



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL A BASE DE ELASTINA Y
POLIVINILPIRROLIDONA K30 MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA PARA ACELERAR EL
PROCESO DE REPARACIÓN DE HERIDAS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER GÓMEZ ZALDÍVAR



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO: 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

VOCAL: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SECRETARIO: GERARDO LEYVA GÓMEZ

1er. SUPLENTE: JOSÉ VERGARA DE LA FUENTE

2° SUPLENTE: MARIA DEL ROSARIO LÓPEZ GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 307, EDIFICO F, FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ

SUSTENTANTE :

FRANCISCO JAVIER GÓMEZ ZALDÍVAR

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura en esta prestigiosa casa de estudios.

A la Facultad de Química y a todos los profesores que me impartieron clase por brindarme la mejor formación académica.

A mi tutor, el Dr. Gerardo Leyva Gómez por darme la confianza para realizar mi trabajo de tesis en su grupo de investigación, además de todo su apoyo y tiempo brindado.

A la Dra. María Luisa Del Prado Audelo por todas sus observaciones y comentarios durante los seminarios, además de su tiempo brindado para la realización de algunas pruebas.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales por el apoyo brindado para la realización de los análisis SEM, DSC, TGA y FTIR.

A la Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz y a la Dra. Adriana Ganen Rondero del Laboratorio L322 de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica de la FES Cuautitlán campo 1 por el apoyo brindado para la obtención del análisis reológico.

A la Dra. Sara Teresa Méndez Cruz y al Dr. Horacio Reyes Vivas del INP por todas sus enseñanzas y apoyo brindado durante mi servicio social y estancia estudiantil.

A todos los miembros de mi honorable jurado por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo de tesis así como en la ayuda con los trámites para agilizar mi proceso de titulación.

En nombre del Dr. Gerardo Leyva Gómez me gustaría agradecer a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (Becas posdoctorales, PAPIIT TA 200318) y a CONCYT (A1-S-15759) por el apoyo brindado, ya que gracias a ello pudimos realizar este trabajo de tesis.

LISTADO DE ABREVIATURAS. VIII

RESUMEN. 10

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN. 12

CAPITULO II. ANTECEDENTES. 14

2.1 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PIEL. 14

2.2 PROCESO DE REPARACIÓN DE HERIDAS. 19

2.2.1 CONCEPTO DE HERIDA. 19

2.2.2 CONCEPTO DE CICATRIZACIÓN. 19

2.2.3 ETAPAS DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS. 20

2.2.3.1 Hemostasia e inflamación. 20

2.2.3.2 Proliferación. 23

2.2.3.3 Maduración y remodelación. 25

2.2.4 TRATAMIENTO PARA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS. 28

2.2.4.1 Tipos de tratamiento de heridas. 29

2.3 HIDROGELES. 34

2.3.1 CLASIFICACIÓN DE HIDROGELES. 36

2.3.2 EL PAPEL DE LOS HIDROGELES COMO ANDAMIOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. 41

2.3.3 CRITERIOS EN EL DISEÑO DE UN HIDROGEL PARA ANDAMIOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. 42

2.3.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE HIDROGELES. 44

2.3.4.1 Hidrogeles físicos. 44

2.3.4.2 Hidrogeles químicos. 45

2.3.5 SÍNTESIS DE HIDROGELES POR IRRADIACIÓN GAMMA. 46

2.3.5.1 Los rayos gamma. 47

2.3.5.2 Irradiadores gamma.	49
2.3.5.3 Mecanismo de entrecruzamiento en solución acuosa.	51
2.4 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA EN POLÍMEROS.	54
2.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).	54
2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).	55
2.4.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	59
2.4.4 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).	60
2.5 ELASTINA.	61
2.5.1 ELASTOGÉNESIS.	62
2.5.1.1 Gen de ELT.	63
2.5.1.2 Regulación de la expresión de ELT.	63
2.5.1.3 Secreción.	63
2.5.1.4 Incorporación de tropoelastina en la fibra elástica.	64
2.5.1.5 Coacervación.	64
2.5.1.6 Entrecruzamiento.	65
2.5.2 PROPIEDADES DE ELT.	65
2.5.2.1 Propiedades biofísicas.	65
2.5.2.2 Aplicaciones de la ELT como biomaterial.	66
2.5.3 EL PAPEL DE LA ELASTINA EN EL PROCESO DE REPARACIÓN DE HERIDAS.	67
2.5.3.1 Señalización celular inducida por ELT.	68
2.6 POLIVINILPIRROLIDONA.	70
2.6.1 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.	70
2.6.2 APLICACIONES.	72
<u>CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</u>	73
<u>CAPITULO IV. OBJETIVOS.</u>	75

