cm}^{-1}$  de resolución, usando un promedio de 16 barridos [42].

### 2.2.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría (TGA) se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. La variación de masa puede ser una pérdida o una ganancia.

Debido a que perfil de descomposición es característico de cada polímero, también permite evaluar la estabilidad a la degradación térmica del hidrogel, permitiendo corroborar el efecto de entrecruzamiento entre los componentes poliméricos. Los hidrogeles se caracterizaron usando un equipo TGA-4000 Perkin Elmer. Para ello las muestras de 5 a 10 mg de xerogel fueron encapsulados en porta muestras de alumel. Las condiciones de funcionamiento utilizadas: rango de temperatura de 30 a 800 °C, velocidad de calentamiento de 20 °C / min utilizando nitrógeno como atmósfera inerte hasta 600 °C (20 mL / min) y oxígeno como atmósfera oxidante de 600 °C a 800 °C (20 mL / min) [42-43].

### 2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó la técnica de DSC con el fin de conocer los efectos en la temperatura de desnaturalización de la CLG por los efectos del entrecruzamiento producido por los agentes entrecruzantes, usando un equipo Perkin Elmer, modelo Diamond. Se pesaron las muestras (20 mg) y se pusieron en porta muestras de aluminio para su análisis, con una rapidez de

calentamiento de 1 °C/min, en un intervalo de temperatura de 25 °C hasta 150 °C bajo atmosfera de nitrógeno [44].

#### 2.2.4 Dispersión de rayos X de gran angular (WAXS)

Las proteínas fibrilares como la CLG presentan un arreglo semicristalino que puede ser detectado por técnicas de difracción de rayos X. El entrecruzamiento de las cadenas de CLG puede promover la modificación en la estructura semicristalina de la misma por lo que la técnica de WAXS permitirá estudiar este tipo de modificación superficial. Para ello se empleó un equipo SAXS-Emc2, difractor Anton Paar con una fuente de rayos X Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). La técnica consiste en irradiar con Rayos-X a la muestra para luego registrar e interpretar los Rayos-X que hayan cumplido con el fenómeno de difracción, y de esta manera conocer si la superficie es amorfa o cristalina [45]. Se usaron 10 mg de muestras de cada tipo de hidrogel en seco.

#### 2.2.5. Comportamiento mecánico de los hidrogeles

Los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) del hidrogel se obtuvieron en experimentos de flujo de corte oscilatorio de pequeña amplitud utilizando un Reómetro MCR 300 Anton-Paar a 37 °C, empleando una geometría de plato-plato de 40 mm de diámetro y 0.5 grados; con una trampa de solvente para evitar la evaporación del agua. Todos los experimentos se realizaron utilizando el 10 % de la deformación para garantizar la linealidad de la respuesta dinámica, y se realizaron por triplicado utilizando 100 mg de muestras de hidrogel húmedo. Los módulos se midieron en función de la frecuencia (intervalo 0.1–100 Hz) [45].

#### 2.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un equipo especial para el estudio de las superficies morfológicas de los materiales. Para el caso de los hidrogeles estudiados se utilizó microscopio un JEOL, JSM-6510LV / LGS. Se usaron xerogeles cuya superficie fue cubierta con oro para un mejor contraste y se usaron 0.5 cm de diámetro. Las muestras se cubrieron con una fina capa de oro metálico para asegurar la calidad de imagen de su microestructura utilizando un metalizador Sputter-Coater [45].

## 2.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana

La capacidad antibacteriana de hidrogeles de CLG se determinó por la técnica de formación de halo de inhibición, usando una cepa bacteriana de *E. coli* (*Gram negativa*).

Se realizaron pruebas de inhibición bacteriana *in vitro* utilizando un medio diferencial de agar de eosina y azul de metileno (EMB) y una cepa bacteriana de *E. coli*. El agar se preparó disolviendo 37.5 g de agar deshidratado en 1 L de agua destilada y se calentó hasta su disolución. El medio de cultivo se esterilizó a 121 ° C durante 15 minutos. Una vez listo el medio, se vertió en placas de Petri previamente esterilizadas. Se colocaron muestras de hidrogel seco de colágena (10 mg) en el centro de las placas de medio de cultivo, con la finalidad de medir el halo de inhibición. Como control se usó doxiciclina preparada a 20 ppm. La cepa bacteriana se sembró de forma homogénea en las placas de Petri, incluidos los hidrogeles y el control, utilizando un asa estéril. La bacteria se incubó durante 24 h a 37 °C y una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> para medir su crecimiento en presencia de los hidrogeles, utilizando la concentración de microorganismos en la superficie del agar a 1x10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL (patrón McFarland) para iniciar el ensayo con un pH del medio 7.2. La capacidad de inhibición de *E. Coli* se calculó comparando el diámetro del halo formado por el hidrogel con respecto al diámetro generado por el control [46].

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Posteriormente, se midió el diámetro del halo de inhibición de los microorganismos, y la determinación del porcentaje del efecto inhibitorio relativo con respecto al control positivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de } E. coli (\%) = \frac{\text{Diámetro de inhibición del hidrogel}}{\text{Diámetro de inhibición del control}} \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

## 2.4 Determinación de la biocompatibilidad *in vitro* del hidrogel

### 2.4.1 Viabilidad celular

Se evaluó la actividad metabólica de los monocitos humanos o fibroblastos dérmicos en cada hidrogel de CLG. La viabilidad celular se determinó por la capacidad de las células con metabolismo activo para reducir las sales de MTT a formazán. Este método fue desarrollado por

Mosmann (1983) y modificado por Twentyman y Luscombe (1987) [49-50]. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol se le conoce como MTT es un compuesto que pertenece a la familia de las sales de tetrazolio, con color amarillo y soluble en agua. De acuerdo con Monsmann, Twentyman y Luscombe (1983, 1987) las deshidrogenasas mitocondriales y en particular el succinato deshidrogenasa es parte de las células con actividad metabólica. Al reducirse el MTT a formazán se produce un color violeta, insoluble en agua (formazán). En este tipo de ensayo, verifica la reducción de tetrazolio (MTT) a formazán por las enzimas de las células vivas. Para esto, se sembraron 50  $\mu\text{L}$  de células en placas de cultivo de 96 pozos y 100  $\mu\text{L}$  de lixiviados en cada pocillo y se incubaron en una atmósfera humidificada de 95 % de aire y 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37 °C utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con SFB (10 % v/v) [47-48]. Este experimento se realizó durante 24 h y 48 h respectivamente. A las 24 h y 48 h se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de solución de MTT y se incubó durante 2 horas a 37°C. A continuación, el medio se decantó, los cristales de formazán de color azul-violeta se disolvieron en 2-propanol y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 560 nm. La absorbancia de MTT reducido por las células cultivadas en pocillos libres de materiales representa el 100% de la actividad metabólica (controles) [42-46].

#### 2.4.2 Estudios de hemocompatibilidad in vitro.

La hemocompatibilidad de los hidrogeles se evaluó mediante la prueba de hemólisis; esta prueba mide la hemoglobina liberada cuando la membrana celular de los eritrocitos se destruye. Para ello, se obtuvo sangre humana de donantes sanos, se recogió y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. El plasma se decantó y la fase roja incluyendo los eritrocitos se lavaron con solución de Alsever (dextrosa 0.116 M, cloruro sódico 0.071 M, citrato de sodio 0.027 M y ácido cítrico 0.002 M) tres veces. Entonces, 100  $\mu\text{L}$  de eritrocitos purificados se diluyeron en 10 mL Alsever. Se añadió una cantidad de 150  $\mu\text{L}$  de esta solución a tubos individuales con 5 mg de cada tipo de hidrogel y 1850  $\mu\text{L}$  de solución de Alsever. Solución de Alsever y agua desionizada se utilizaron como control negativo (hemólisis 0%) y positivo (100% de hemólisis), respectivamente. Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron para medir la hemoglobina liberada a una longitud de onda de 415 nm. El % de hemólisis se determinó comparando el valor de absorbancia registrado para los experimentos que incluyen hidrogeles con respecto al valor obtenido para el control positivo (agua) y del control negativo (solución de Alsever). El valor de % hemólisis obtenido para cada material se comparó con la norma ASTM F 756-00 con el fin de evaluar el comportamiento de hemocompatibilidad [41-48].

## **Análisis estadístico**

Todos los datos presentados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con  $P < 0.05$ . El software que se utilizó fue Minitab 18 para Windows. Se probó la significancia estadística entre las medias de los conjuntos de datos, mediante la prueba de Tukey.

### CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, la síntesis de hidrogeles basados en CLG de marina y prepolímeros de PU fue abordada. La síntesis de los hidrogeles involucró un proceso de copolimerización aleatoria, donde prepolímeros de PUs basados en polietilenglicol ( $1000 \text{ g/mol}^{-1}$ ) y diisocianato de hexametileno (HDI) o diisocianato de isoforona (IPDI) fueron generados como primera etapa; posteriormente en una segunda etapa la CLG fue usada como extensor de la cadena de PU para generar la síntesis del entrecruzamiento químico en estado hidrogel (Figura 3.1). Debido a la estructura compleja de la CLG, los prepolímeros de PU retículan a las cadenas colagénicas mediante interacciones químicas y físicas generando materiales en estado hidrogel. Se analizó el efecto que tiene la variación de la estructura química del PU sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales diseñados, para ello técnicas de caracterización como: ensayo de ninhidrina para determinar el índice de reticulación de la CLG, FTIR, WAXS, DSC, TGA y reología oscilatoria fueron empleadas; además se describe el comportamiento de hinchamiento y degradación de las matrices desarrolladas en diferentes medios hidrolíticos (pH 2, 7 y 12) y proteolíticos (papaína y colagenasa (14 U/gel)).

Los hidrogeles de PU, insolubles en agua, pero hidrófilos, generalmente están representados por redes químicamente reticuladas. Estos materiales poseen las características favorables de la familia de PU, además de la capacidad de imitar tejidos blandos [49]. Las estructuras químicas de los PU conceden regulación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles tales como: el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y regulación de la rapidez de degradación; con lo que es posible desarrollar hidrogeles con propiedades moduladas para aplicación en encapsulación de moléculas bioactivas con perfil de liberación controlado. Por lo que controlar las propiedades de la CLG marina generando copolímeros aleatorios con prepolímeros de PU con estructura química variada representa una innovadora alternativa en el área de ciencia de materiales.

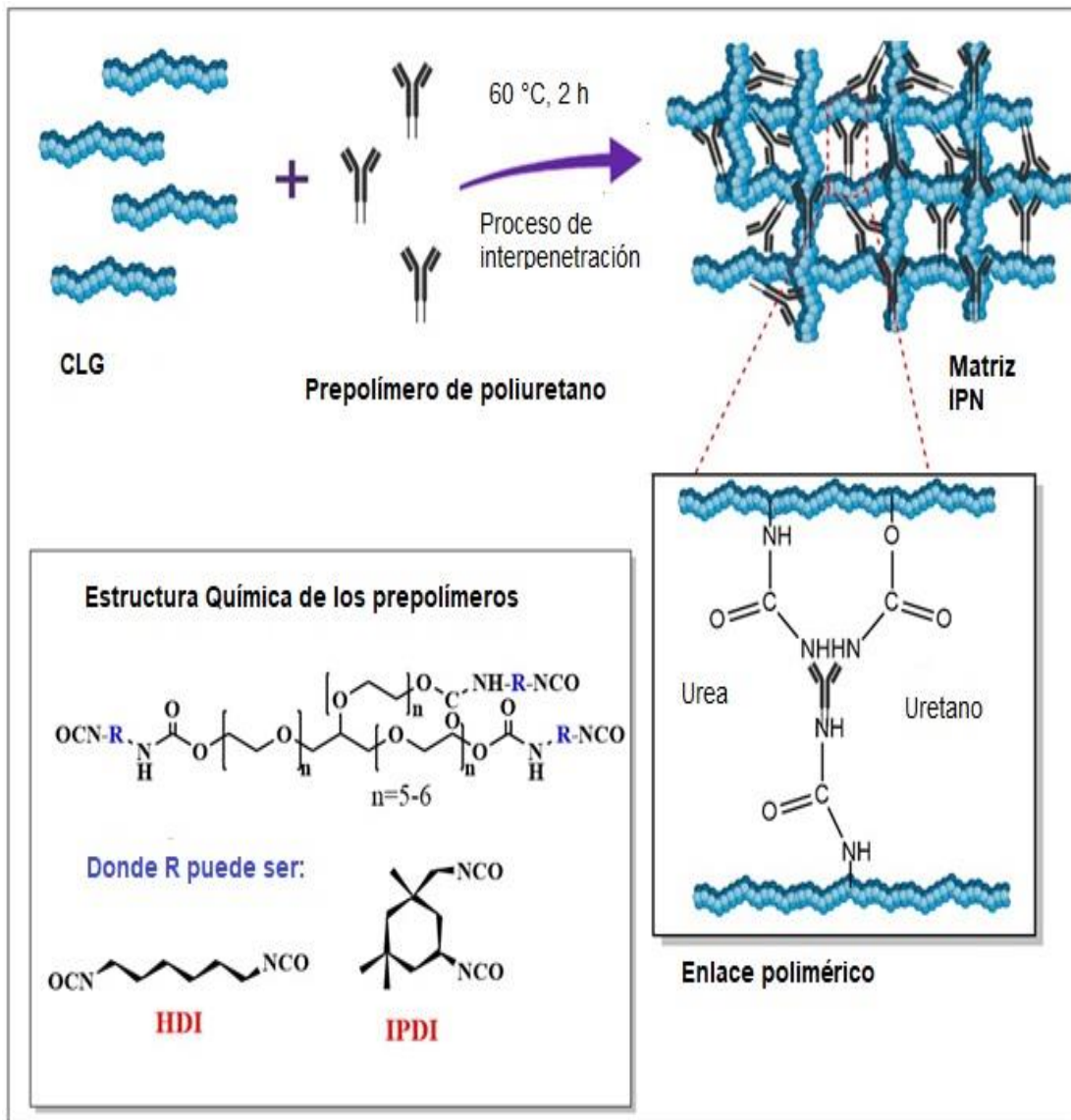


Figura 3.1 Esquema general para la síntesis del entrecruzamiento químico en estado hidrogel basado en CLG de marina y prepolímeros de PU.

### 3.1 Hidrogeles de colágena marina entrecruzados con poliuretano

3.1.1 Síntesis de hidrogeles de colágena marina entrecruzado con poliuretano por el método de polimerización.

En las (Figura 3.2) se ilustran los hidrogeles que se obtuvieron al realizar la reacción a 60 °C. El hidrogel de CLG-PU (HDI) (a) presentó una estructura blanda con alta maleabilidad sin sufrir deformación por presión en comparación con el hidrogel de CLG-PU (IPDI) (b) el cual presentó una estructura un poco más rígida, lo cual está asociado con el contenido de estructuras cicloalifáticas en la estructura del IPDI. Ambos materiales muestran la capacidad de absorber altas cantidades de agua, lo que demuestra su comportamiento de hidrogel.

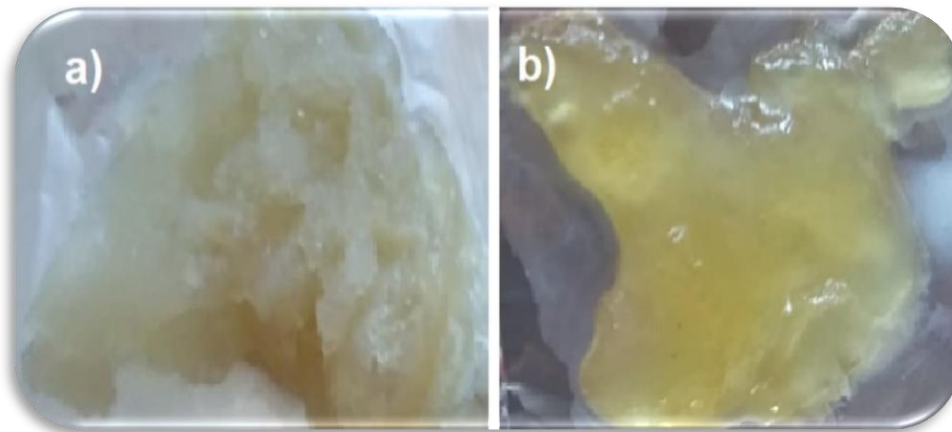


Figura 3.2 Síntesis de los hidrogeles de colágena marina entrecruzados. (a) hidrogeles basados en CLG-PU (HDI) (b) hidrogeles basados en CLG-PU (IPDI).

3.1.2 Análisis del índice de entrecruzamiento de la colágena por medio del ensayo de ninhidrina.

La ninhidrina reacciona con el grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos primarios produciendo “purpura de Ruhemann”. El cromóforo formado es el mismo para todos los aminoácidos primarios. La intensidad del color formado depende del número y la naturaleza química de los grupos amino que se analizan. El pH óptimo para la reacción general es 5.5. El violeta de Ruhemann tiene un máximo espectral a 570 nm [50].

En figura 3.3 se observa la coloración obtenida en las reacciones de entrecruzamiento químico de los diferentes hidrogeles, al realizar el ensayo de ninhidrina. Para ello se utilizaron 30 mg del



producto de la reacción de copolimerización. Se calentaron las muestras de cada tipo de hidrogel en solución de ninhidrina (1 %m/v, 1 mL, pH 5, 90 °C, 2 h). Se realizó la prueba por triplicado para cada uno de los productos entrecruzados con CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI) y luego la mezcla se enfrió y se diluyó con 2 mL de agua destilada. La absorbancia de la mezcla se determinó a 570 nm.

El producto de la reacción de CLG-PU (HDI) se tornó de color púrpura, mientras, que las reacciones CLG-PU (IPDI) apenas se tiñeron de color azul.

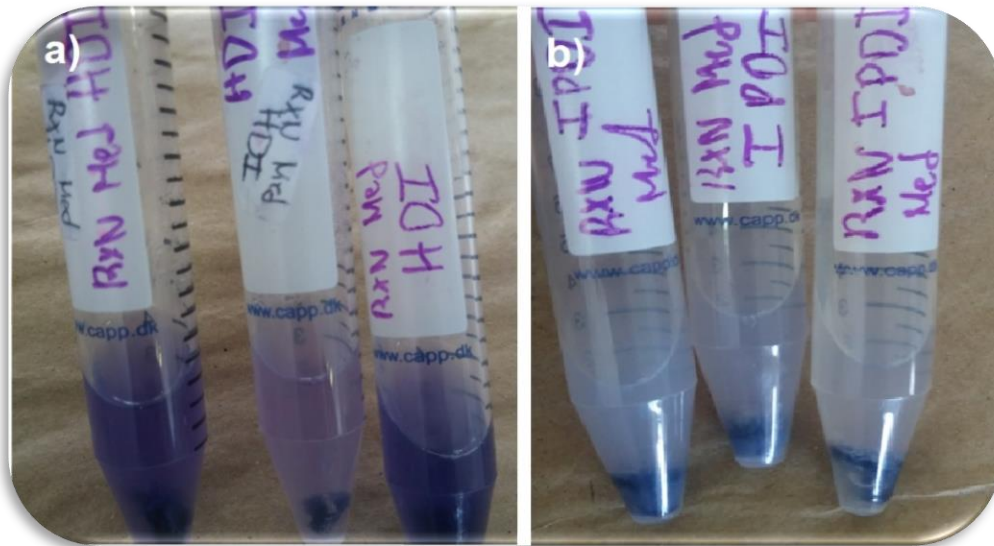


Figura 3.3 Ensayo de ninhidrina. (a) hidrogeles basados CLG-PU (HDI) y (b) hidrogeles basados CLG-PU (IPDI).