OBJETIVO GENERAL.	75
OBJETIVOS PARTICULARES.	75
<u>CAPITULO V. HIPÓTESIS.</u>	<u>75</u>
<u>CAPITULO VI. METODOLOGÍA.</u>	<u>76</u>
6.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS.	76
6.1.1 EQUIPOS EMPLEADOS.	76
6.1.2 MATERIALES EMPLEADOS.	76
6.1.3 REACTIVOS EMPLEADOS.	76
6.2. PREPARACIÓN DE HIDROGEL ELT-PVP MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA.	78
6.3 LIOFILIZACIÓN DE MUESTRAS.	78
6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).	78
6.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).	79
6.6 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	79
6.7 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).	79
6.8 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO.	79
6.9 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.	80
6.10 PRUEBA DE HEMÓLISIS.	82
6.11 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.	82
<u>CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	<u>84</u>
7.1 DESCRIPCIÓN DEL HIDROGEL.	84
7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).	85
7.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR).	86
7.4 MECANISMO DE REACCIÓN DE SÍNTESIS DEL HIDROGEL ELT-PVP MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA.	87

7.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	88
7.6 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).	91
7.7 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO.	93
7.8 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.	100
7.9 PRUEBA DE HEMÓLISIS.	102
7.10 PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR.	103
<u>CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.</u>	<u>106</u>
<u>CAPITULO IX. PERSPECTIVAS.</u>	<u>107</u>
<u>REFERENCIAS.</u>	<u>108</u>

LISTADO DE ABREVIATURAS.

% m/v. Porcentaje masa-volumen	Kb. Kilobase
°C. Grados centígrados	KGF. Factor de crecimiento de queratinocitos
Ala. Alanina	kGy. Kilograys
cm. Centímetro	kPa. Kilopascal
Co. Cobalto	Lys. Lisina
Cp. Centipoise	MeV. Mega electronvoltio
CV. Cristal violeta	mg. Miligramo
Da. Dalton	MHC. Complejo principal de histocompatibilidad
DSC. Calorimetría diferencial de barrido	min. Minuto
<i>E.coli.</i> <i>Escherichia coli</i>	mL. Mililitro
EBP. Proteína de unión a elastina	MMP. Metaloproteinasas de matriz.
ECM. Matriz extracelular	mRNA. Ácido ribonucleico mensajero
EEB. Electrones retro dispersados	NIR. Infrarrojo cercano
EGF. Factor de crecimiento epitelial	OH. Oxigenoterapia hiperbárica
ELT. Elastina	-OH. Grupo hidroxilo
ELT-PVP. Copolímero elastina- polivinilpirrolidona	OIEA. Organismo internacional de energía atómica
ERR. Retículo endoplásmico rugoso	OMS. Organización mundial de salud
EthD-1. Homodímero de etidio	PBS. Buffer fosfato salino
FDA. Administración de alimentos y medicamentos	PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos	PEG. Polietilenglicol
FTIR. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	PFA. Paraformaldehído
g. gramo	PMN. Polimorfonucleares
Gly. Glicina	PNIPAm. Poli (N-isopropilacrilamida)
H•. Radical de hidrógeno	Pro. Prolina
HO•. Radical hidroxilo	PVP. Polivinilpirrolidona
IL. Interleucina	SE. Electrones secundarios
	SEM. Microscopía electrónica de barrido

ABREVIATURAS

SFB. Suero fetal bovino

-SO₃H. Ácido sulfónico

Tg. Temperatura de transición vítrea

TGA. Análisis termogravimétrico

TGF-β. Factor de crecimiento transformante
beta

TNF-α. Factor de necrosis tumora alfa

u.a. Unidades arbitrarias

UV. Ultravioleta

Val. Valina

VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular

μL. Microlitro

μm. Micrómetro

RESUMEN.