### 3.1.2.1 Determinación del grado de entrecruzamiento

En este estudio, el índice de reticulación se calculó como el porcentaje de la diferencia de la cantidad de los grupos de amino primarios ( $\text{NH}_2$ ) en los hidrogeles formados con CLG de marina variando el tipo de entrecruzante basado en prepolimeros de PU. El experimento se realizó por triplicado para confirmar la reticulación.

A partir de los resultados de la prueba de ninhidrina, se cuantificó la cantidad de grupos amino primarios presentes en la estructura de la CLG marina; tales grupos están vinculados a los procesos de reticulación química con moléculas que tienen grupos reactivos a ellos, mediante la

formación de enlaces urea, resultantes de la condensación de los aminos primarios del CLG con los isocianatos reactivos de los prepolímeros de PU.

La generación de estos enlaces urea de reticulación puede estar vinculado a la disminución de la velocidad de polimerización de las fibras de CLG marina durante la polimerización de los hidrogeles [51], lo cual también está asociado con la estructura química del agente entrecruzante. Los resultados de la prueba se presentan en Figura 3.4. El hidrogel CLG-PU (HDI) produjo un índice de reticulación de  $56 \pm 6$  % en contraste, el CLG-PU (IPDI) presentó un índice de reticulación de  $47 \pm 5$  %, los cuales fueron determinados considerando una muestra de CLG marina sin entrecruzar. Al teñirse de color púrpura las tres réplicas de HDI eso nos dio el indicativo de que presentó menos grupos amino y que hay mayor entrecruzamiento, en cambio las tres réplicas del entrecruzamiento químico de IPDI presentaron un color azul intenso, evidenciando mayor concentración de grupos  $-NH_2$  libres en este material, disminuyendo la reticulación de este hidrogel.

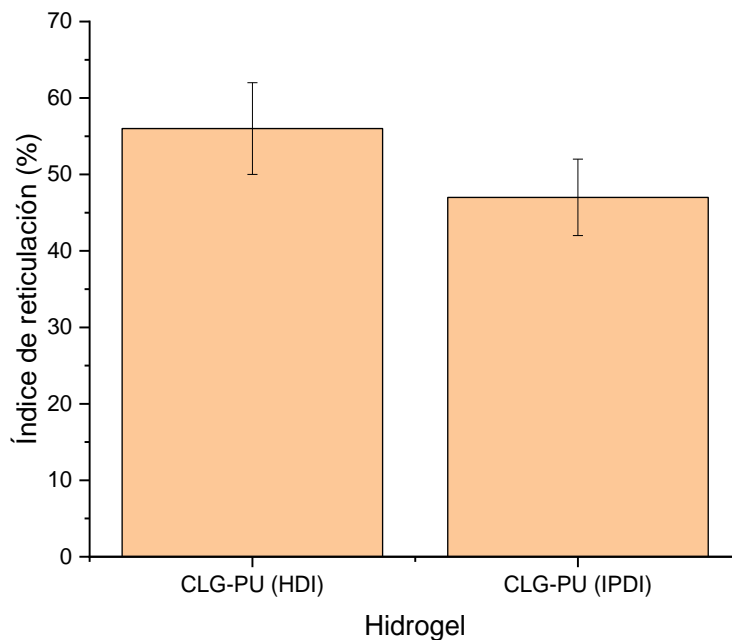


Figura 3.4 Determinación de los índices de reticulación mediante el ensayo de ninhidrina de los hidrogeles CLG-PU (HDI) y de CLG-PU (IPDI). El hidrogel CLG-PU (HDI) produjo un índice de reticulación de  $56 \pm 6$  % en contraste, el CLG-PU (IPDI) presentó un índice de reticulación de  $47 \pm 5$  %, determinados considerando una muestra de CLG marina sin entrecruzar.

El hecho de poder controlar el índice de reticulación de hidrogeles de CLG utilizando moléculas exógenas como reticulantes químicos representa una estrategia clave para regular sus propiedades tanto fisicoquímicas, así como de biocompatibilidad según la aplicación que se le desea dar al hidrogel. Es importante notar que los grados de reticulación mayores al 50 % indican una alta interpenetración de los componentes poliméricos, resultando hidrogeles de naturaleza de redes interpenetradas al reticular la colágena con el PU-(HDI); mientras que los sistemas basados en CLG-PU (IPDI) presentan menor capacidad de interpenetración [51].

### 3.1.3 Caracterización fisicoquímica y mecánica del hidrogel

#### 3.1.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de la CLG marina (*Cassiopea andromeda*) se muestra en la (Figura 3.5). El espectro FTIR de la CLG marina indica principalmente las bandas de alargamiento de los enlaces N-H y O-H entre 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$ , relacionados con los grupos aminoácidos presentes en su estructura; la banda del carbonilo de amida relacionada con los enlaces que unen a los péptidos que conforman a la CLG se observa alrededor de 1650  $\text{cm}^{-1}$ , y finalmente entre la región de 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  se aprecian los enlaces de vibración en el plano del enlace C-H y C-O, región relacionada con la estructura helicoidal de la CLG, vinculado con la alta presencia de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina en su estructura [52].

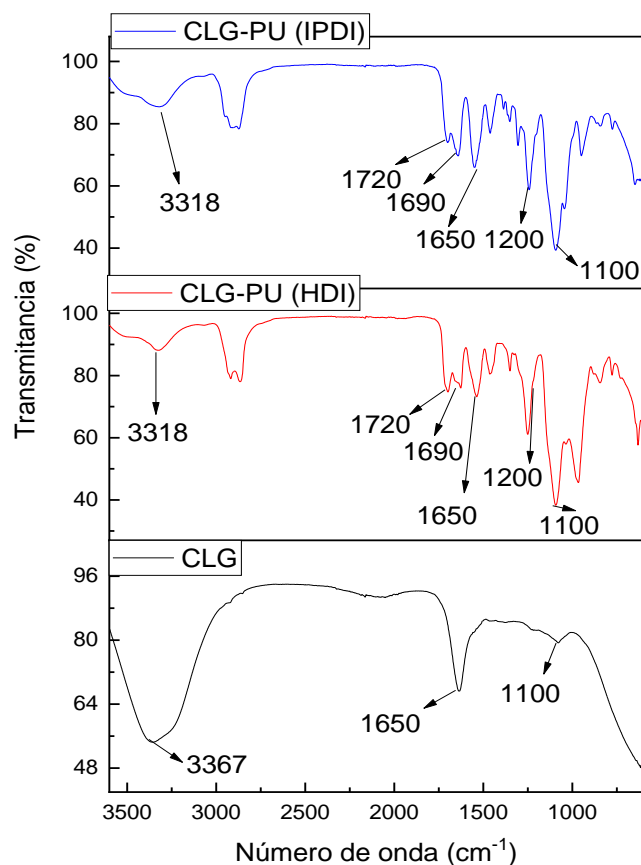


Figura 3.5 Espectros FTIR de la colágena marina y los hidrogeles CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (IPDI).

Para los hidrogeles acoplados con entrecruzantes basados en PU se aprecia en sus espectros de FTIR que la banda relacionada con los enlaces N-H y O-H entre 3500-3000 cm<sup>-1</sup> disminuye, lo cual se asocia a que los grupos amino primarios de la CLG reaccionan con el grupo isocianato del PU para generar enlaces urea de reticulación; además la presencia de dos bandas de carbonilo a 1720 y 1690 cm<sup>-1</sup> son apreciadas, vinculadas con la formación de enlaces urea de entrecruzamiento; la banda típica amida de la CLG sigue apareciendo en los espectros de los materiales entrecruzados en 1650 cm<sup>-1</sup>, con una disminución lo cual está asociado con la generación de un material con estructura interpenetrada; adicionalmente la generación de dos bandas intensas en las regiones de 1200 y 1100 cm<sup>-1</sup> son apreciadas, relacionadas con las vibraciones en el plano de los enlaces C-N y C-O, respectivamente, presentes en los enlaces uretano que conforman a los materiales en estado hidrogel [53]. Es interesante notar que el

material entrecruzado con prepolímero de poliuretano basado en HDI, CLG-PU (HDI) presenta mayor intensidad en la banda de  $1100\text{ cm}^{-1}$  indicando que este entrecruzante genera mayores enlaces de reticulación con la CLG marina, generando un sistema con mayor interpenetración de cadenas poliméricas, tal y como fue visualizado por el análisis del grado de reticulación. En ambos espectros, no es posible observar la banda alrededor de  $2200\text{ cm}^{-1}$  vinculada con la vibración del enlace isocianato (-NCO), indicando que los materiales quedan libres de agente entrecruzante después del proceso de separación y purificación del hidrogel sintetizado. Además, también es posible apreciar que en ambos espectros las señales relacionadas con los enlaces C-H alrededor de  $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  son incrementadas, evidenciando también la funcionalización del agente entrecruzante con la CLG marina [53].

### 3.1.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El termograma DSC muestra los picos endotérmicos característicos asociados con la desnaturalización de la CLG marina, y, la pérdida de enlaces de hidrógeno entre cadenas en las moléculas de tropocolágena produjo cadenas con una estructura desorganizada, llamada gelatina (Figura 3.6). Un índice de reticulación más alto con mayor interpenetración, generado entre CLG y CLG-PU (HDI), dio como resultado una temperatura máxima de desnaturalización  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  más alta en comparación con la CLG sola de  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para CLG-PU (IPDI), la temperatura de desnaturalización fue intermedias en comparación con los hidrogeles reticulados con CLG-PU (HDI). CLG-PU (IPDI) presentó una temperatura de desnaturalización de  $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; lo cual es asociado al menor índice, lo que indica un grado más bajo de interpenetración polimérica.

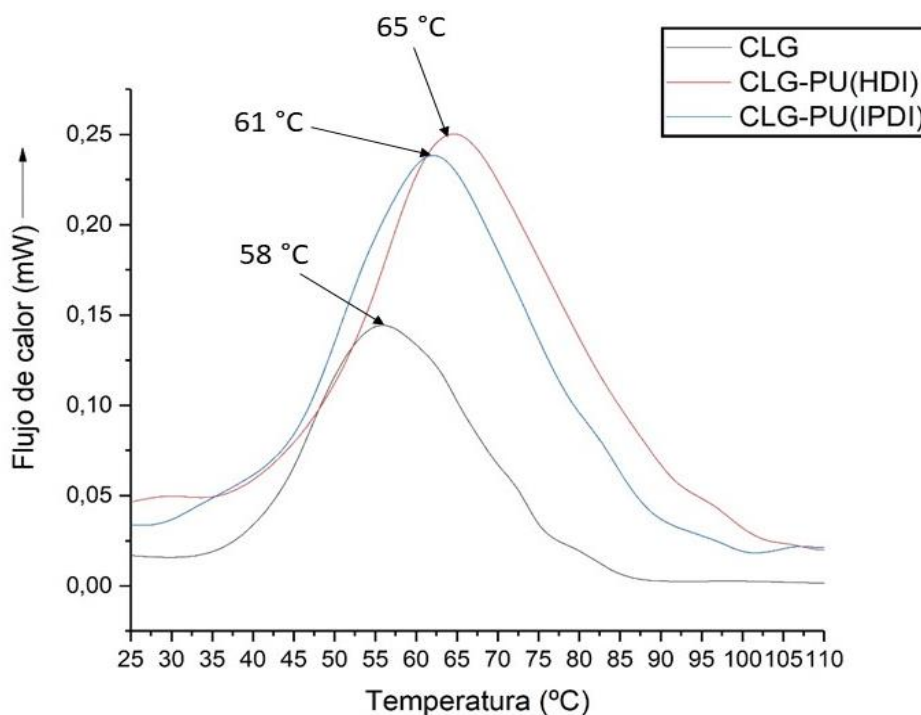


Figura 3.6 Termograma DSC de la colágena marina y del entrecruzamiento de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).

Las diferencias en la estructura química de los agentes sintéticos CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI); regulan la generación de enlaces de reticulación y la formación de interacciones intermoleculares de corto alcance entre las cadenas de polímero, requiriendo temperaturas más altas para lograr la desnaturalización de las moléculas de colágena cuando se usa CLG-PU (HDI); por otro lado, las regiones que incluyen estructuras cicloalifáticas en CLG-PU (IPDI) limitan la reactividad de sus grupos isocianato limitando también la formación de enlaces reticulantes de urea y / o uretano; además de generar sitios de repulsión estérica que no favorecen la formación de estructuras con alta interpenetración, como se observa por la técnica FTIR, en este sentido la temperatura de desnaturalización de este material es menor que la del material a base de CLG-PU (HDI) [54]. Dadas estas características es propio mencionar que la incorporación de reticulaciones químicas y la presencia de interacciones fisicoquímicas de corto alcance como puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals entre las cadenas poliméricas, influyen fuertemente en las propiedades del material. La determinación de la estabilidad térmica es un aspecto importante de la aplicación tecnológica de materiales poliméricos como el PU.

La mejora de la estabilidad térmica de la colágena marina puede utilizarse para generar estrategias de acoplamiento químico de este tipo de hidrogeles con otros agentes, mediante procesos que requieran temperaturas superiores a 60 °C, evitando la desnaturalización, que podría estar asociada a la pérdida de biocompatibilidad de la colágena.

### 3.1.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) para las muestras de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI) se ilustra en la (Figura 3.7).

Los termogramas presentaron tres etapas de pérdida de masa: la primera por eliminación de agua entre 35-120 °C, la segunda relacionada con la degradación endotérmica de matrices poliméricas entre 150 °C-550 °C, y la tercera es la degradación oxidativa entre 600-800 °C, produciendo cenizas.

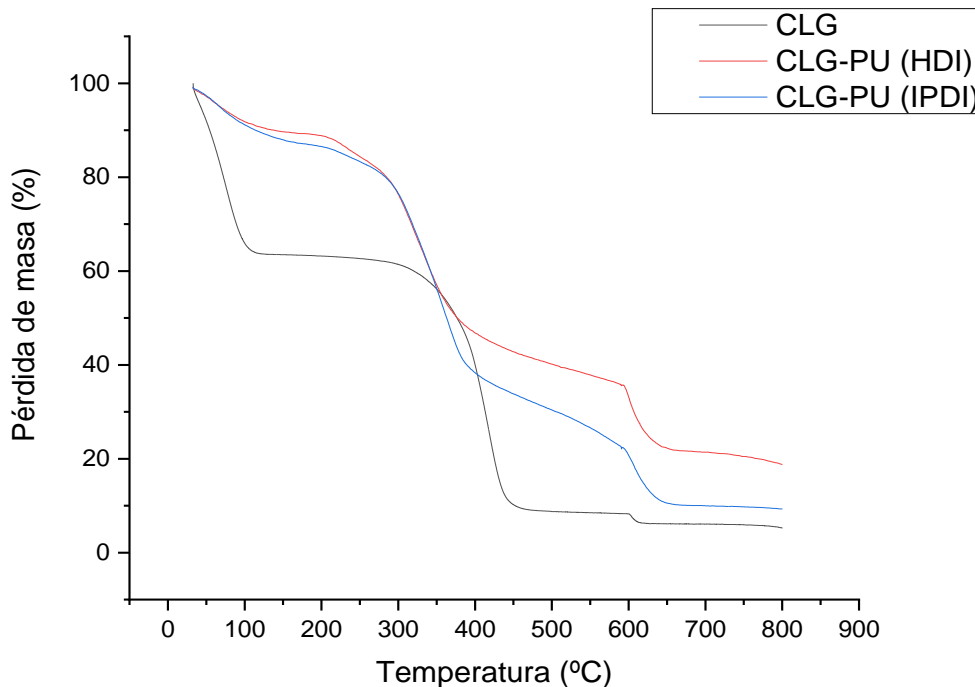


Figura 3.7 Termograma de la CLG marina y la CLG de marina entrecruzada con PU.

La curva de CLG a 120 °C, muestra una pérdida de agua de 38 %, mientras que los hidrogeles de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI) fue de 16 % y 18 % respectivamente. Indicando que el proceso

de interpenetración favorece que el agua encapsulada en estas matrices requiera una temperatura más alta para su evaporación.

En la etapa de degradación endotérmica, a 450 °C, se obtienen pérdidas de masa de 91 %, 53 % y 64 % para CLG, CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. Indicando una mejora en la degradación térmica del 42% y 30%, para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente, en comparación con la colágena sin entrecruzar.

La mejora en la estabilidad térmica se puede explicar debido a las interacciones con el prepolímero de PU y la generación de los enlaces tipo urea ( $\text{HN-C=O-NH}$ ) con la CLG, también con la formación de enlaces de corto alcance como lo es el enlace de hidrogeno intermolecular entre el uretano ( $\text{-NHCOO-}$ ) lo cual regula la degradación térmica [55].

Cabe destacar que la modificación de la estructura química de la CLG por acoplamiento con PU también afecta a sus comportamientos térmicos [55]. Los resultados de DSC van de acuerdo con los analizados por TGA, demostrándose nuevamente que el sistema con mayor interpenetración polimérica CLG-PU (HDI) muestra mejor estabilidad térmica, mejorando notablemente su resistencia a la degradación térmica y elevando la temperatura de desnaturalización de esta proteína.

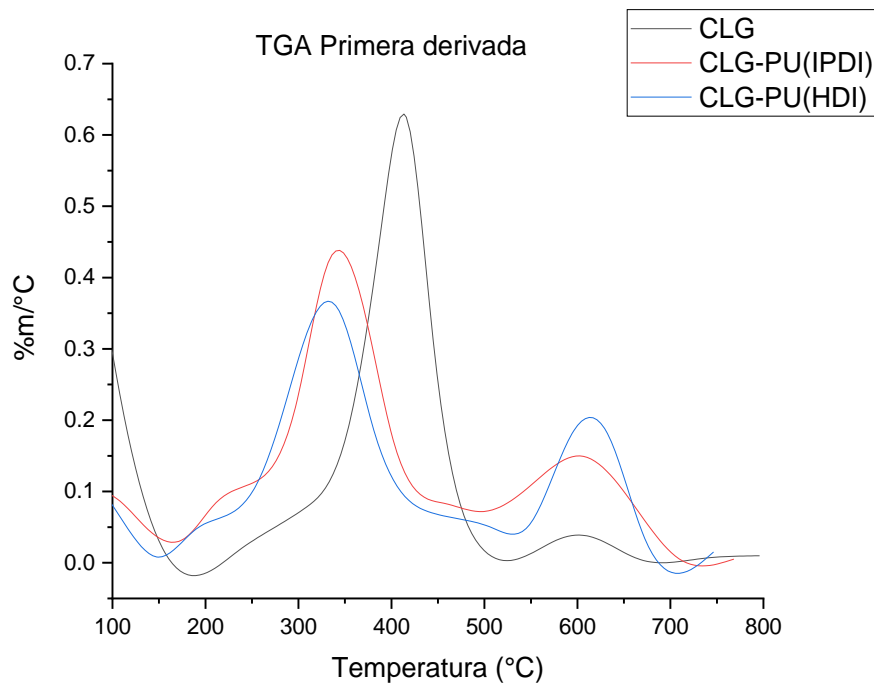


Figura 3.8 Termograma de la primera derivada del hidrogel de CLG y de los hidrogeles entrecruzados.