Los hidrogeles elaborados a base de materiales poliméricos han empezado a encontrar diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina, como en el manejo y cuidado de heridas. La elastina-polivinilpirrolidona (ELT-PVP) es un copolímero que se generó a partir de una mezcla de elastina hidrolizada (ELT) y polivinilpirrolidona (PVP), que se sometió a irradiación con rayos gamma a una dosis de 25 kGy empleando una fuente de ^{60}Co .

En este trabajo se emplearon diversas estrategias fisicoquímicas y biológicas, con el objetivo de caracterizar los posibles cambios que se generaron tras la irradiación, de la misma forma, se evaluó el efecto que tiene el nuevo polímero sobre la proliferación y viabilidad de fibroblastos dérmicos.

La caracterización fisicoquímica se llevó a cabo mediante las pruebas de microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y se determinó el comportamiento reológico. Esto se hizo con la finalidad evidenciar cambios fisicoquímicos en dichas propiedades debido a la radiación gamma.

En estas pruebas se determinó que la irradiación gamma provocó cambios en la estructura química debido a la reticulación de las cadenas poliméricas de los polímeros empleados. Esto se vio reflejado en los cambios de la temperatura de descomposición de ELT-PVP con respecto a los componentes individuales y a una mezcla física de elastina y polivinilpirrolidona (ELT+PVP), de igual forma, el perfil reológico obtenido mostro cambios estructurales reflejados en el incremento de la viscosidad en un orden de diez veces con respecto a la mezcla sin irradiar. Además el comportamiento reológico del hidrogel corresponde al de un fluido pseudoplástico con tixotropía.

Estas propiedades son útiles para productos con aplicaciones tópicas ya que aseguran una distribución uniforme y aumenta el tiempo de retención del material polimérico en el sitio de aplicación tópica

Asimismo presentó una morfología que corresponde a una red porosa e interconectada con un tamaño de poro promedio de $16 \pm 8.42 \mu\text{m}$. Esta morfología es distinta a los componentes individuales, lo que sugiere que se generaron cambios químicos en la estructura polimérica. Además este tipo de morfología es ideal para andamios en curación de heridas debido a que los poros permiten la internalización y migración celular.

Finalmente, mediante el uso de ensayos de proliferación celular, viabilidad celular y hemólisis se determinó la actividad biológica del hidrogel ELT-PVP *in vitro*. Se demostró que el copolímero ELT-PVP permitió la proliferación celular durante el periodo de tiempo en que se realizó el ensayo (3 días). Además no presentó efecto significativo en la viabilidad celular de fibroblastos y daño en eritrocitos con respecto a un tratamiento de ELT.

Los resultados obtenidos sugieren que combinar ELT y PVP mediante reticulación por rayos gamma es una estrategia adecuada para las aplicaciones biológicas de ELT, ya que permite mejor la proliferación celular y mitiga el efecto de citotoxicidad que se presenta con ELT. Además de presentar propiedades reológicas adecuadas para su aplicación en heridas y finalmente la morfología que presenta el hidrogel puede favorecer la migración celular, el transporte de oxígeno y nutrientes, de la misma manera puede funcionar como un vehículo o plataforma de varias sustancias bioactivas, debido a su alta porosidad que permite la liberación efectiva de sustancias como fármacos, proteínas y factores de crecimiento en el lecho de la herida.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.

La piel es el órgano más grande y expuesto en los seres humanos, la cual es capaz de proveer una barrera protectora al organismo contra diversos patógenos como los virus y microorganismos, contaminación y ciertas condiciones químicas, mecánicas y térmicas (Sousa M. P, y otros, 2018). Sin embargo sufre una gran cantidad de alteraciones como trastornos inflamatorios, lesiones mecánicas y térmicas que producen heridas (Andersen, y otros, 2015). Por esta razón es necesario un tratamiento adecuado para obtener como resultado una correcta cicatrización.

Con respecto al tratamiento de heridas es necesario buscar diversas alternativas que sean eficientes, fáciles de emplear y de bajo costo, ya que es probable que la prevalencia y la incidencia de las heridas siga aumentando. Esto puede deberse al incremento en la edad de la población y como consecuencia aumenta la prevalencia de enfermedades como: obesidad, diabetes, arteriopatía de las extremidades inferiores entre otras enfermedades (Díaz González, y otros, 2008).