La tasa máxima de descomposición térmica de los hidrogeles se evaluó mediante la primera derivada de TGA (Fig. 3.8). En la región de descomposición endotérmica, se aprecia que a 410 °C, 380 °C y 387 °C se obtienen las velocidades máximas de descomposición térmica para CLG, CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. Evidenciando que las regiones IPN de los materiales requieren temperaturas de descomposición endotérmica más bajas, relacionadas con sus estructuras amorfas. También es posible apreciar que las áreas bajo las curvas de esta región están de acuerdo con lo evaluado en los termogramas TGA.

La mejora en la resistencia a la degradación térmica se puede explicar por las interacciones intermoleculares que sufre la colágena con los prepolímeros de PU, y con la generación de enlaces de reticulación, requiriendo mayor temperatura para la degradación térmica. Cabe señalar que la modificación de la estructura química de los prepolímeros de PU también afecta este comportamiento de degradación térmica. El hidrogel CLG-PU (HDI) con interpenetración polimérica de mayor grado muestra una mejor resistencia a la degradación térmica y mejora la temperatura de desnaturalización de la colágena marina. Desde el punto de vista químico, los grupos cíclicos del CLG-PU (IPDI) permanecen semi-interpenetrados con la matriz de colágena, reduciendo las interacciones de corto alcance que favorecen estas mejoras térmicas. Se ha demostrado en varios procesos que involucran la modificación fisicoquímica del colágeno con diversos agentes sintéticos y / o naturales para generar hidrogeles, tendencias similares en la modificación del comportamiento térmico, evidenciando así la formación de sistemas semi-IPN o IPN, según sea el caso [55-56].

#### 3.1.3.4 Evaluación de la estructura semicristalina por dispersión de rayos X de gran angular (WASX)

En la (figura 3.9) se presentan los patrones de difracción de rayos X de la CLG de medusa, CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).

El difractograma de CLG exhibe dos señales de difracción a  $2\theta$  de 28° y 31.5 °C, lo que indica que es una superficie amorfa con regiones de baja cristalinidad. Para los hidrogeles IPN con prepolímeros de PU, se aprecia en sus respectivos difractogramas que generan regiones con alto desorden polimérico relacionado con los efectos de interpenetración, generando superficies amorfas evidenciadas por la señal a  $2\theta$  alrededor de 22 °C; además de los efectos de reticulación también se generan regiones con alto empaquetamiento molecular, caracterizadas por superficies de mayor cristalinidad identificadas por la señal a 31.5 °C

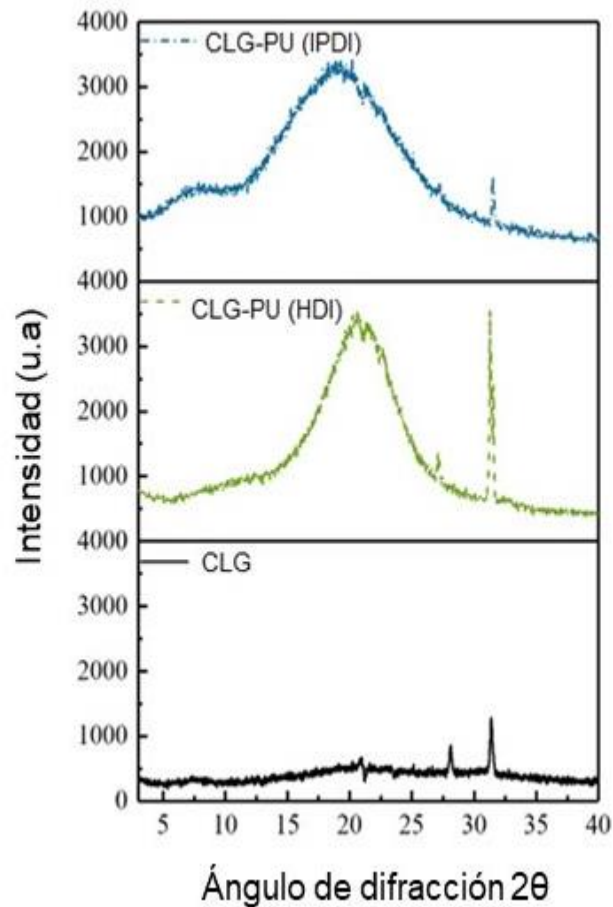


Figura 3.9 Patrones de difracción de rayos X de la colágena marina (CLG), CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).

Comparando las intensidades de señal a 31.5 °C, se puede inferir que el hidrogel CLG-PU (HDI) tiene regiones con mayor cristalinidad que CLG-PU (IPDI), demostrando que el agente PU-(HDI) tiene mejores propiedades fisicoquímicas de interpenetración con la colágena marina, debido a la formación de enlaces de reticulación superiores y mediante la generación de asociaciones intermoleculares de corto alcance, como enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que producen regiones moleculares muy empaquetadas con una alta capacidad para difractar los rayos X; esto puede estar relacionado con la estructura lineal de este agente de reticulación. Por otro lado, las regiones cíclicas presentes en PU-(IPDI) representan regiones rígidas y amorfas, disminuyendo estas interacciones intermoleculares para generar estructuras con empaquetamiento de alto peso molecular [53-56].

### 3.1.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la (Figura 3.10) se presenta la microscopía de los hidrogeles. El hidrogel de CLG marina (a) presenta una estructura fibrilar con poros definidos por la interconexión de las fibras de colágena, típica para la CLG [57]. En la figura (b) y (c) se presenta la morfología de los hidrogeles de CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (HDI) respectivamente. Para el hidrogel CLG-PU (IPDI) se presenta una morfología plana y homogénea, con porosidad irregular, debido a la composición química del agente entrecruzante lo cual está asociado con el contenido de estructuras cicloalifáticas en la estructura del prepolímeros de IPDI. Es importante mencionar que la mecánica y estructura de los hidrogeles dependen de la reticulación de los agentes entrecruzantes HDI e IPDI. En el caso del hidrogel CLG-PU (HDI) presenta una microestructura caracterizada por agregados de microesferas interconectados lo cual es debido a la estructura química del agente entrecruzante; al ser una molécula lineal flexible, este tipo de reticulante puede interpenetrar a la colágena recubriéndola, generando microesferas, que tienen la capacidad encapsular el agua en su interior [58].

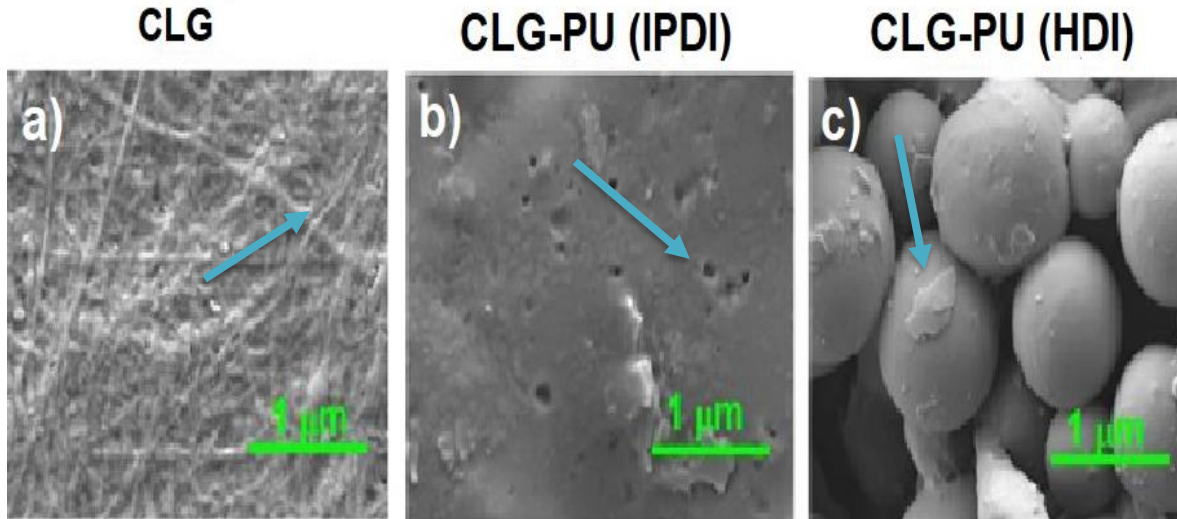


Figura 3.10 Micrografía de SEM de los hidrogeles. (a) hidrogeles de CLG, (b) y (c) representan los hidrogeles entrecruzados con poliuretano.

### 3.1.4 Estudio del comportamiento mecánico de los hidrogeles

En la figura 3.11 se presentan los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) de los hidrogeles de CLG marina y del entrecruzados con CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).

Todas las muestras muestran un módulo de almacenamiento alrededor de un orden de magnitud mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ) (datos no mostrados); lo que significa que todas las muestras presentaron un comportamiento del tipo hidrogel. Dado que el módulo elástico está asociado con la densidad de reticulación en la estructura del hidrogel, la figura 3.10 muestra que la respuesta elástica de los hidrogeles de CLG de marina mejora después del entrecruzamiento con PU.

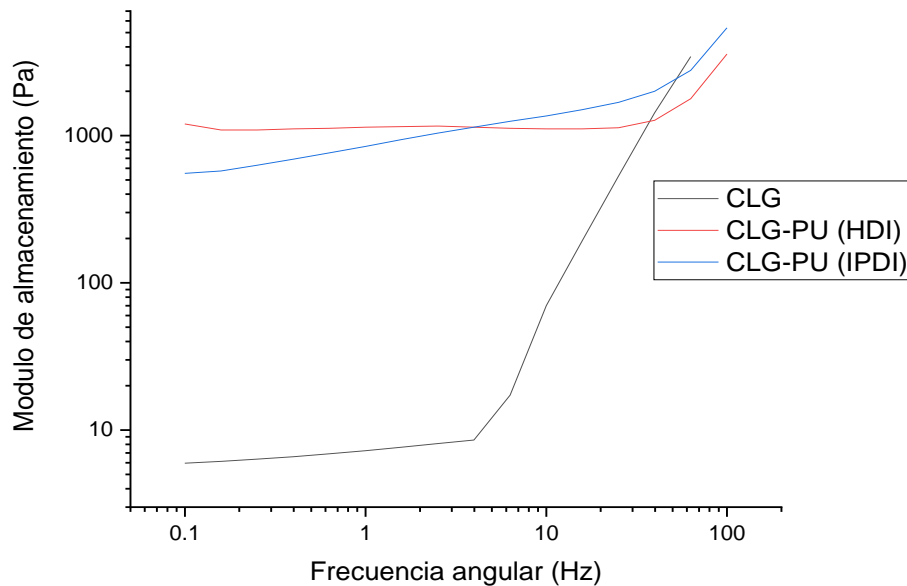


Figura 3.11 Propiedades reológicas: módulo de almacenamiento vs la frecuencia de los materiales estudiados.

El valor de la  $G'$  de los hidrogeles de CLG aumentó después de modificarlos con CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI). El incremento del módulo de almacenamiento tuvo una relación directa con la extensión de reticulación, que fue inducida por el PU. Agentes que produjeron un índice de reticulación más alto dentro de fibrilar incrementaron significativamente el  $G'$  de la matriz interpenetrada. La matriz también generó más refuerzo aumentando el módulo de

almacenamiento, con lo que el agua retenida en su interior necesita de mayor esfuerzo para que salga de esta.

Se observa que el comportamiento para CLG-PU (HDI) subió un 30% más en comparación con CLG-PU (IPDI), lo cual era de esperarse que sucediera debido a las características del material y a sus propiedades químicas, relacionadas con el mayor carácter de interpenetración. Como se observa en la (Figura 3.11) al calcular el porcentaje de mejora mecánica considerando el módulo a una frecuencia en términos de %; se aprecia una mejoría mecánica de 12,875 % para CLG-PU (HDI) tomando como frecuencia angular 1 Hz en comparación con CLG-PU (IPDI) que presenta un porcentaje de 9,500 %. Estos refuerzos nuevamente indican valores de  $G'$  para sistemas poliméricos con alta interpenetración.

Por otra parte, la presencia de altas regiones amorfas y/o rígidas en el material CLG-PU (IPDI) disminuye su módulo de almacenamiento.

El material CLG-PU (HDI) que presenta una mayor cristalinidad asociada a una microestructura de esferas aglomeradas es el que presenta una mejora significativa en su módulo de almacenamiento. Por otro lado, la presencia de regiones amorfas y / o rígidas en una estructura lisa en el material CLG-PU (IPDI) reporta menos refuerzo mecánico. La reticulación por los enlaces de uretano y urea producidos entre los prepolímeros de PU y la colágena marina promueve esta mejora mecánica, así como las interacciones intermoleculares de corto alcance entre los componentes poliméricos. Se ha informado que la generación de enlaces de reticulación en hidrogeles a base de colágena con polímeros sintéticos, como poliuretano, polisacáridos y poliacrilato, mejora la  $G'$  de los hidrogeles desarrollados en una relación dependiente de la concentración y estructura de los polímeros de acoplamiento [59-60]. Esta mejora mecánica se puede utilizar para el encapsulado de componentes bioactivos que aseguren la eficacia biomédica, evitando que la matriz se deforme durante el uso, así como modulando sus propiedades de hinchamiento y difusión de los componentes bioactivos encapsulados, lo que representa una estrategia innovadora para la generación de nuevos hidrogeles para medicina regenerativa.

### 3.1.5. Cinética de hinchamiento y degradación

Los hidrogeles tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, gracias a sus redes poliméricas tridimensionales, este tipo de característica es esencial, por su alto contenido de líquidos, en especial el agua debido a que los hace compatibles con los tejidos y su exposición a éstos minimiza su daño cuando se implantan en ellos. Para ajustar la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles, es necesario ajustar la naturaleza y la cantidad de los componentes utilizados durante su síntesis [61-62].

En la (Figura 3.12) se presenta la cinética de hinchamiento y degradación de los hidrogeles de CLG marina y PU basados en CLG-PU (IPDI) Y CLG-PU (HDI), respectivamente. Se inició la cinética con 100 mg de polímero en seco y se fue monitoreando durante 30 días. Se usaron tres réplicas de las cuales se sacó un promedio, para diferentes medios de evaluación: PBS 1X, HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M, papaína y colagenasa tipo I (14 U/material), esto con el fin de monitorear los perfiles de hinchamiento y degradación en cada una de las soluciones, y estudiar la influencia del entrecruzamiento químico que cada PU lleva a cabo en estas propiedades de los hidrogeles.

Los perfiles de absorción de agua muestran que el índice de reticulación influyó en el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles.

Los matrices hidratadas presentaron un tiempo de degradación diferente, esto puede deberse a la estructura química interpenetrada originada en cada sistema, otros factores importantes a considerar son: la forma y la superficie del material, estos afectan la velocidad de degradación.

En la Figura (a) se presenta la cinética de los hidrogeles CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI) los cuales fueron sometidos a la solución de PBS 1 X a pH 7.4. En condiciones fisiológicas, las matrices exhiben una capacidad máxima de hinchamiento de  $739 \pm 26\%$  a los 3 días y  $296 \pm 18\%$  a los 4 días, para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente; posteriormente las matrices tienden a degradarse hidrolíticamente, registrando variaciones de sus masas iniciales de  $142 \pm 16\%$  y  $23 \pm 14\%$ , para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. Se aprecian tendencias similares en el comportamiento de hinchamiento y degradación tanto a pH ácido como fisiológico, donde nuevamente la matriz que incluye el agente interpenetrante PU (HDI) en su estructura exhibe un mejor hinchamiento y degradación. En las estrategias de medicina regenerativa, las matrices son necesarias para que puedan regular su comportamiento de degradación a medida que se forma el nuevo tejido, construyendo así un nuevo tejido sin defectos.

Posteriormente, en la figura (b) se evaluó la cinética de los hidrogeles sometidos a una solución de HCl con pH 2, las matrices exhiben una capacidad máxima de hinchamiento de  $704 \pm 23\%$  a

los 4 días, y  $438 \pm 18\%$  a los 5 días, para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente; posteriormente, las matrices se degradan hidrolíticamente para registrar una variación de masa de  $138 \pm 32\%$  y  $32 \pm 13\%$  (con respecto a su masa inicial) a los 16 días de incubación, para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. El alto grado de interpenetración en el hidrogel CLG-PU (HDI) asegura un alto hinchamiento en medio ácido y también ralentiza su velocidad de degradación; en el sistema CLG-PU (IPDI), las regiones obstaculizadas que limitan la interpenetración muestran susceptibilidad a la degradación ácida. Estos resultados se pueden utilizar para aplicaciones en entornos ácidos donde exudados ácidos están presentes o se encapsulan moléculas de esta naturaleza; no limitando el hinchamiento de la matriz y controlando su degradación.

Bajo pH alcalino, (pH 12) (c), las matrices muestran menores capacidades de hinchamiento, registrando valores de  $571 \pm 31\%$  a los 5 días y  $490 \pm 27\%$  a los 2 días de incubación para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente; posteriormente las matrices se degradan; obteniendo una degradación completa para la matriz CLG-PU (IPDI), y una variación de la masa inicial de la matriz CLG-PU (HDI) de  $106 \pm 23\%$  a 16 días. La alta presencia de grupos hidroxilo disminuye la difusión de agua en la matriz, reduciendo su capacidad de hinchamiento; además, la matriz interpenetrante con PU (HDI) muestra resistencia a la degradación alcalina relacionada con la mayor cristalinidad; las regiones cíclicas relacionadas con la limitación de la interpenetración, incluidas en las regiones amorfas del hidrogel CLG-PU (IPDI), exhiben una alta susceptibilidad a la hidrólisis alcalina. Teniendo esto en cuenta, la matriz CLG-PU (HDI) sería útil para estudiar la liberación de moléculas a pH alcalino, o para aplicaciones de medicina regenerativa que incluyan exudados alcalinos, sin limitar su funcionalidad por degradación o falta de hinchamiento [48].