En este sentido, hoy en día existe una gran variedad de tratamientos para la cicatrización de heridas, y estos dependen del tipo de herida que se desee tratar, estos van desde materiales auxiliares para prevenir infecciones como el alcohol, antibióticos, etc., hasta materiales cuyo propósito principal es proporcionar un ambiente ideal para la cicatrización de la herida como lo son los apósitos. Los apósitos se pueden clasificar de acuerdo a la función que pueden desempeñar (absorbentes, no adherentes, oclusivos y semiocclusivos,) (Andersen, y otros, 2015), o de acuerdo a la naturaleza del material con el que son elaborados (apósitos tradicionales como la gasa, apósitos biológicos y apósitos sintéticos, los cuales están hechos de diversos polímeros) (Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017). También están los tratamientos quirúrgicos como las suturas, injertos de piel, y tratamientos con factores de crecimiento.

En los últimos años el uso de apósitos empleando materiales poliméricos ha despertado un gran interés debido a sus numerosas aplicaciones biomédicas, ya que ofrecen una serie de ventajas respecto a otros materiales para el desarrollo de andamios en la ingeniería de tejidos. Entre ellas destacan su biodegradabilidad y biocompatibilidad, baja citotoxicidad e inmunogenicidad y su capacidad para favorecer la regeneración de tejidos. Pueden fabricarse en diversas formas con las características morfológicas de poros deseables que conducen al crecimiento del tejido, además de su bajo costo, fácil aplicación y se ha demostrado su buena eficacia en la regeneración de tejido (Gunatillake A. & Adhikari, 2003).

En el presente trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica y biológica de un nuevo copolímero (ELT-PVP), el cual puede servir como andamio para acelerar el proceso de cicatrización de heridas. Este nuevo copolímero se obtuvo mediante el entrecruzamiento de dos excipientes, que son la elastina (ELT) y la polivinilpirrolidona K30 (PVP) empleando radiación gamma con ^{60}Co , y se espera que en un futuro pueda servir como una alternativa confiable para el tratamiento de heridas.

CAPITULO II. ANTECEDENTES.

2.1 Anatomía e histología de la piel.

La piel es el órgano más grande del organismo y estructuralmente se compone de tres capas básicas altamente organizadas, las cuales son: la epidermis, la dermis y la hipodermis (ver figura 1), y juntas le confieren las siguientes funciones:

Sensorial: Tiene múltiples terminales nerviosas que le confieren sensibilidad al tacto, a los cambios de temperatura y a los estímulos dolorosos.

Impermeable: Evita la pérdida de líquidos corporales (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

Absorbente: Controla la absorción de ciertas sustancias cuando son aplicadas en ella por ejemplo: vitaminas y hormonas, etc. (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

Protección: Evita la penetración de sustancias nocivas y extrañas, microorganismos, filtra la radiación UV, limita al cuerpo y lo protege contra golpes.

Termorregulación: Regula la pérdida de calor en el cuerpo (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

Metabólica: Síntesis de vitamina D (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

Inmunológica: La piel está formada por diferentes tipos de células (Queratinocitos, células de Langerhans, Linfocitos T, Melanocitos, Macrófagos y Mastocitos), que desempeñan diversos procesos inmunológicos, entre los cuales se encuentran los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, que se activan cuando se presentan lesiones en el tejido (Castrillón Rivera, Palma Ramos, & Padilla Desgarenes, 2008).