En presencia de papaína (d), los hidrogeles exhiben capacidades máximas de hinchamiento de  $776 \pm 32\%$  a los 5 días, y  $612 \pm 27\%$  a los 6 días, para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente; posteriormente las matrices tienden a perder agua, obteniendo variaciones de sus masas iniciales de  $240 \pm 18\%$  y  $106 \pm 23\%$  a los 16 días de incubación. La interpenetración de la colágena marina con agentes de prepolímeros de PU evita la degradación por papaína en el momento evaluado. La degradación por papaína ocurre en regiones específicas de la cadena de colágena, luego de la interpenetración con el agente de prepolímeros de PU, la enzima no es capaz de identificar las secuencias de aminoácidos específicas evitando la degradación de la matriz de colágena.

Por otro lado, en presencia de colagenasa (e), se registraron capacidades máximas de hinchamiento de  $522 \pm 34\%$  y  $406 \pm 31\%$  a los 6 días de incubación, para CLG-PU (HDI) y CLG-

PU (IPDI), respectivamente; posteriormente las matrices pierden agua obteniendo variaciones de sus masas iniciales de  $174 \pm 12\%$  y  $128 \pm 10\%$  a los 16 días; nuevamente, el proceso de interpenetración de la colágena marina con estos agentes sintéticos evita la degradación por colagenasa en el tiempo evaluado. En la medicina regenerativa, es importante que el material muestre un control de la biodegradación, mediada por enzimas específicas que son liberadas por el huésped, asegurando una regeneración tisular regular [49-50].

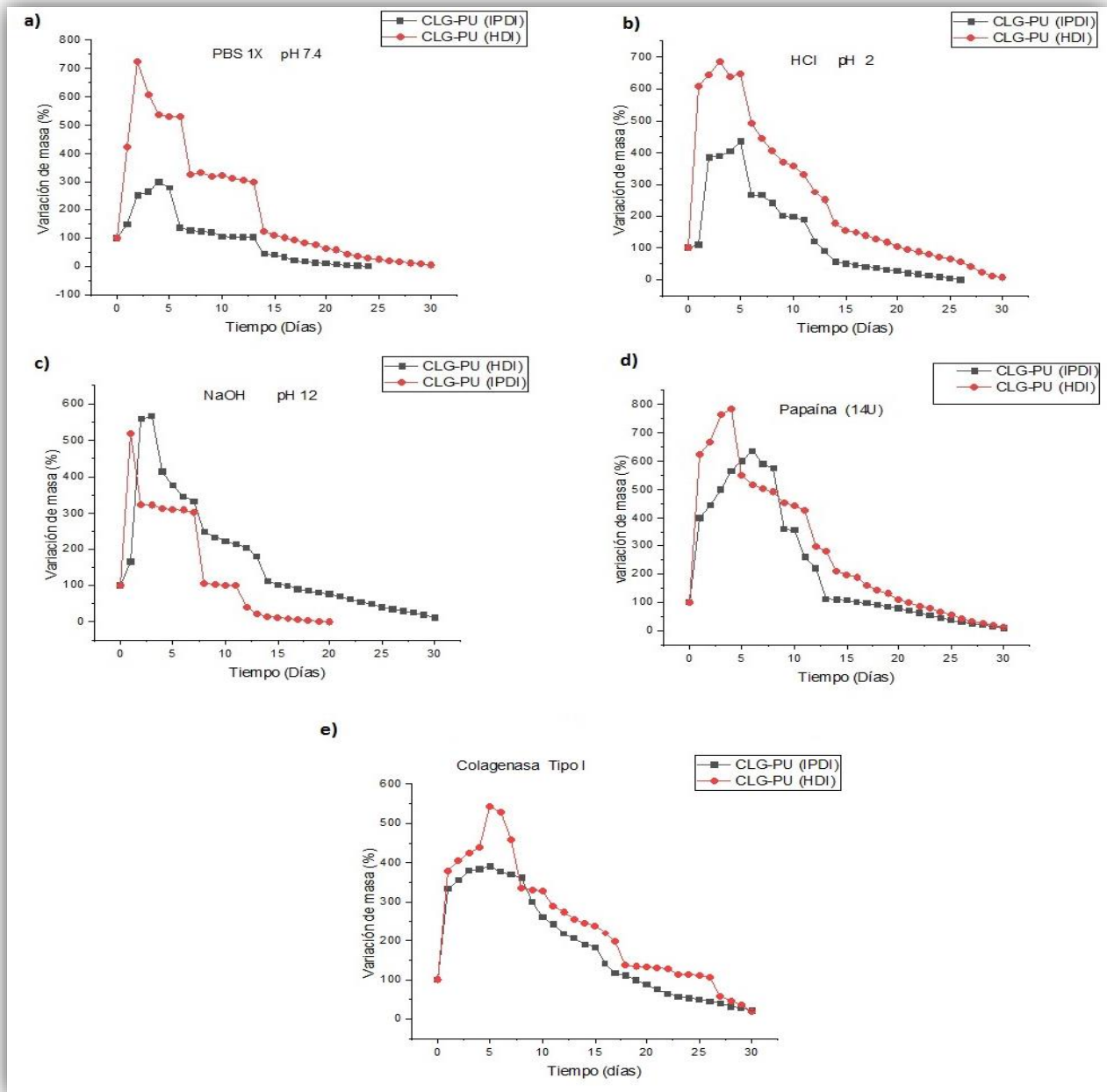


Figura 3.12. Estudio del comportamiento de hinchamiento y degradación de los hidrogeles de CLG marina: (a) PBS 1X, (b) HCl, (c) NaOH, (d) papaína y (e) colagenasa tipo I.



Una condición que tomar en cuenta para predecir la degradación de los hidrogeles, son las propiedades mecánicas, ya que estas se encuentran estrechamente relacionadas, un hidrogel con alta capacidad mecánica es ideal para que las condiciones de degradación sean de manera controlada de modo que el tejido circundante se regenere mientras que las cargas que se producen sean soportadas por el hidrogel mientras se genera nuevo tejido [63-64].

### 3.1.6 Ensayo de inhibición bacteriana

Es fundamental evaluar la capacidad de los hidrogeles para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. El crecimiento de este tipo de microorganismos está relacionado con procesos de daño tisular crónico que muestran resistencia a la cicatrización, debido a que la presencia bacteriana limita la funcionalidad celular del huésped nativo [65]. La bacteria *E. coli* está relacionada con infecciones fuertes en lesiones crónicas [66], por lo que desarrollar hidrogeles que muestren resistencia a su crecimiento es una estrategia innovadora para asegurar el éxito de la aplicación. En la (figura 3.13) se presenta el efecto de inhibición bacteriana de los hidrogeles.

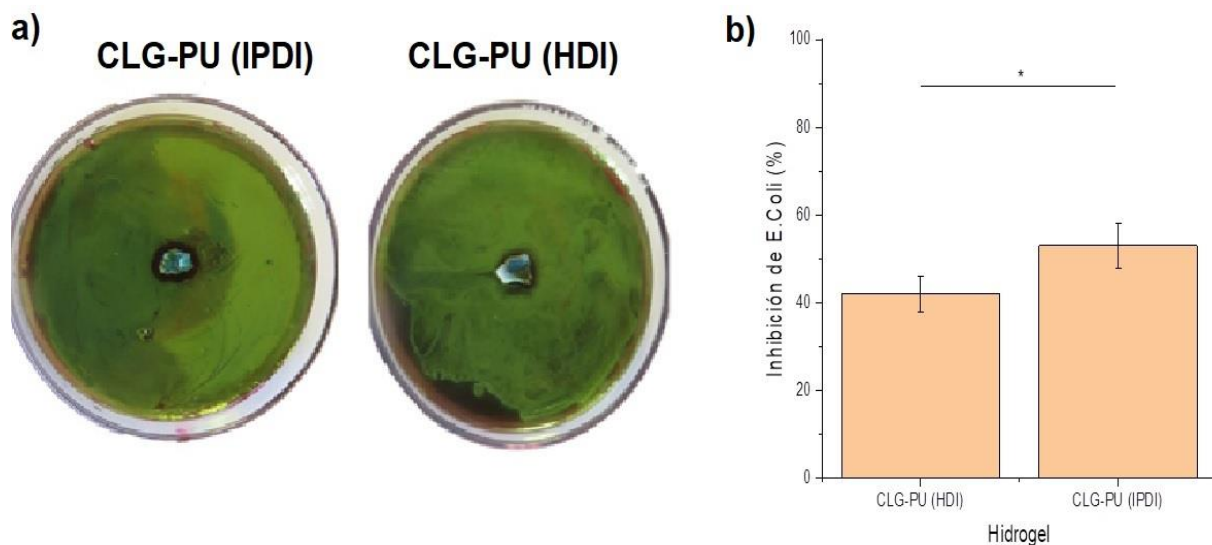


Figura 3.13 Efecto de la inhibición bacteriana de los hidrogeles. (a) CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (HDI), b) determinación de la capacidad de inhibición (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

Los resultados de la evaluación de la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli* mediante la técnica de formación de halo de inhibición, indican capacidades de inhibición de  $42 \pm 4 \%$  y  $53 \pm 5 \%$  para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. La colágena no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de este microorganismo; determinando que la interpenetración de esta proteína marina con el agente sintético proporciona esta capacidad a los hidrogeles de IPN desarrollados. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de inhibición de CLG-PU (IPDI) con respecto a CLG-PU (HDI), lo que indica que regiones amorfas con bajo grado de interpenetración favorecen la inhibición del crecimiento de este patógeno. Se ha informado de que la presencia de polisacáridos y poliácridato en matrices basadas en colágena también muestra la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano; lo cual se relaciona con la secreción de subproductos de degradación de las matrices en estado hidrogel que tienen naturaleza bactericida, impidiendo que crezcan sobre el material, generando los halos característicos de inhibición [67]. La presencia de esta propiedad en estos novedosos hidrogeles de IPN garantiza que no se utilicen moléculas antibacterianas exógenas, potenciando su aplicación en los campos de la medicina biomédica y regenerativa.

### 3.1.7 Determinación de la biocompatibilidad del hidrogel

#### 3.1.7.1 Viabilidad de los monocitos humanos sobre los hidrogeles

Se evaluó la biocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles determinando los efectos de la composición de los hidrogeles sobre el metabolismo de monocitos (Figura 3.14).

Las células en hidrogeles tienden a modificar su metabolismo, directamente relacionado con su capacidad activa para respirar, por lo que el ensayo MTT determina la modificación del metabolismo celular por efectos citotóxicos. Las sales de bromuro de tetrazolio se reducen por la acción de las enzimas mitocondriales para generar cristales insolubles de formazán [68].

En la figura 3.14 se presentan los resultados del ensayo realizado en los hidrogeles a las 24 y 48 horas de contacto en cultivo de monocitos humanos.

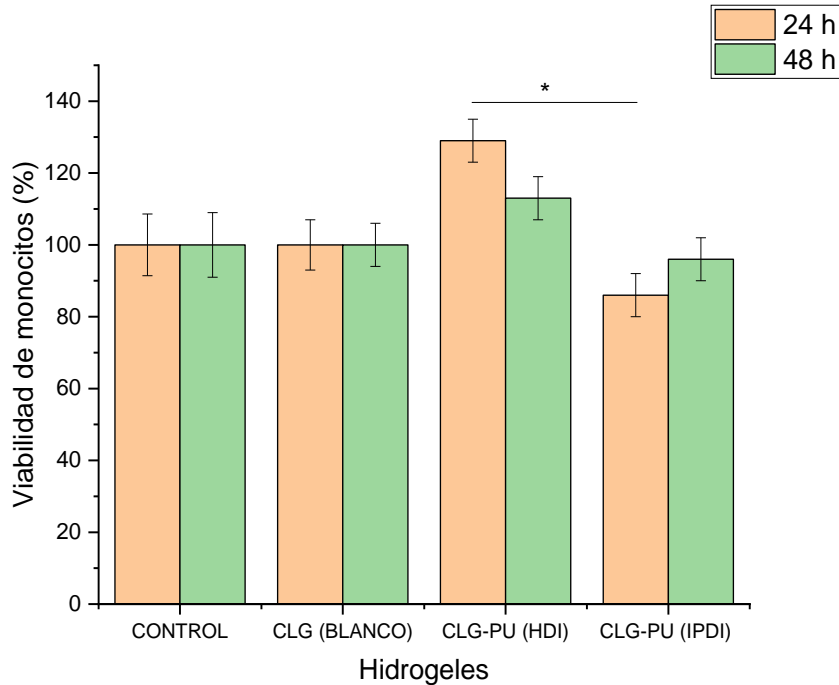


Figura 3.14 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad *in vitro*, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para monocitos (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

Los resultados indican que, a las 24 h y 48 h de incubación de los monocitos en presencia de los hidrogeles, presentaron valores de actividad metabólica similares al control ( $100 \pm 3$  %) (monocitos creciendo libres de materiales), indicando que la composición de los hidrogeles de IPN no presentan carácter citotóxico para estas células del sistema inmunológico. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de actividad metabólica de los monocitos a las 24 h de los hidrogeles de IPN; lo que indica que la estructura presente en el hidrogel CLG-PU (HDI) tiende a acelerar la capacidad de reducir el formazán, aumentando la actividad metabólica de los monocitos en esta matriz. Esta mejora en tiempos de incubación cortos de la actividad metabólica de los monocitos que crecen en estas novedosas matrices; se puede utilizar para estrategias de medicina regenerativa que requieren la activación de las células del sistema inmunológico para mejorar la cicatrización del tejido [69]. El aumento de la actividad respiratoria de los monocitos en las superficies a base de CLG-PU (HDI) puede estar relacionado con una alta difusión de nutrientes y oxígeno hacia las células, favoreciendo su capacidad reductora.

En base a los resultados anteriores la superficie basada en CLG-PU (IPDI) queda más libre o se segrega más fácilmente hacia los monocitos, incrementando su capacidad respiratoria para reducir el MTT a formazan.

### 3.1.7.2 Viabilidad de los fibroblastos dérmicos porcinos

Los fibroblastos son células que regulan los procesos de generación de tejido nuevo. Garantizar que su actividad metabólica no se vea alterada por la composición de los hidrogeles, asegura la eficacia del biomaterial en estrategias biomédicas como los apósitos de cicatrización de heridas [70].

La modificación superficial de la estructura fibrilar que caracteriza al hidrogel del CLG es un parámetro que determina su biocompatibilidad. La modificación de reticulación química realizada por la TPU trifuncional es decisiva para alterar la biocompatibilidad de los hidrogeles de CLG. Se ha reportado que concentraciones superiores al 40 % en peso de PU disminuyen considerablemente la viabilidad de macrófagos y fibroblastos, ya que la modificación superficial de la estructura fibrilar genera matrices con alta citotoxicidad [70].

Se evaluó la actividad metabólica de los fibroblastos porcinos (Figura 3.15). Los fibroblastos son células que forman tejidos epiteliales, cartilagosos y dérmicos, responsables de la regeneración tisular [71]. En este sentido, evaluar si los hidrogeles diseñados pueden modular la actividad metabólica de estas células representa una estrategia fundamental para los hidrogeles con potencial aplicación en medicina regenerativa. Los resultados muestran que, a las 24 h y 48 h de incubación, se obtienen tendencias similares con respecto al control, en la actividad metabólica de los fibroblastos que crecen sobre hidrogeles de IPN; indicando que la composición de los hidrogeles de IPN tampoco presenta carácter citotóxico para el crecimiento de estas células. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas en los valores registrados de actividad metabólica de fibroblastos en los hidrogeles de IPN; lo que indica que los fibroblastos pueden crecer y respirar sin efectos positivos o negativos relacionados con la estructura del hidrogel. De esta manera, los hidrogeles de IPN se pueden aplicar para estrategias de medicina regenerativa que incluyen fibroblastos que crecen en presencia de estas nuevas matrices.

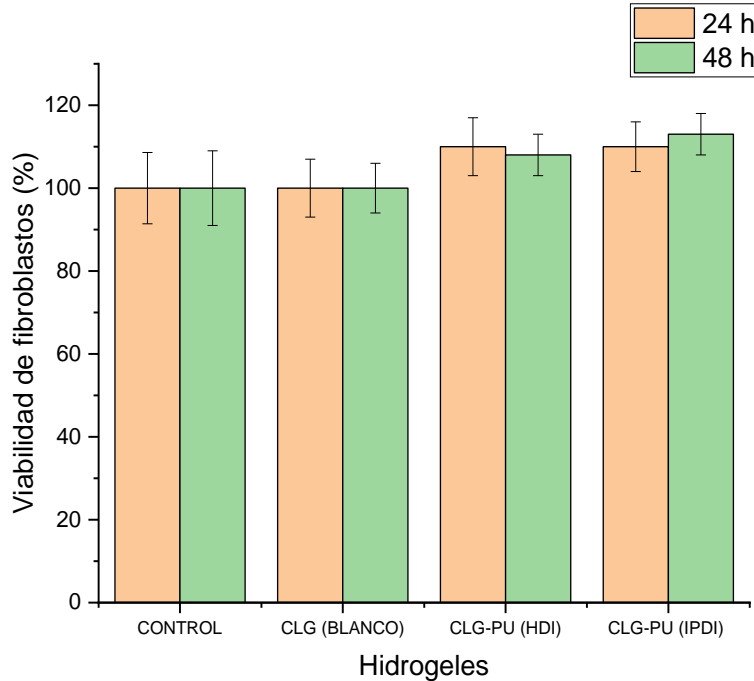


Figura 3.15 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad *in vitro*, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para fibroblastos ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

### 3.1.7.3 Estudios de hemocompatibilidad in vitro

El ensayo de hemólisis es una prueba de compatibilidad sanguínea simple e importante, ya que se informa que es un indicador de la citotoxicidad del material deseado. En general, cuando los glóbulos rojos entran en contacto con el agua, se someten a una lisis completa liberando hemoglobina y otras biomoléculas. Sin embargo, el fenómeno de ruptura también ocurre durante el contacto con sustancias extrañas debido al estrés osmótico excesivo ejercido por la superficie del material incompatible. El difosfato de adenosina liberado por los glóbulos rojos dañados intensifica la atracción y el ensamblaje de plaquetas hacia la superficie del material. Esto, a su vez, puede acelerar el desencadenamiento de cascadas de coagulación y trombosis, eventualmente perturbando el ciclo de cicatrización de la herida. Por lo tanto, un material diseñado para el tratamiento de lesiones dérmicas no debe dañar los glóbulos rojos circulantes

en el sitio de la herida, además de no influir en la activación de las vías de coagulación [72]. En la figura 3.16 se presentan las capacidades hemolíticas de los hidrogeles.

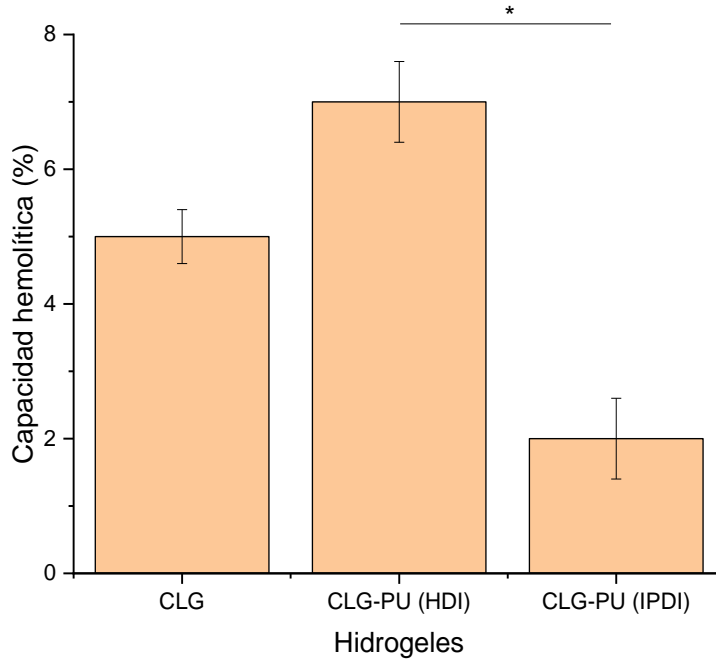


Figura 3.16 Capacidad hemolítica (%) de los hidrogeles (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

Se registraron capacidades hemolíticas de  $5 \pm 1\%$ ,  $7 \pm 2\%$  y  $2 \pm 2\%$  para CLG, CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), respectivamente. Estos valores clasifican a los hidrogeles de IPN como no hemolíticos para CLG y CLG-PU (IPDI), que no producen una lisis significativa en los glóbulos rojos; y como levemente hemolítico para CLG-PU (HDI) (valor superior al 5%) indicando que su composición y estructura producen una leve rotura de las membranas eritrocitarias, liberando la hemoglobina transportada. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de los sistemas CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI). En este sentido, la estructura amorfa y bajo grado de interpenetración que caracteriza al hidrogel CLG-PU (IPDI) se relaciona con bajos efectos hemolíticos, generando un hidrogel con alta hemocompatibilidad; por otro lado, la alta interpenetración presente en el hidrogel CLG-PU (HDI) así como las regiones de alta cristalinidad pueden estar asociadas a estos daños en la membrana eritrocitaria, caracterizándola como un material ligeramente hemolítico. Los hidrogeles con alta hemocompatibilidad son necesarios para aplicaciones exitosas en medicina regenerativa, evitando la coagulación de la sangre en los huéspedes y favoreciendo los procesos de regeneración tisular [73-74].

### 3.2 Hidrogeles de colágena marina encapsulados con secretoma de células troncales

#### 3.2.1 Síntesis de hidrogeles de colágena marina-encapsulados con secretoma de células troncales y entrecruzado con poliuretano.

En las (Figura 3.17) se ilustran los hidrogeles que se obtuvieron al realizar la copolimerización aleatoria a 60 °C. El hidrogel de CLG-PU (HDI)/S (b) presentó una estructura blanda con alta maleabilidad sin sufrir deformación por presión en comparación con el hidrogel de CLG-PU (IPDI)/S (c) el cual presentó una estructura un poco más rígida, y esto está asociado con el contenido de estructuras cicloalifáticas en la estructura del IPDI. Ambos materiales muestran la capacidad de absorber agua, lo que demuestra su comportamiento de hidrogel. Como se observa en la figura (b) los hidrogeles CLG-PU (HDI)/S tuvieron una mayor capacidad de absorber y mantener el secretoma en su interior esto debido a la estructura química del agente entrecruzante. La encapsulación del secretoma (a) se realizó en condiciones estériles y previamente se hicieron lavados a los hidrogeles con PBS 1X, posteriormente, se usó una concentración de secretoma de 200  $\mu\text{l}/\text{mL}$  en la encapsulación de todos los hidrogeles.

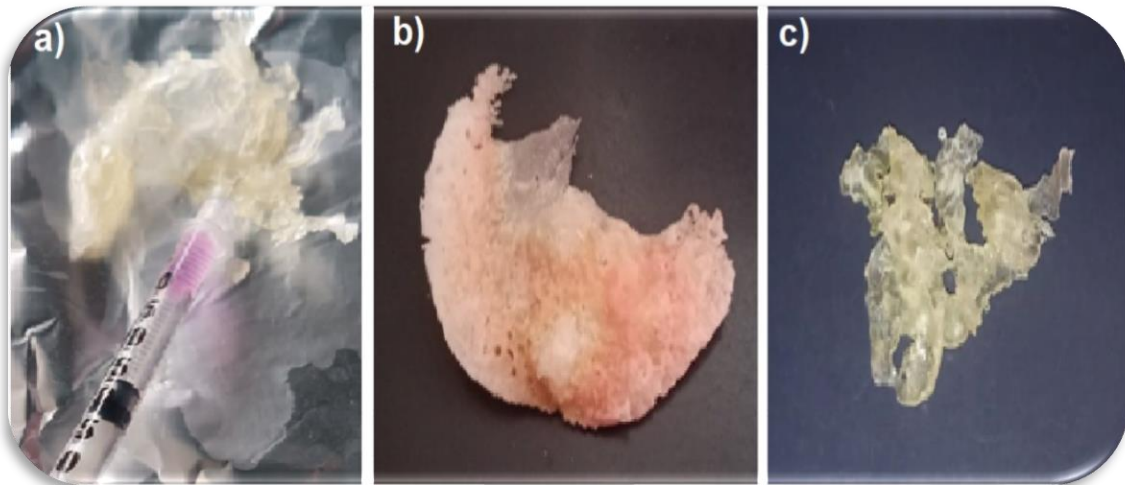


Figura 3.17 (a) encapsulación de los hidrogeles con secretoma, (b) el hidrogel encapsulado CLG-PU (HDI)/S y (c) se presenta el hidrogel CLG-PU (IPDI)/S.

### 3.2.2 Caracterización fisicoquímica y mecánica de los hidrogeles

#### 3.2.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR de los hidrogeles entrecruzados y encapsulados con secretoma se muestran en la (Figura 3.18 y 3.19). Para CLG-PU (HDI)/S se presenta una banda más pronunciada a  $3357\text{ cm}^{-1}$  en comparación de la banda de CLG-PU (HDI) la cual es característico de los enlaces N-H y O-H indicando que este hidrogel presenta mayor contenido de péptidos provenientes del secretoma de las células troncales. En el intervalo de  $3000$  y  $2800\text{ cm}^{-1}$  se presentan dos bandas que son características de C-H [74].

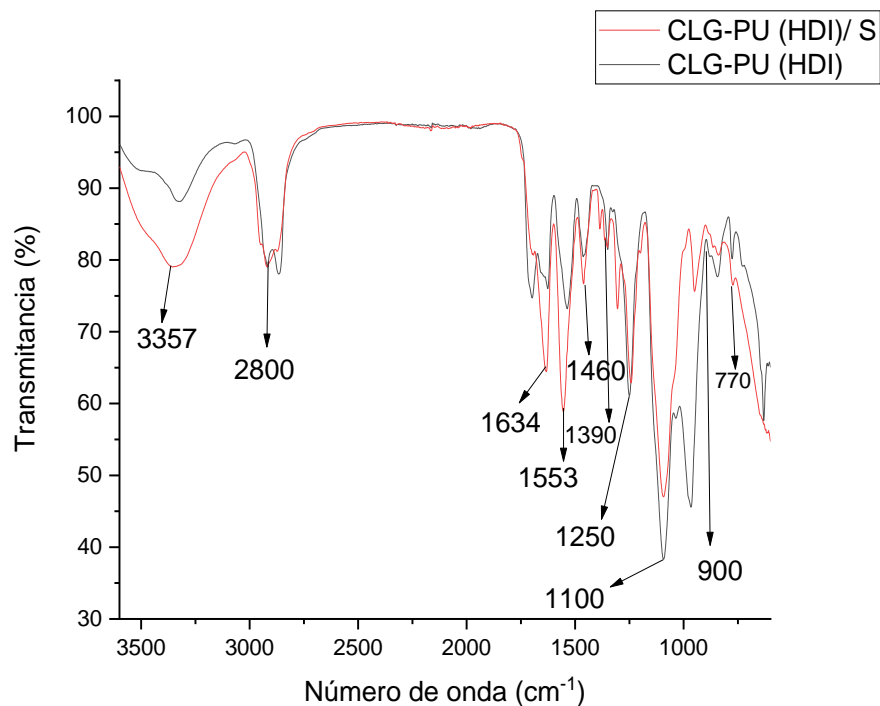


Figura 3.18 Espectros FTIR de los hidrogeles CLG-PU (HDI) y de los hidrogeles CLG-PU (HDI)/S.

Las dos bandas a  $1634\text{ cm}^{-1}$  y  $1553\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de estiramiento de C=O y N-H respectivamente. El desplazamiento de estas bandas, indica interacciones de puente de hidrogeno de esta matriz en estado hidrogel con los componentes del secretoma, así como el incremento en intensidad también indica que moléculas con grupos carbonilo están encapsuladas; estas moléculas son oligopéptidos y lípidos funcionales provenientes del secretoma de células troncales. Las bandas a  $1460$  y  $1390\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con los grupos



CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> debido a la presencia de lípidos y proteínas contenidos en el secretoma. Las bandas detectadas en la región espectral entre 1250 y 770 cm<sup>-1</sup> son típicas de las vibraciones de estiramiento de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol [75]. La modificación de la región de interpenetración en el hidrogel, observada en el intervalo de 1100-900 cm<sup>-1</sup>, se ve significativamente modificada en ambos materiales, indicando que los componentes del secretoma se quedan adsorbidos en esta matriz disminuyendo su capacidad de vibración.

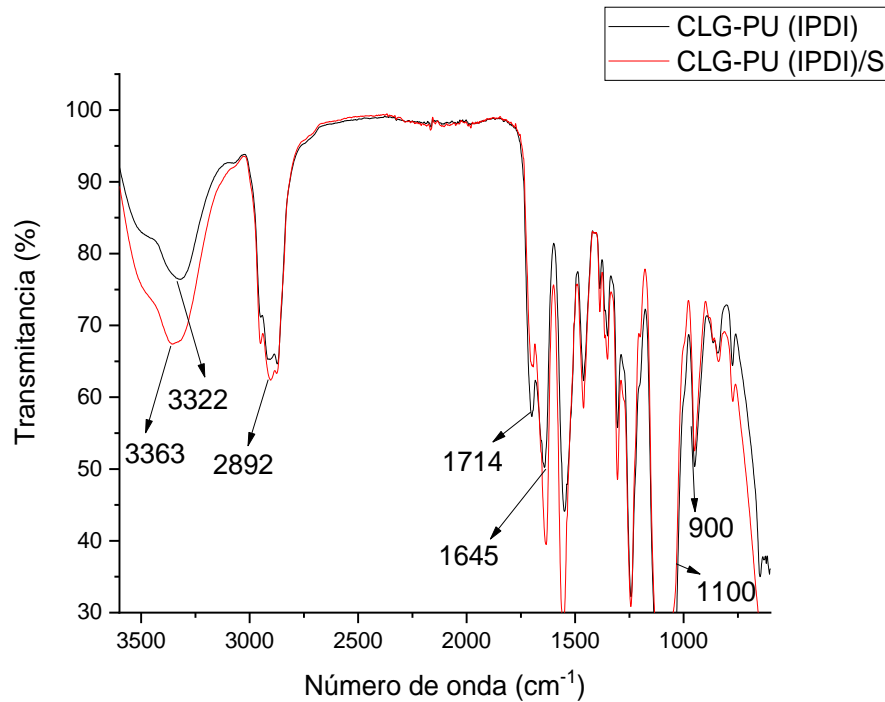


Figura 3.19 Espectros FTIR de los hidrogeles CLG-PU (IPDI) y de los hidrogeles CLG-PU (IPDI)/S.

En la (Figura 3.19) se presenta el FTIR de CLG-PU (IPDI)/ S se presenta la banda típica de la amida a 3363 cm<sup>-1</sup>, el grupo funcional de C-H se encuentra a 2892 cm<sup>-1</sup>, y dos bandas a 1714 y 1645 cm<sup>-1</sup> las cuales son características del grupo carbonilo. El incremento de la intensidad de la banda N-H y O-H 3363 cm<sup>-1</sup> indica también el acoplamiento de componentes peptídicos del secretoma. Sin embargo, en este sistema no es observada un desplazamiento y/o incremento en las señales en la región asociada con el grupo carbonilo (C=O), indicando que esta matriz no genera interacciones adsorptivas con los componentes del secretoma encapsulados; lo que hace que sean más fácil de liberarse de esta matriz. Además, esto es confirmado ya que la región característica para este sistema interpenetrado alrededor de 1100-900 cm<sup>-1</sup> no sufre cambios significativos con o sin secretoma acoplado [75].

### 3.2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la (figura 3.20) se observa el termograma de los hidrogeles que fueron encapsulados con secretoma; estos se corrieron a una velocidad de calentamiento de 0.1 °C/min.

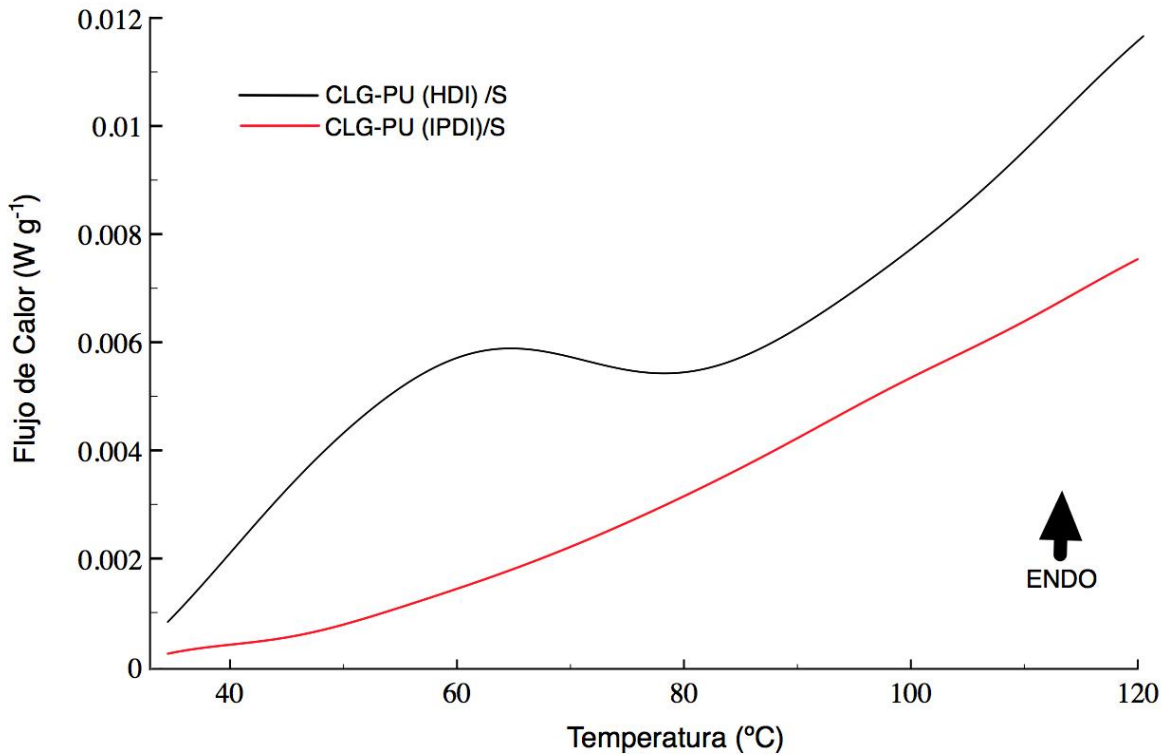


Figura 3.20 Termograma DSC de los hidrogeles encapsulados CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.

La endoterma de desnaturalización de la gelatina que presenta CLG-PU (HDI) / S, está alrededor de los 48°C. Esta temperatura depende del origen de la gelatina. Para los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S al hacer la interpenetración, las moléculas que interpenetran inhiben el movimiento de las moléculas de gelatina, evitando la desnaturalización, por esa razón no aparece la endoterma. Otro factor importante para considerar podría ser que, durante la reacción de interpenetración, la gelatina se desnaturaliza, y esa sería la razón de no observar la endoterma.

La estructura lineal del prepolímero basado en PU (HDI)/S mejora la interpenetración con la colágena generando una superficie para generar interacciones de corto alcance con los

componentes del secretoma, tales como puentes de hidrogeno, interacciones de Vander Waals, fuerzas de London, mejorando la encapsulación. Sin embargo, al entrecruzar la CLG con PU (IPDI)/S, las regiones cicloalifáticas presentan repulsión con los componentes del secretoma disminuyendo las interacciones de adsorción y generando un matriz con menos compatibilidad con el secretoma, lo cual se asocia con la menor capacidad calorífica registrada para este sistema [75].

### 3.2.2.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico para los hidrogeles entrecruzados y encapsulados con secretoma se presenta en (Figura 3.21) se observan los cambios en la descomposición de los hidrogeles y se puede apreciar claramente la presencia de las tres etapas características en los termogramas.

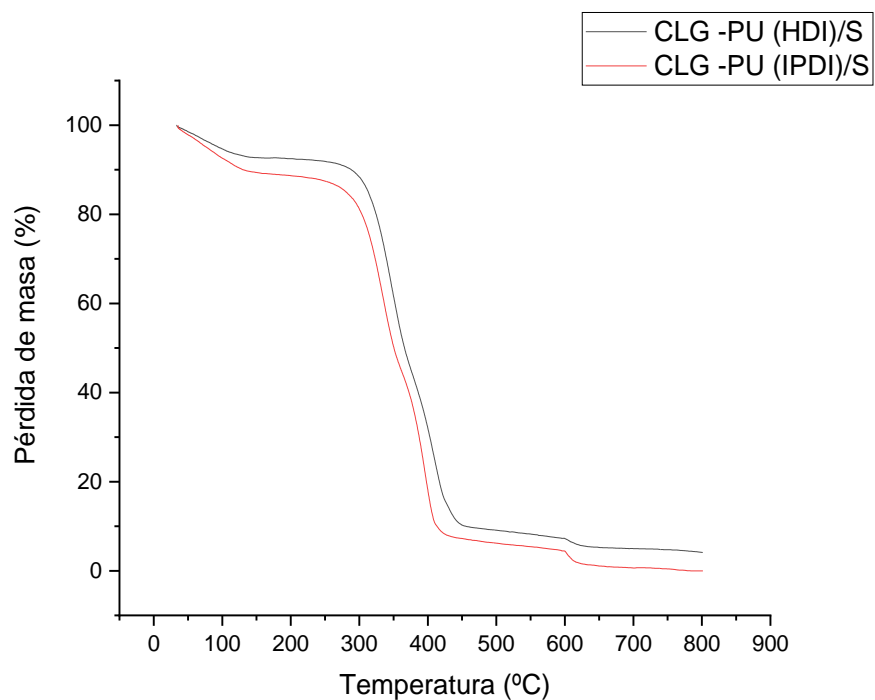


Figura 3.21 Termograma de los hidrogeles encapsulados con secretoma.