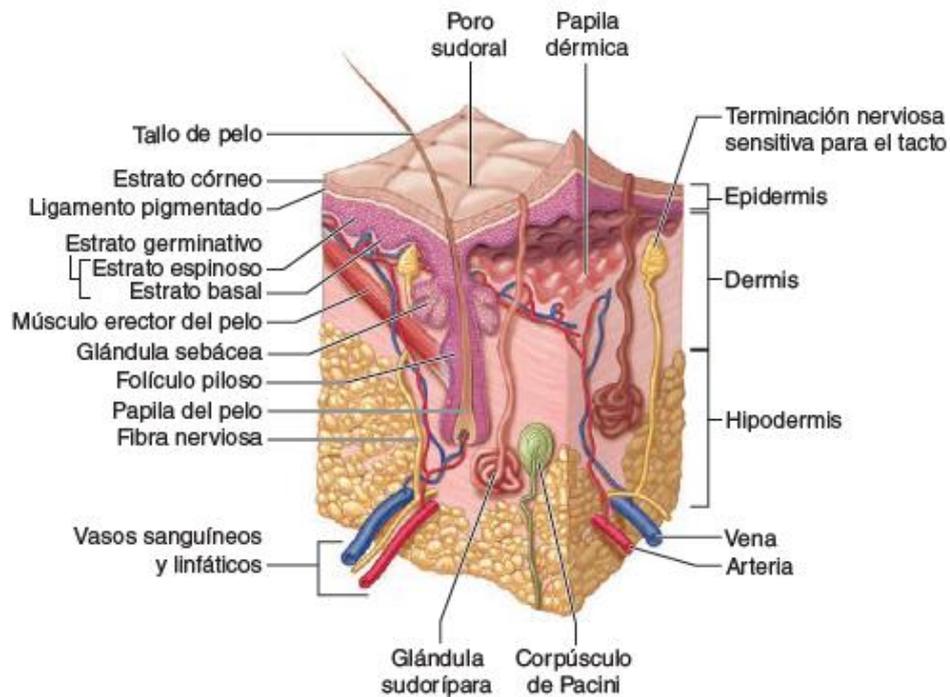


Figura 1. Representación esquemática de los componentes de la piel (Tomado de Andersen, y otros, 2015).

Epidermis.

La epidermis es la capa más externa de la piel y está poblada principalmente por queratinocitos (Mikesh, y otros, 2013) y experimenta regeneración continua (Andersen, y otros, 2015).

La estructura de la epidermis consiste en diferentes estratos, los cuales reciben el nombre de estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido (sólo se presenta en palmas de las manos y plantas de los pies y es conocido como piel gruesa) y finalmente el estrato córneo.

El estrato basal consta de una capa de células cercanas a la dermis. En esta capa al igual que en el estrato espinoso es donde se forman las nuevas células que remplazan a las que se eliminan en la superficie. Por otra parte el estrato espinoso contiene varias capas de células irregulares que se aplanan al aproximarse al estrato granuloso. Asimismo, los estratos basal y espinoso en conjunto se les designa como zona germinal debido a su rol como productor de nuevas células (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

Por último, el estrato granuloso, lúcido y córneo, se les denomina como capa córnea. En el estrato granuloso las células se aplanan cada vez más y se inicia el proceso de queratinización. Mientras que en el estrato córneo las células se eliminan, además es el principal responsable del espesor de la piel (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

A continuación se mencionan la función de los principales componentes epidérmicos:

Queratinocitos. Representan el 80% de las células de la epidermis. Los queratinocitos presentes en la capa basal son células que constan de un citoplasma basófilo y un núcleo grande, y están alineados a una membrana basal inferior que está anclada con hemidesmosomas. Los queratinocitos de la capa espinosa son poligonales y tienen un citoplasma eosinófilo. Los queratinocitos de la capa granulosa son células aplanadas que están paralelas a la superficie de la piel y contienen gránulos de queratohialina y queratina, así como cuerpos lamelares. Estos últimos intervienen en el proceso de exfoliación y en la formación de una capa pericelular de lípidos que actúa como una barrera contra la penetración de sustancias extrañas (hidrófilas). Los queratinocitos de la capa córnea son células eosinófilas aplanadas y hexagonales, que contienen en su mayoría una matriz de queratina y ayudan a la función de barrera (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Células de Langerhans. Esta población celular representa el 4% de las células presentes en la epidermis y su función es presentar antígenos hacia linfocitos vírgenes y de memoria. (Castrillón Rivera, Palma Ramos, & Padilla Desgarenes, 2008).