En el caso de CLG-PU (HDI)/ S presenta la primera etapa eliminación de H<sub>2</sub>O a los 100 °C con una pérdida de masa del 7 %, para el hidrogel CLG-PU (IPDI)/S presentó una pérdida de masa del 10 % a los 100 °C. Para ambos hidrogeles la etapa de degradación térmica se presenta en el intervalo de los 300 a los 450 °C con una pérdida de masa inicial 85 % para CLG-PU (HDI)/S y

del 80 % para CLG-PU (IPDI) seguido de una pérdida en 500 °C y 800 °C resultante de la combustión de los componentes orgánicos residuales, con un porcentaje de pérdida de masa del 10 % para CLG-PU (HDI)/S y un 8 % de pérdida de masa para CLG (IPDI)/S. Las interacciones de adsorción que los componentes del secretoma tienen con la matriz evidencian variación en su resistencia a la degradación térmica. En este sentido, la matriz que muestra mayor acoplamiento con el secretoma presenta mayor pérdida de masa, es decir el hidrogel basado en CLG-PU (HDI) tiene mayor contenido de materia orgánica adsorbida y muestra mayor pérdida de masa, que aquel basado en CLG-PU (IPDI) que no muestra la misma capacidad de adsorber los componentes del secretoma.

En la (Figura 3.22) se presentan las curvas termogravimétricas de la primera derivada para los hidrogeles de CLG entrecruzados y encapsulados con secretoma CLG-PU (HDI)/ S y CLG-PU (IPDI)/ S; la presencia de secretoma en los hidrogeles entrecruzados desestabiliza la integridad de la matriz de los hidrogeles de CLG-PU, por lo tanto, disminuye su resistencia a la degradación térmica [75-76]. El sistema basado en CLG-PU (IPDI) muestra mayor pérdida de agua, y componentes de bajo peso molecular del secretoma en el intervalo de 100 a 150 °C, que el sistema de CLG-PU (HDI) con secretoma encapsulado. En el intervalo de temperatura que corresponde a la degradación endotérmica entre 300-450 °C es observado que el sistema CLG-PU (HDI)/S muestra menor pérdida de masa, indicando que las interacciones adsorptivas retardan este evento de descomposición, comparado con el sistema CLG-PU (IPDI)/S que evidencia mayor pérdida de masa (mayor área bajo la curva). En la región de oxidación térmica alrededor de 600-800 °C muestra menor pérdida de masa que los sistemas sin encapsular secretoma, debido a que la presencia de los componentes del secretoma presenta sitios que aceleran la descomposición de la matriz a bajas temperaturas.

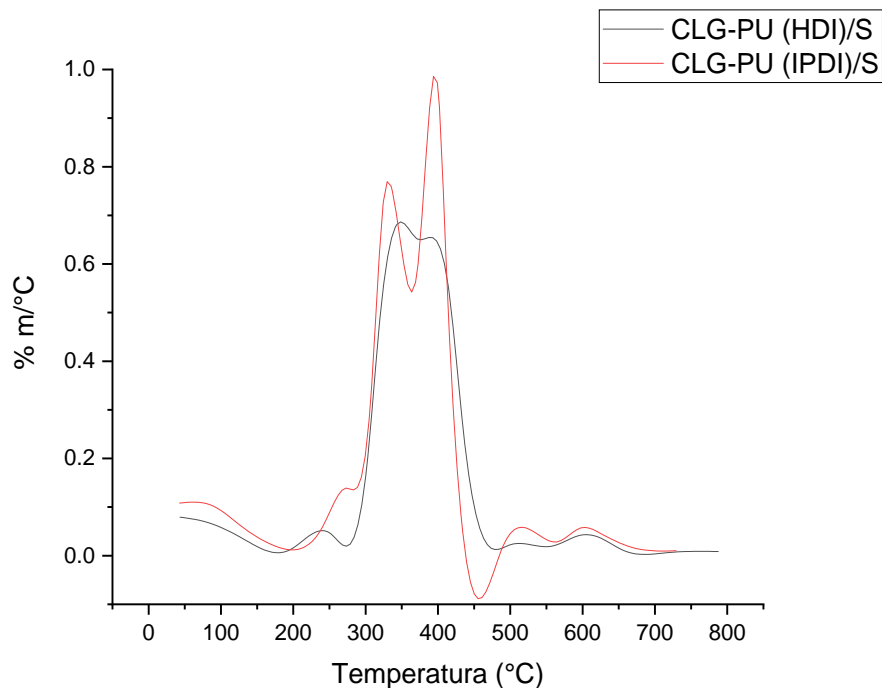


Figura 3.22 Curvas de la primera deriva del TGA de CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.

#### 3.2.2.4 Evaluación de la estructura semicristalina por dispersión de rayos X de gran angular (WAXS)

En la (Figura 3.23) se presentan los patrones de difracción de rayos X de CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.

Comparando los difractogramas para cada sistema es percibido que la encapsulación del secretoma de células madre trocales en la matriz en estado hidrogel basada en CLG-PU (IPDI) y CLG-PU (HDI) tiende a generar regiones amorfas. La amplia composición bioquímica del secretoma genera interacciones en las matrices en estado hidrogel que no origina planos de ordenamiento cristalino, produciendo superficies sin orden específico [76]. Este tipo de evidencias demuestran que los componentes del secretoma se encuentran encapsulados por interacciones físicas y/o electrostáticas con las cadenas poliméricas que conforman a los hidrogeles.

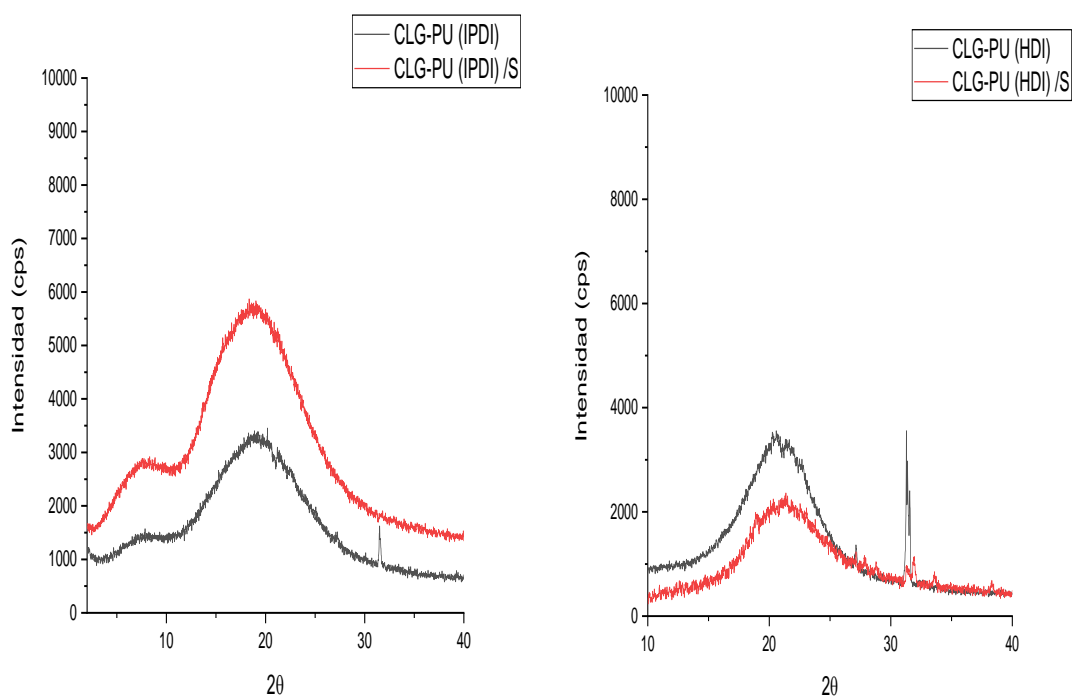


Figura 3.23 Patrones de difracción de rayos X de la colágena de marina (CLG), CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.

Los componentes moleculares presentes en el secretoma no generan enlaces de reticulación con los grupos funcionales presentes en las matrices en estado hidrogel, ya que no se presenta incremento en las regiones semicristalinas de los materiales sin secretoma. Comparando las intensidades de los difractogramas, es evidenciado que el hidrogel CLG-PU (IPDI) muestra mayor intensidad de las regiones amorfas indicando que los componentes del secretoma se encuentran con menor capacidad de encapsulación física. Por otra parte, la menor intensidad de las regiones amorfas del sistema CLG-PU (HDI) indican que el secretoma se encuentra adsorbido en regiones más internas de este novedoso material. Esto puede influir significativamente en la capacidad que tendrán los componentes del secretoma para poder influenciar su respuesta biológica en la aplicación de UVs.

### 3.2.2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la (Figura 3.24) se presenta la microscopía de los hidrogeles. En las figuras (a) y (b) se presentan los hidrogeles encapsulados con secretoma, los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S

presentan una morfología plana con algunas regiones rugosas en la superficie lo cual afecta en el tamaño de poro y podría favorecer el crecimiento celular. Los hidrogeles CLG-PU (HDI)/S tienen una morfología de microesfera porosa debido a la capacidad de reticulación del PU. Además, la estructura química del agente entrecruzante facilita la adsorción del secretoma, por lo cual el hidrogel mostró una gran capacidad de hinchamiento, así mismo este comportamiento influyó en la modificación de la porosidad.

También la morfología de microesfera porosa podría ayudar a la proliferación y adhesión de las células troncales. [77].

La presencia del secretoma en los materiales genera zonas con rugosidad característica, lo cual sucede por las interacciones entre las matrices poliméricas con los componentes del secretoma. En el CLG-PU (HDI)/S presenta mayor rugosidad evidenciando que hay mayores interacciones de encapsulamiento en este tipo de material, mientras que en el hidrogel basado en CLG-PU (IPDI)/S; se observa sólo una fina capa rugosa asociada con el secretoma, indicando que hay menos interacciones de encapsulamiento (compatibilidad de fases) con el secretoma.

La evaluación de la microestructura de los hidrogeles permite correlacionar los resultados referenciados de la estructura química, reticulación y cristalinidad, determinando su comportamiento mecánico y térmico. El reticulante de PU trifuncional tiene un efecto directo en el proceso de polimerización, los enlaces de urea reticulantes con su capacidad elastomérica permiten adaptar el diámetro de la fibra.

Es importante destacar que los sistemas de redes interpenetradas (IPN) desarrollados en este trabajo exhiben la característica de superficies con porosidad interconectada característica, lo que es garantía de una alta biocompatibilidad relacionada con la colágena. Este tipo de morfología superficial se asocia a la difusión de oxígeno y metabolitos importantes que regulan el crecimiento celular [70-77].

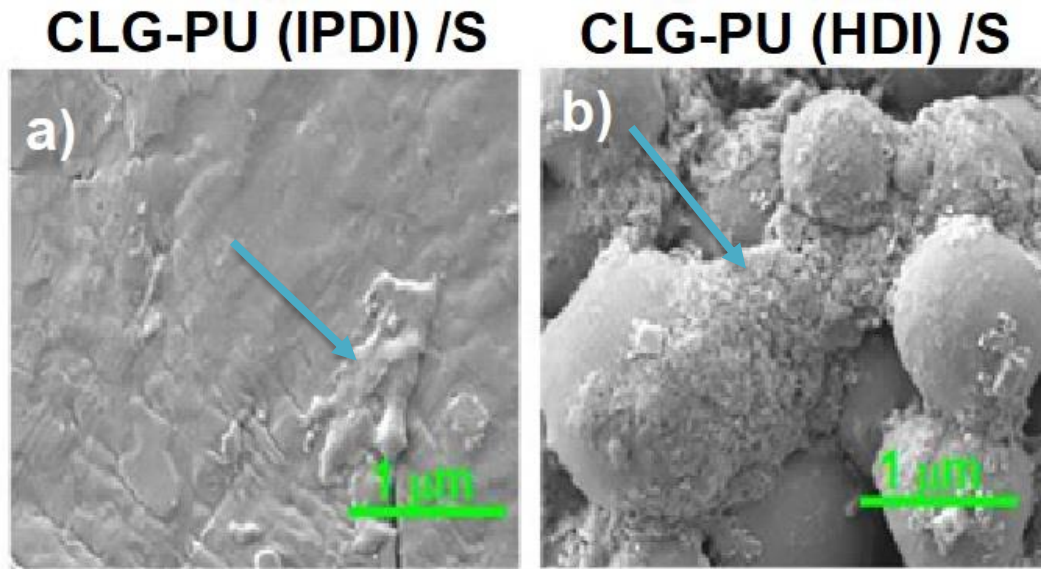


Figura 3.24 Micrografía de SEM. (a) hidrogel de CLG-PU (IPDI) /S y (b) hidrogel de CLG-PU (HDI) /S.

### 3.2.3 Comportamiento mecánico de los hidrogel

Las propiedades mecánicas de los hidrogel incluyendo los componentes del secretoma se evaluaron midiendo el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) (Figura 3.25). Todos los materiales estudiados presentaron un módulo de almacenamiento superior a su módulo de pérdida ( $G' \gg G''$ ) lo que indica un comportamiento típico de hidrogel [77]. Se calculó el porcentaje de mejora mecánica tomando como base una frecuencia de 1 Hz, para CLG-PU (HDI) /S se presentó una mejora mecánica del 38562.2 % y para el hidrogel CLG-PU (IPDI) / S presentó una mejora mecánica de 410112.5 %.



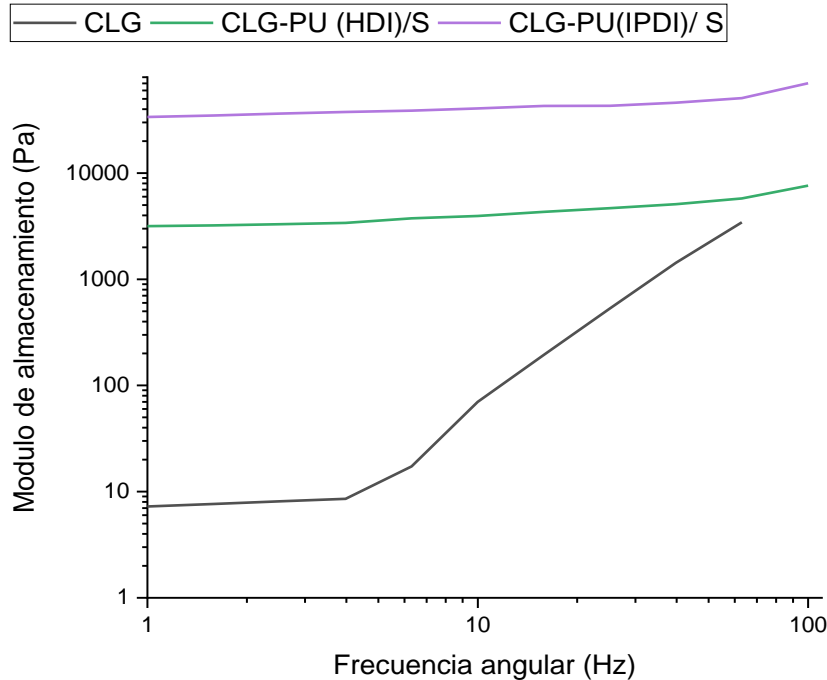


Figura 3.25 Propiedades reológicas: módulo de almacenamiento vs la frecuencia angular de los materiales estudiados.

Se observan los efectos de los componentes del secretoma en el incremento de  $G'$ . En el caso del hidrogel CLG-PU (IPDI) al tener mayor disponibilidad de moléculas de secretoma superficiales incrementa considerablemente la resistencia a la deformación de la matriz en estado hidrogel; mientras que el sistema basado CLG-PU (HDI) al tener mayor encapsulamiento interno del secretoma hace que no incrementa tanto el  $G'$  por los efectos de la absorción de los componentes del secretoma observados en la figura 4.9 [78]. Sin embargo, el valor de  $G'$  sigue siendo alto con la CLG nativa.

En general el secretoma si tiene interacciones fisicoquímicas con las matrices y mejora significativamente las propiedades mecánicas en la matriz IPN basada PU (IPDI).

### 3.2.4 Cinética de hinchamiento y degradación hidrogeles

Los hidrogeles encapsulados con secretoma se incubaron en solución de colagenasa tipo I (3mL, 25 ° C, actividades de 15 U por cada hidrogel) y en una solución de proteolítica de papaína (14 U / gel) y se pesaron diariamente; iniciando con 100 mg de hidrogel encapsulado con secretoma para ambos tipos de entrecruzante CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S.

En la figura 3.26 se presentan los hidrogeles encapsulados con secretoma; en la cinética de los hidrogeles que fueron sometidos a una solución de colagenasa tipo I, para los hidrogeles de CLG-PU (HDI)/S; presentaron su máxima ganancia de masa en el día 7 de incubación alcanzando un 1067 % en contraste con los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S que alcanzaron su máxima variación de masa en el día 4 con un 410 % de hinchamiento. Teniendo una degradación continua en el día 8 para los hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S y finalmente al concluir los 30 días de la cinética los hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S no se degradaron, presentaron una masa del 300 % presentando una mejor resistencia a la degradación de colagenasa comparado con los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S. Para los hidrogeles de CLG-PU (IPDI) /S presentaron menor capacidad de hinchamiento y se degradaron por completo en el día 30.

Estas diferencias están relacionadas con la estructura química de los entrecruzantes empleados en la síntesis de los hidrogeles, que brindan configuraciones espaciales específicas de los componentes del secretoma dentro de la matriz en estado hidrogel. Debido a estas configuraciones los grupos polares del secretoma pueden asociarse con moléculas de agua incrementando el hinchamiento; evidentemente las estructuras de IPN generadas de PU (HDI) muestran mayor libertad de los componentes del secretoma favoreciendo la captación de agua. Los hidrogeles basados en CLG-PU (IPDI) muestran impedimento molecular disminuyendo la captación acuosa.

Las moléculas derivadas del secretoma son polares y tienden a incrementar la capacidad de hinchamiento. Debido a que absorbe mayor cantidad de agua, los tiempos de degradación se ven afectados. La concentración usada de colagenasa tipo I permite a la enzima activa penetrar y degradar los hidrogeles [79].