Melanocitos. Representan del 2 al 5% de las células de la epidermis. Se originan en la cresta neural y emigran hacia la epidermis donde producen melanina, que es el principal pigmento natural de la piel. La melanina se produce por la actividad enzimática de la tirosinasa sobre la tirosina y luego es almacenada en los melanosomas; éstos son transportados a lo largo de las proyecciones dendríticas de los melanocitos y son transferidos a los

queratinocitos adyacentes donde forman una capa que lo protege de los efectos de la luz ultravioleta (UV) (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Células de Merkel. Las células de Merkel poseen características neuroendocrinas como epiteliales. Actúan como mecanorreceptores y forman sinapsis con axones sensoriales dérmicos en la capa basal de la epidermis y en la vaina epitelial de los folículos pilosos (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Linfocitos. La epidermis humana contiene un bajo porcentaje (< 1%) de linfocitos, que están presentes sobre todo en la capa basal. Expresan mayormente fenotipo de memoria T/efector (Andersen, y otros, 2015).

Dermis.

La dermis es la capa de la piel de mayor espesor. Se divide en una capa exterior llamada dermis papilar y en una capa más profunda y dura llamada dermis reticular (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

La dermis papilar contiene varios tipos de células (fibroblastos y mastocitos), además de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. Consta principalmente de fibras de colágena dispuestas en fascículos laxos y fibras elásticas delgadas. Asimismo las papilas dérmicas contienen corpúsculos táctiles, terminaciones nerviosas especializadas que funcionan como mecanorreceptores (Andersen, y otros, 2015).

La dermis reticular consta de haces de colágena que tienden a situarse paralelos a la superficie de la piel. En esta capa la red elástica es más gruesa. También se encuentran los apéndices cutáneos, así como los plexos vasculares y nerviosos (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

La dermis contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos, conductos linfáticos, nervios, terminales nerviosas sensitivas y una cierta cantidad de tejido adiposo. También están presentes los folículos pilosos, músculo liso, glándulas sudoríparas y sebáceas (Palastanga, Field, & Soames, 2000).

La colágena constituye el 98% de toda la masa de la dermis. La mayor parte de las fibras dérmicas (> 90%) son de colágena, en donde predominan los tipos I y III, ya que le confieren resistencia mecánica a la piel. Aunque hay otras colágenas que están en la dermis como la colágena de tipo IV (en la unión dermoepidérmica y en las membranas basales de los apéndices cutáneos, los vasos, los músculos y los nervios) y la colágena de tipo VII (fibras de anclaje de la unión dermoepidérmica) (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Las fibras elásticas tiene la capacidad de estirarse al doble de su longitud y pueden recuperar su forma inicial cuando se libera esfuerzo deformante, debido a esto le confieren propiedades retráctiles a la piel. Tienen contornos irregulares y están constituidas por una matriz amorfa central de elastina, que es una proteína insoluble y está rodeada por un número variable de microfibrillas hechas de fibrilina. También existen las fibras de retícula que bioquímicamente constan de un ensamble de fibras de colágena delgadas (de tipos I y III) y fibronectina (Andersen, y otros, 2015).

La población celular fundamental en la dermis y en todos los tejidos conjuntivos son los fibroblastos. Estas células sintetizan todos los tipos de fibras. Durante el proceso de cicatrización de heridas los miofibroblastos desempeñan un papel importante, ya que son células derivadas de los fibroblastos que poseen un fenotipo similar a las células del músculo liso y secretan varias moléculas que participan en el proceso de cicatrización tales como quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas, etc. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Hipodermis.

El tejido adiposo es la porción más profunda de la piel y desempeña una función importante en la termorregulación, el almacenamiento de energía y la protección de lesiones mecánicas.

La hipodermis está constituida principalmente de adipocitos que son células grandes y con un citoplasma lipídico. Se encuentran dispuestos en lóbulos primarios y secundarios. Estos lóbulos están separados por tabiques de

tejido conjuntivo que contienen células como (fibroblastos, dendrocitos, células cebadas) (Andersen, y otros, 2015).

2.2 Proceso de reparación de heridas.

2.2.1 Concepto de herida.

Una herida es una rotura o defecto en la piel, que se formó debido a un daño físico, químico, térmico (Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017) o como resultado de la presencia de una condición médica o fisiológica subyacente (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007).

Se clasifican en agudas y crónicas. Las primeras son de corta evolución y cicatrizan alrededor de 6 semanas (Andersen, y otros, 2015), por otro lado, las heridas crónicas surgen de lesiones en los tejidos que se curan lentamente, es decir de doce semanas y con frecuencia reaparecen (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007).