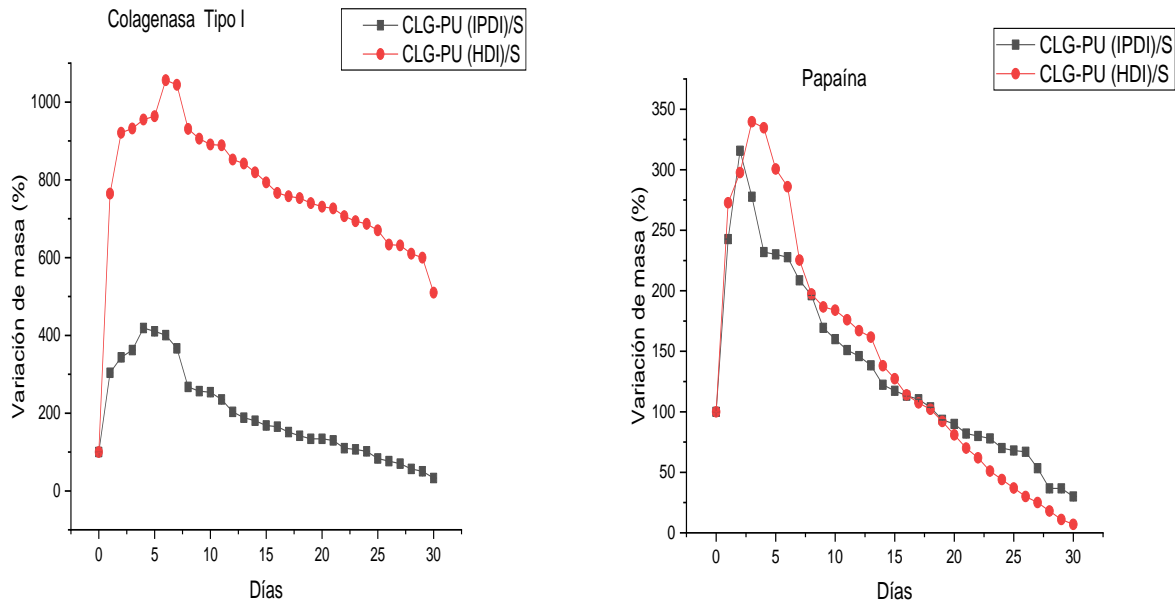


Figura 3.26 Estudio del comportamiento de hinchamiento y degradación de los hidrogeles encapsulados de CLG-PU (IPDI)/S y CLG-PU (HDI)/S en soluciones de colagenasa tipo I y papaína.

En condiciones proteolíticas, en presencia de papaína 14 U / gel, (Figura 4.10) se registran comportamientos de hinchamiento en períodos cortos de tiempo, para el hidrogel CLG-PU (HDI)/S se observa a los 4 días de incubación su punto máximo de hinchamiento de 347 % de variación en su masa, y siendo notorio la degradación a partir del día 6 teniendo una variación en su masa del 290 % en contraste el hidrogel de CLG-PU (IPDI) /S presentó su máximo pico de hinchamiento en el tercer día con una variación en su masa del 335 % y siendo notorio su declive en el día 5 de incubación llegando a una variación en su masa del 230 % con una gran rapidez en su degradación; donde ambos hidrogeles se degradaron por completo al terminar los 30 días de su cinética. La interacción de las matrices híbridas con la enzima aumenta la capacidad de absorción de agua en periodos de incubación bajos. Posteriormente, la enzima se puede difundir en las matrices hinchadas y degrada a la CLG, registrándose a los 7 días de incubación masas remanentes.

Al degradarse la matriz más rápido se liberarán con mayor facilidad moléculas del secretoma y esto impactará directamente en la actividad biológica de las células a las que se quieren aplicar.

Los estudios de hinchamiento y degradación de las matrices en estado hidrogel para aplicaciones en biomedicina permiten visualizar su desempeño, ya que las matrices deben presentar capacidad de degradación e hinchamiento adaptada a diferentes medios hidrolíticos y proteolíticos. Los subproductos o metabolitos que tienen un carácter ácido y / o alcalino podrían alterar la estabilidad de la matriz 3D al influir en su rendimiento [79]. Por otro lado, los hidrogeles también deben presentar biodegradación evaluada por el efecto de las enzimas proteolíticas, lo que permite la formación de tejido nuevo sin deformación ni cicatrización, ya que el tejido nuevo se forma a medida que se biodegrada el hidrogel. El hinchamiento y la difusión controlados también dependen del pH y son parámetros que deben tenerse en cuenta cuando se encapsulan moléculas o células bioactivas dentro de hidrogeles asegurando su liberación controlada y sostenida [79].

### 3.2.5 Ensayo de inhibición bacteriana

En la (figura 3.27) se presenta el efecto de inhibición bacteriana de los hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S y CLG-PU (IPDI) /S.

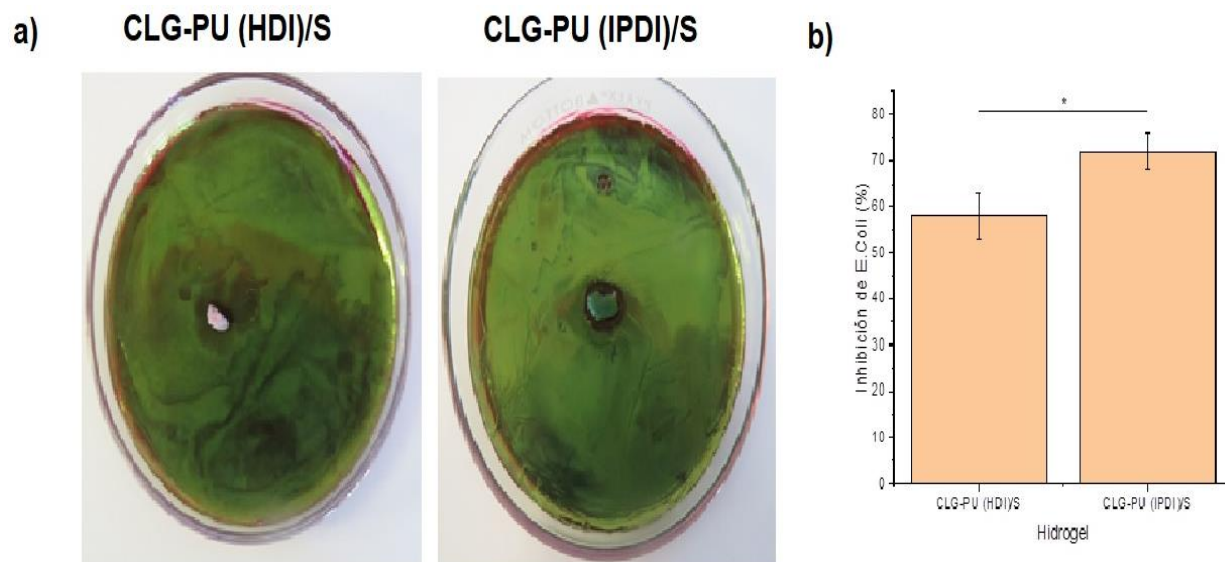


Figura 3.27 Efecto de la inhibición bacteriana de los hidrogeles. (a) CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, b) determinación de la capacidad de inhibición (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

Los resultados de la evaluación de la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli* mediante la técnica de formación de halo de inhibición, indican capacidades de inhibición de  $58 \pm 5 \%$  y  $72 \pm 4 \%$  para CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, respectivamente.

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de inhibición de CLG-PU (HDI)/S con respecto a CLG-PU (IPDI)/S, lo que indica que regiones amorfas con bajo grado de interpenetración favorecen la inhibición del crecimiento de este patógeno.

### 3.2.6 Determinación de la biocompatibilidad del hidrogel

#### 3.2.6.1 Viabilidad de los monocitos humanos sobre los hidrogel

Se evaluó la biocompatibilidad *in vitro* de los hidrogel determinando los efectos de la composición de los hidrogel sobre el metabolismo de monocitos (Figura 3.28).

Los resultados de los ensayos MTT sobre el metabolismo de monocitos para los hidrogel de PU después de 24 y 48 horas de contacto de cultivos de monocitos humanos se muestran en la figura 3.28.

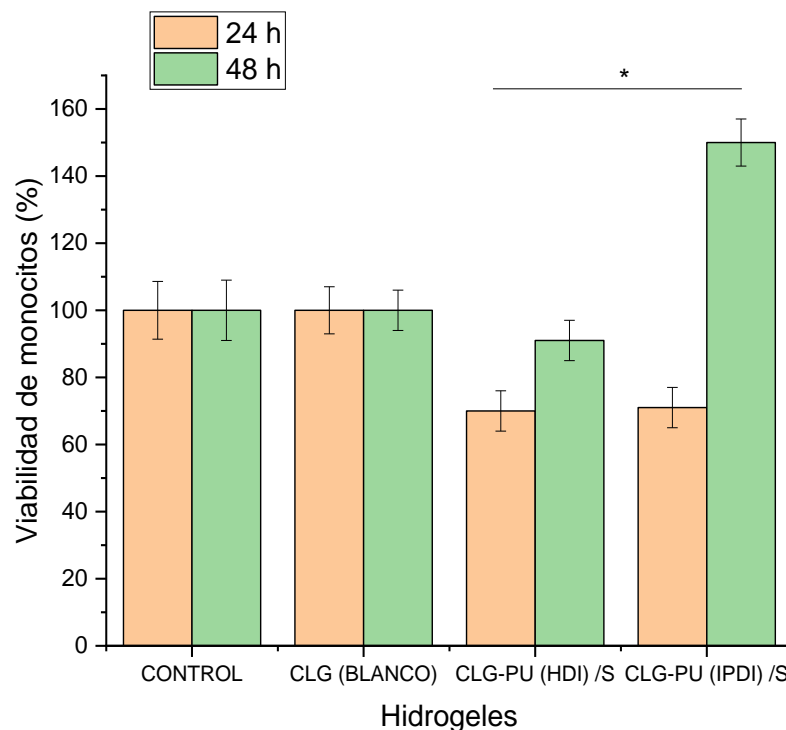


Figura 3.28 Influencia de la composición de los hidrogel en la biocompatibilidad *in vitro*, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para monocitos (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

En el ensayo realizado a las 24 h a los hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S y CLG-PU (IPDI) / S presentaron una disminución en la viabilidad del 25 % y 23 % respectivamente, comparado con el control del 100 %.

Los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/ S a las 48 h presentaron el mayor aumento en viabilidad en un 50 % comparado con el control (100 %). Una hipótesis para la reducción de la viabilidad celular es que el segmento duro del PU puede degradarse y los productos de degradación pueden tener efectos tóxicos sobre las células reduciendo la viabilidad celular [80]. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de actividad metabólica de los monocitos a las 48 h de los hidrogeles de IPN; lo que indica que la estructura presente en el hidrogel CLG-PU (IPDI) tiende a acelerar la capacidad de reducir el formazán, aumentando la actividad metabólica de los monocitos en esta matriz

La porosidad y estructura microesférica están relacionados con mejorar la respiración celular, ya que el oxígeno y nutrientes pueden ser difundidos rápidamente, favoreciendo la respiración celular. Esta mejoría puede ser aprovechada para la aplicación del hidrogel IPN de CLG-PU para la curación de úlceras venosas, ya que permitiría la viabilidad de estas células importantes en el proceso de curación de heridas; favoreciendo su metabolismo medido indirectamente como su capacidad respirante y su eficacia para reducir las sales de MTT en formazán [80].

### 3.2.6.2 Viabilidad fibroblastos dérmicos porcinos

En la figura 3.29 se presenta la viabilidad de los fibroblastos dérmicos porcinos; a las 24 h del cultivo los hidrogeles de CLG-PU (HDI) /S y los hidrogeles de CLG-PU (IPDI) /S presentaron un aumento en su viabilidad del 20 % y del 25 % respectivamente en comparación con el control 100 %.

A las 48 h del cultivo, los materiales basados en CLG-PU (IPDI) /S presentaron la mayor viabilidad de fibroblastos del 32 %, mientras que el hidrogel CLG-PU (HDI)/S del 21 % lo que representa una disminución en su viabilidad. Se aprecia que los hidrogeles que fueron encapsulados con secretoma presentaron los mejores resultados de viabilidad con fibroblastos en comparación con el mismo tipo de hidrogeles entrecruzados con PU, pero, sin secretoma en su interior. Lo cual

podría indicar que el secretoma de las CTs podría participar en los procesos de reparación-regeneración de lesiones dérmicas [81].

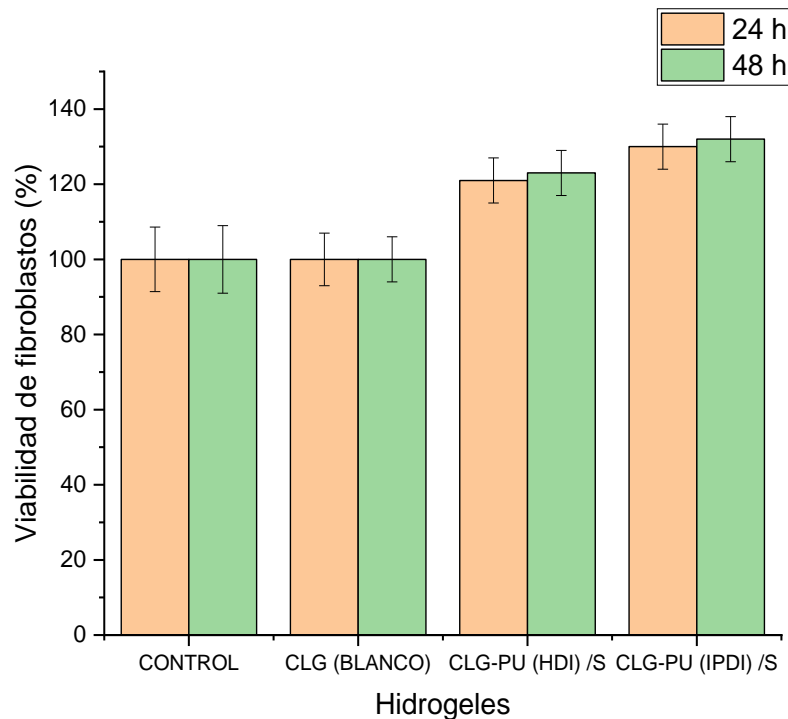


Figura 3.29 Influencia de la composición de los hidrogeles en la biocompatibilidad *in vitro*, indicando la viabilidad celular evaluada por la prueba MTT para fibroblastos ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

La mejora en la viabilidad de los fibroblastos en tiempos de cultivo prolongados puede asociarse con la mejora mecánica promovida por los efectos de reticulación producidos por PU.

Sin embargo, la presencia de PU trifuncional es importante a bajas concentraciones, ya que previene la contracción del hidrogel inducida por el crecimiento celular y regula la velocidad de degradación [81]. El secretoma muestra mayor efecto en los monocitos que en los fibroblastos al variar la matriz.

Además, los fibroblastos producen moléculas bioactivas que participan en varios procesos fisiológicos, incluida la angiogénesis y la reparación tisular. Los ensayos clínicos han demostrado la eficacia de los fibroblastos para curar las úlceras venosas crónicas de las piernas y la epidermólisis ampollosa distrófica, mientras que hidrogeles de colágena con secretoma; se han

utilizado en la viabilidad de los para curar heridas de piel de espesor total en un modelo de ratón [82].

### 3.2.6.3 Estudios de hemocompatibilidad *in vitro*

En este estudio, el daño causado a los glóbulos rojos por los hidrogeles de CLG entrecruzados con PU se determinó registrando la absorbancia del sobrenadante obtenido a 415 nm, que expresa el porcentaje de liberación de hemoglobina. De acuerdo con la norma ASTM F756-00 (2000), los materiales con un porcentaje de hemólisis del 0.5% se consideran hemolíticos, mientras que el que está entre el 5% y el 2% se clasifica como levemente hemolítico. Por otro lado, si el material tiene un porcentaje de hemólisis, 2%, se considera un material no hemolítico [81-83]. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se puede resaltar la naturaleza no hemolítica de los hidrogeles fabricados, lo que se puede atribuir a una mejora de propiedades fisicoquímicas y presencia de biomoléculas activas. En la figura 3.30 se presentan los resultados de la capacidad hemolítica (%) al realizarse en ensayo de hemólisis *in vitro* en los hidrogeles.

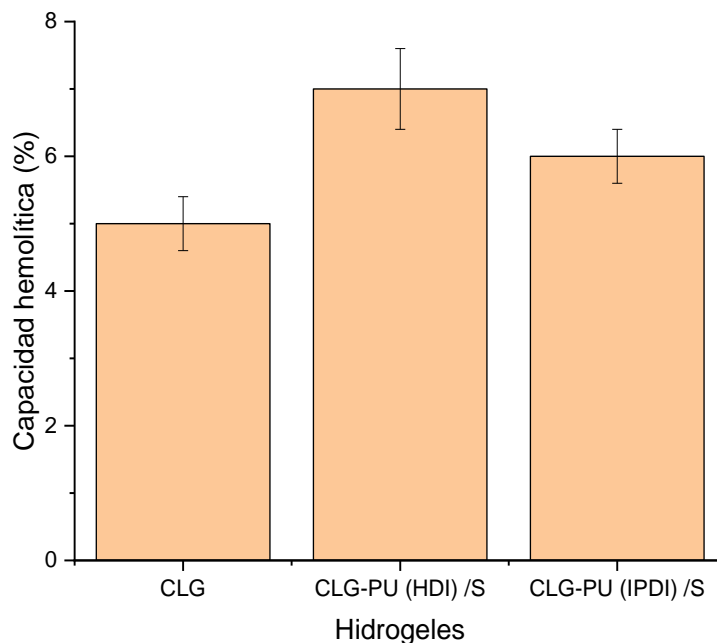


Figura 3.30 Capacidad hemolítica (%) de los hidrogeles encapsulados ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).



Se registraron capacidades hemolíticas de  $5 \pm 1\%$ ,  $7 \pm 6\%$  y  $6 \pm 4\%$  para CLG, CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, respectivamente. Estos valores clasifican a los hidrogeles de IPN como no hemolíticos para CLG, que no producen una lisis significativa en los glóbulos rojos; y como levemente hemolítico para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), (valor superior al 5%) indicando que su composición y estructura producen una leve rotura de las membranas eritrocitarias, liberando la hemoglobina transportada [83-84]. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de los sistemas CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI).

La estructura flexible del agente entrecruzante y la mejora en las propiedades mecánicas de los hidrogeles son factores relacionados con mejorar la hemocompatibilidad de estos materiales innovadores. La presencia de enlaces uretano de entrecruzamiento evita que la membrana de los glóbulos rojos se rompa [85].

La modificación química de las fibras de CLG mediante reticulación, inducida por los agentes sintéticos del PU disminuye la capacidad hemolítica de la CLG. Esta disminución en la lisis de las membranas de glóbulos rojos podría estar relacionada con que la generación de respuestas del sistema de redes poliméricas interpenetradas (IPN) lo cual inhibe los sitios de interacción que causan la ruptura de la membrana celular, lo que mejora la hemocompatibilidad. Los materiales para la cicatrización de las heridas deben tener alta hemocompatibilidad evitando la descomposición de los glóbulos rojos, con la propuesta de que la vascularización, los procesos de angiogénesis y la epitelización se llevarán a cabo favorablemente [85]; los resultados indican que los hidrogeles de PU propuestos presentan una excelente hemocompatibilidad facilitando su uso potencial como apósitos para la cicatrización de heridas.

No hay mucha diferencia entre los resultados de capacidad hemolítica de los hidrogeles con o sin secretoma; tal vez ambas cosas no generen variación de la fuerza iónica y/o deformación de la membrana de los eritrocitos, siendo altamente hemocompatibles.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró sintetizar exitosamente los hidrogeles de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), así como la encapsulación del secretoma de células troncales en los hidrogeles de CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, por medio de la reacción de copolimerización aleatoria. Es importante destacar que el entrecruzamiento químico de los hidrogeles de CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI), presentó un índice de reticulación de  $56 \pm 6$  % en contraste, el CLG-PU (IPDI) presentó un índice de reticulación de  $47 \pm 5$  %, determinados considerando una muestra de CLG marina sin entrecruzar.

Los hidrogeles de CLG-PU (HDI) exhiben un alto grado de interpenetración evidenciado por una estructura con mayor cristalinidad basada en aglomerados microesféricos, con mejoras en el módulo de almacenamiento y estabilidad térmica, mostrando también resistencia a la degradación hidrolítica y proteolítica; por otro lado, los hidrogeles de CLG-PU (IPDI) muestran un menor grado de interpenetración relacionado con superficies amorfas de su microestructura lisa con porosidad irregular.

Los resultados de la evaluación de la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli* mediante la técnica de formación de halo de inhibición, indican capacidades de inhibición de  $42 \pm 4$  % y  $53 \pm 5$  % para CLG-PU (HDI) y CLG-PU (IPDI) y de  $58 \pm 5$  % y  $72 \pm 4$  % para CLG-PU (HDI)/S y CLG-PU (IPDI)/S, respectivamente.

Así mismo, los hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/ S en el ensayo de viabilidad de monocitos después de las 48 h de presentaron un aumento del 50 % en su viabilidad comparado con el control (100 %) y todos los hidrogeles resultaron no hemolíticos de acuerdo con la norma ASTM F756-00 (2000). A través de la metodología desarrollada en este trabajo, se lograron obtener hidrogeles de CLG-PU (IPDI)/S, los cuales mostraron propiedades mecánicas y de biocompatibilidad adecuadas para su posible aplicación en el tratamiento de la UV.

## **PERSPECTIVAS**

Con base a los resultados obtenidos, y con el fin de enriquecer este trabajo sería interesante realizar la prueba de cierre de herida en modelos experimentales como: conejos o ratones. Con el fin de probar los hidrogeles obtenidos durante el desarrollo de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. O'Donnell, M. Passman, W. Marston. Management of Venous Leg Ulcers: Clinical Practice Guidelines of the Society for Vascular Surgery® and the American Venous Forum, *J. Vasc Surg.* 60 (2): 35-59, 2014.
- [2] N. Sánchez, F. Guardado, F. Arriaga. Revisión en úlceras venosas: Epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento actual, *Rev Mex Angiol.* 47(1): 26-38, 2019.
- [3] N. Lecuona, T. Casares, M. Lacayo. LEV 3. Intravenous Sulodexide Promotes Wound Healing in Chronic Venous Ulcers: A New Perspective in Treatment, *J. Vasc Surg.* 70 (5): 170-172, 2019.
- [4] B. Vasudevan. Venous Leg Ulcers: Pathophysiology and Classification, *Indian Dermatology Online Journal.* 5 (3): 366-370, 2014.
- [5] M. Kucharzewski, M. Kózka, T. Urbanek. Topical Treatment of Nonhealing Venous Leg Ulcer with Propolis Ointment, *Evid Based Complement Alternat Med.* 17 (8): 655-673, 2013.
- [6] A. Soares, B. Guitton, D. Omeda. Efetividade Do Gel de Papaína No Tratamento de Úlceras Venosas: Ensaio Clínico Randomizado, *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 23 (3): 458-65, 2015.
- [7] S. Andrade, I. Santos C. Ramos. Hyperbaric Oxygen Therapy for Wound Care, *Rev. Gaúcha Enferm.* 37 (2): 59-257, 2016.
- [8] S. Han, Y. Yin B. Pui. Extracellular Protease Inhibition Alters the Phenotype of Chondrogenically Differentiating Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in 3D Collagen Microspheres, *PLoS One.* 11 (1): 1-14, 2016.
- [9] S. Huang, Y. Wu, D. Gao, D. Paracrine Action of Mesenchymal Stromal Cells Delivered by Microspheres Contributes to Cutaneous Wound Healing and Prevents Scar Formation in Mice, *Cytotherapy.* 17 (7): 922-31, 2015.
- [10] I. Julianto, Y. Rindastuti. Topical Delivery of Mesenchymal Stem Cells Secretomes in Wound Repair, *Acta Med Indones.* 48 (3): 217-220, 2016.

- [11] F. Vizoso, N. Eiro, S. Cid. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine, *Int J Mol Sci.* 18 (9): 1852, 2017.
- [12] P. Muñoz, O. Rivera, B. Mendoza, J. Claudio. Design of Silica-Oligourethane-Collagen Membranes for Inflammatory Response Modulation: Characterization and Polarization of a Macrophage Cell Line, *Macromol Biosci.* 18 (9): 1-11, 2018.
- [13] Gómez, A. Úlceras vasculares: factores de riesgo, clínica y prevención. Vol. 22, no. 6, pp. 33–38, 2008.
- [14] M. Moreno, J. Moreno, J Cueto. Resultados del tratamiento de las úlceras venosas con un polímero polisacárido con óxido de cinc, *Med Int Méx.* 32 (1): 48-57, 2016.
- [15] R. Valenzuela, C Ibáñez, C. Moratilla, Guía de Práctica Clínica Autores de Las Heridas, *Asociación Española de Enfermía Vasculat y Heridas.* 3 (2): 3–134, 2017.
- [16] D. Wahl, J.Czernuszka. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair, *Eur Cell Mater.* 28 (11): 43–56, 2016.
- [17] B. Rodas y C. Villicaña. Dental pulp stem cell: current advances in isolation, expansion and preservation, *Tissue engineering and regeneration medicine.* 14 (4): 333-347, 2017
- [18] A. Marcus, T Coyne, J Rauch. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation.* 76 (2): 130-144, 2008.
- [19] J. Arrizabalaga, M. Nollert. Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (7): 2226–2236, 2018.
- [20] S. Mantha, S. Pillai, P. Khayambashi. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials (Basel, Switzerland).* 12 (20): 3323-3329, 2019.
- [21] L. Lootens, N. Brusselaeres, H. Beele. Keratinocytes in the Treatment of Severe Burn Injury, *Int Wound.* 10(1): 6-12, 2013.

[22] A. Liu, R. Moy RI, D. Ozog. Current memthods employed in the prevention and minimization of Surgical Scars, *Dermatol Surg.* 37 (12): 1740-6, 2011.

[23] S. Han, Y. Li, B. Pui. Extracellular Protease Inhibition Alters the Phenotype of Chondrogenically Differentiating Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in 3D Collagen Microspheres, *PLoS One.* 11(1): 6928-6937, 2016.

[24] T.Wang, S. Guo, X. Liu. Protective Effects of Adipose-Derived Stem Cells Secretome on Human Dermal Fibroblasts from Ageing Damages, *Int J Clin Exp Pathol.* 8 (12): 15739–15748, 2015.

[25] R. Maya y k. Gopakumar. Fish Collagen and its Applications in Food and Pharmaceutical Industry: A Review, *EC Nutrition.* 13 (12): 752-767, 2018.

[26] M. Ross, P. Wojciech. "Histología. Texto y atlas a color con Biología celular y molecular, 6ta ed. *Editorial Médica Panamericana*, Madrid, España, Vol. 6 no. 6, pp. 624-626, 2012.

[27] P. Muñoz, O. Rivera, B. Mendoza. Design of Silica-Oligourethane-Collagen Membranes for Inflammatory Response Modulation: Characterization and Polarization of a Macrophage Cell Line, *Macromol Biosci.* 18 (9): 1-11, 2018.

[28] H. Pulkkinen, V. Tiitu, P Valonen. Engineering of cartilage in recombinant human type II collagen gel in nude mouse model in vivo, *Osteoarthritis Cartilage.* 18 (8): 1077-1087, 2010.

[29] S. Huang, Y. Wu , D. Gao, X. Fu. Paracrine Action of Mesenchymal Stromal Cells Delivered by Microspheres Contributes to Cutaneous Wound Healing and Prevents Scar Formation in Mice, *Cytotherapy.* 17 (7): 922–31, 2015.

[30] T. Silva, J. Moreira, A. Marques. Marine origin collagens and its potential applications, *Mar Drugs.* 12 (12): 5881-5901, 2014.

- [31] R. Lara. Distribución y abundancia de la medusa invertida del manglar (*Cassiopea xamachana*) en la laguna costera de Chelem, Yucatán, Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Yucatán, México, 2017.
- [32] J. Driscoll, P. Tushar. The Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Acellular Regenerative Therapy for Liver Disease The Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Acellular Regenerative Therapy for Liver Disease, *Journal of Gastroenterology*. 54 (9): 763-73, 2019.
- [33] P. Petrini, S. Faré, S. M. Tanzi. Synthesis and Properties of Polyurethane Hydrogels for Tissue Engineering, *Journal of materials Science: materials in medicine*. 14 (8): 683-686, 2003.
- [34] S. Guelcher, K. Gallagher, J. Didier, D. Klinedinst. Synthesis of Biocompatible Segmented Polyurethanes from Aliphatic Diisocyanates and Diurea Diol Chain Extenders, *Acta Biomaterialia*. 1 (4): 471-84, 2005.
- [35] K. Gómez, C. Piña, N. Rodríguez. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino, *Superficies y Vacío*. 24(4): 137-140, 2011.
- [36] J. Claudio, L. Espíndola, J. Becerra. Recent advances in the synthesis and applications of collagen based hydrogels: A review. *Mediterranean journal of basic and applied sciences*. 3(2): 54-98, 2019.
- [37] I. Fernández, N. Rodríguez, L. León. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering, *Materials Science and Engineering*. 111 (130): 110-148, 2020.
- [38] Y. Liu, M. Watsky, J. Forrester. Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications, *Biomacromolecules*. 7 (6) :1819-1828, 2006.
- [39] J. Claudio, B. Mendoza, J. Delgado, L. Castellano. A New Method for the Preparation of Biomedical Hydrogels Comprised of Extracellular Matrix and Oligourethanes, *Biomed. Mater*. 11 (3): 035-016, 2016.

[40] U. Wustmann, P. Olier, V. Granier. Higher functionality gives faster drying, *European Coatings Journal*. 49 (11): 36–41, 2014.

[41] D. Neelam. Chemical-physical characterization and *in vitro* preliminary biological assessment of hyaluronic acid Human, *Cell culture*. 20 (3): 221-241, 2002.

[42] I. Pech Pool. Obtención de andamio bi-capas, PLL-gelatina, con geometría hexagonal de poro para posible uso en quemaduras profundas. Tesis Maestro en Ciencias Materiales Poliméricas, México. pp 68, 2008.

[43] L. Rodríguez, X. Wu, Y. Guan. Wound-Healing Assay, *Methods in Molecular Biology*, *Biol* 294 (3): 23–29, 2014.

[44] L. Venegas. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. pp. 48-64, 2019.

[45] M. Adamczak, A. Scisłowska, M. Genet. Surface Characterization, Collagen Adsorption and Cell Behaviour on Poly (L-Lactide- Co -Glycolide), *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 13 (3): 63-75, 2011.

[46] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K Ibansouda. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71-79, 2016.

[47] T. Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*. 65 (12): 55–63, 1983.

[48] P. Twentyman, M Luscombe. A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity, *Br J Cancer*. 56 (3): 279–285, 1987.

[49] P. Petrini, S. Faré 2003. Design synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering, *J Mater Sci Mater Med*. 14 (8): 683-6, 2003.



- [50] D. Perrett, N. Nayuni. Efficacy of current and novel cleaning technologies (ProReveal) for assessing protein contamination on surgical instruments, *Decontamination in Hospitals and Healthcare*. 18 (15): 598-619, 2013.
- [51] A. Fiqi, J. Lee, J. Kim. Collagen Hydrogels Incorporated with Surface-Aminated Mesoporous Nanobioactive Glass: Improvement of Physicochemical Stability and Mechanical Properties Is Effective for Hard Tissue Engineering, *Acta Biomaterialia*. 9 (12): 9508–9521, 2013.
- [52] C. Easterbrook, G. Maddern. Porcine and bovine surgical products jewish, muslim, and hindu perspectives, *Arch surg*. 143 (4): 366-370, 2018.
- [53] J. Claudio., M. Rangel, P Muñoz., L Castellano. Improved properties of composite collagen hydrogels: Protected oligourethanes and silica particles as modulators, *Journal of Materials Chemistry B*. 4 (40): 6497-6509, 2016.
- [54] U. Wustmann, P. Olier, V. Granier. Higher functionality gives faster drying, *European Coatings Journal*. 49 (11): 36-41, 2014.
- [55] S. Bendtsen, M. Wei, M. Synthesis and Characterization of a Novel Injectable Alginate–Collagen–Hydroxyapatite Hydrogel for Bone Tissue Regeneration. *J. Mater. Chem. B*, 3 (15): 3081-3090, 2015.
- [56] T. Martin, S. Caliarì, P. Williford.; B. Harley, R. Bailey. The Generation of Biomolecular Patterns in Highly Porous Collagen-GAG Scaffolds Using Direct Photolithography, *Biomaterials*. 32 (16): 3949-3957, 2011.
- [57] T. Hao, J. Khoeneisser, X, Xu. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell, *Bioact Mater*. 12 (1): 39-55, 2016.
- [58] M. Attaei. Microencapsulation of isocyanate compounds for autoreactive, nanocomponent adhesive”. Tesis para obtener el grado en maestro en ciencias, Lisboa. pp. 117, 2017.

- [59] J. Claudio, B. Mendoza, J. Delgado, L. Castellano. A New Method for the Preparation of Biomedical Hydrogels Comprised of Extracellular Matrix and Oligourethanes, *Biomed. Mater.* 11 (3): 035-116, 2016.
- [60] A. Berger, K. Linsmeier, P. Kreeger, K. Masters. Decoupling the Effects of Stiffness and Fiber Density on Cellular Behaviors via an Interpenetrating Network of Gelatin-Methacrylate and Collagen, *Biomaterials.* 141 (17): 125-135, 2017.
- [61] S. Kim, K. Lee. Swelling Behavior of Polyelectrolyte Complex Hydrogels Composed of Chitosan and Hyaluronic Acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (3):1097-1101, 2004.
- [62] M. Dash, F. Chiellini, R. Ottenbrite. Chitosan A Versatile Semi Synthetic Polymer in Biomedical Applications, *Progress in Polymer Science.* 36 (8): 981-1014, 2011.
- [63] S. Levengood, M. Zhang. Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *J. Mater. Chem. B.* 2 (21): 3161, 2004.
- [64] D. Perrett, N. Nayuni, N. Efficacy of current and novel cleaning technologies (ProReveal) for assessing protein contamination on surgical instruments, *Decontamination in Hospitals and Healthcare.* 8 (13): 598-619, 2013.
- [65] Z. Petrović, I. Javni, V. Divjaković. Structure and physical properties of segmented polyurethane elastomers containing chemical crosslinks in the hard segment, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics.* 36 (2): 221-235, 1998.
- [66] L. Kucińska, J. Gubańska, I. Janik. Polyurethanes modified with natural polymers for medical application. Part II. Polyurethane/gelatin, polyurethane/starch, polyurethane/cellulose, *Polimery Polymers.* 59 (3): 197-200, 2014.
- [67] J. Claudio, N. Hernández, L. Cano. Novel semi-interpenetrated networks based on collagen-polyurethane-polysaccharides in hydrogel stage for biomedical applications, *J. Appl Polym Sci.* 14 (8): 490-739, 2020.

[68] P. Muñoz, O. Rivera, B. Mendoza. Design of Silica-Oligourethane-Collagen Membranes for Inflammatory Response Modulation: Characterization and Polarization of a Macrophage Cell Line, *Macromol Biosci.* 18 (9): 299-362, 2018.

[69]. M. Ogle, C. Segar, S. Sridhar. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design, *Experimental Biology and Medicine.* 241 (10): 1084-1097, 2016.

[70] J. Barthes, C. Dollinger, B. Muller, U. Liivas U. Hydrogels Under Cytokine Stimulation. *Front Bioeng Biotechnol.* 20 (6): 108-124, 2018.

[71] S. Gauss. Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid & Polymer Science* 267 (28): 710-714, 1989.

[72] A. Balaji A, S. Kumar, A. Fauzi. Fabrication and hemocompatibility assessment of novel polyurethane-based bio-nanofibrous dressing loaded with honey and Carica papaya extract for the management of burn injuries. *Int J Nanomedicine.* 11 (41): 4339-4355, 2016.

[73] X. Cheng, Z. Shao, C. Li. Insolation characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema Esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. *Plos One.* 12 (1): 016-9731, 2017.

[74] J. Claudio, I. González, T. Flores. Study of the polyacrylate interpenetration in a collagen-polyurethane matrix to prepare novel hydrogels for biomedical applications, *International Journal of Biological Macromolecules.* 15 (6): 27-39, 2020.

[75] E. Bari, S. Perteghella, D Silvestre. Pilot Production of Mesenchymal Stem/Stromal Freeze-Dried Secretome for Cell-Free Regenerative Nanomedicine: A Validated GMP-Compliant Process, *Cells.* 7 (11): 190-210, 2018.

[76] M. Zuber, F. Zia, K,Zia. Collagen based polyurethanes-A review of recent advances and perspective, *International Journal of Biological Macromolecules.* 80 (10): 366-374, 2015.

- [77] F. Arévalo, N. Osorio, N. Valcácel. Characterization and *in vitro* biocompatibility of binary mixtures of chitosan and polyurethanes synthesized from chemically modified castor oil, as materials for medical use, *Polymers from Renewable Resources*. 9(1): 23-38, 2018.
- [78] J.Claudio, N. Burciaga, L. Cano. Novel collagen-chitosan based hydrogels reinforced with manganite as potential adsorbents of Pb<sup>2+</sup> ions, *Journal of Polymers and the Environment*. 28 (11): 2864-2879, 2020.
- [79] L. Olde, P. M Van. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 6 (15): 460-72, 1995.
- [80] B. Barrioni, S. Carvalho, R. Lambert. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 52 (24): 22-30, 2015.
- [81] E.Heather,T Longaker. Fibroblasts and Wound Healing: An update, *Regenerative Medicine*. 13 (5): 491-495, 2018.
- [82] G. Maguire. The Safe and Efficacious Use of Secretome From Fibroblasts and Adipose-derived (but not Bone Marrow-derived) Mesenchymal Stem Cells for Skin Therapeutic, *Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 12 (8): 57-59, 2019.
- [83] X. Li, X. Kong, Z Zhang, K Nan. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N, O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application, *Int J Biol Macromol.* 50 (5):1299-1305, 2012.
- [84] C. Ghobril C, M. Grinstaff. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial, *Chemical Society Reviews*. 44 (7): 1820-1835, 2015.
- [85] A. Marcus, T Coyne, J Rauch. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived form the rat amniotic membrane, *Differentiation*. 76 (2): 130-144, 2008.