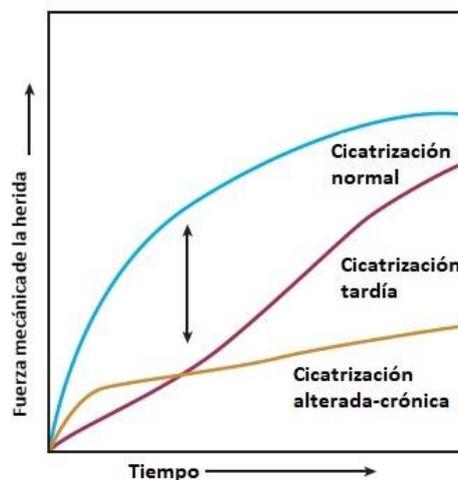


Figura 2. Espectro de cicatrización de las heridas agudas. Modificado de (Andersen, y otros, 2015).

2.2.2 Concepto de cicatrización.

La cicatrización de heridas es un conjunto de procesos biológicos que utiliza el organismo para recuperar su integridad y arquitectura e involucra tres fases: inflamación, proliferación y maduración (Salem Z, y otros, 2000).

2.2.3 Etapas de la cicatrización de heridas.

La curación de heridas es un proceso dinámico e interactivo que implica mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células parenquimatosas (Singer, 1999) con el objetivo de mantener o recuperar la integridad del tejido.

En general, la cicatrización normal de una herida sigue un patrón predecible que puede dividirse en fases definidas por las poblaciones celulares y las actividades bioquímicas: a) hemostasia e inflamación; b) proliferación y c) maduración y remodelación. En la figura 3 se muestra una secuencia que es fluida y superpuesta, y abarca el tiempo desde que se produce lesión hasta la resolución de heridas agudas. Todas las heridas necesitan progresar a través de esta serie de fenómenos celulares y bioquímicos que caracterizan las fases de la cicatrización a fin de restablecer de modo eficaz la integridad de los tejidos (Andersen, y otros, 2015).

2.2.3.1 Hemostasia e inflamación.

El proceso de cicatrización inicia cuando se produce la lesión que altera la integridad tisular dando como resultado el corte de vasos sanguíneos (Guarín Corredor, Santamaría, & Landínez Parra, 2013), provocando un sangrado de este modo el primer proceso que se presenta es la hemostasia e inicia con la liberación de factores quimiotácticos así como factores de coagulación en el sitio donde se generó la herida. La secuencia fenomenológica para la formación del trombo plaquetario es la siguiente: a) adhesión de las plaquetas a la pared vascular dañada, debido a la presencia de moléculas de adhesión tisular y receptores en la membrana plaquetaria, posteriormente inicia la b) activación en donde ocurre cambios en la morfología y contracción de las plaquetas, después ocurre el fenómeno de c) agregación, en la cual el fibrinógeno plasmático se asocia a la glicoproteína GPIIb-IIIa activada; como una molécula de fibrinógeno es un dímero simétrico, puede unirse simultáneamente a dos ligandos situados en dos plaquetas diferentes, lo que provoca la formación de una red de fibrinógeno y plaquetas que es lo que constituye el coágulo primario, que es

soluble y reversible para evitar la hemorragia, seguidamente se presenta el fenómeno de d) coagulación, en donde el fibrinógeno experimenta un cambio químico que lo convierte en fibrina que es insoluble y le da la capacidad de entrelazarse con otras moléculas iguales, para formar enormes agregados macromoleculares en forma de una red tridimensional, entre los cuales se encuentran bloqueadas las plaquetas, formándose así el coágulo secundario que es estable e insoluble causando que el sangrado se detenga. El coágulo se seca para formar una costra que proporciona resistencia y soporte al tejido lesionado. Por lo tanto la hemostasia juega un papel protector y contribuye a la curación exitosa de heridas (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007). Además de lograr la hemostasia, el coágulo de fibrina sirve como una estructura para la migración de células inflamatorias a la herida, como leucocitos, polimorfonucleares (PMN) y monocitos (Guarín Corredor, Santamaría, & Landínez Parra, 2013).

El siguiente proceso que se presenta es la inflamación y ocurre casi de manera simultánea a la hemostasia con una duración de aproximadamente tres días, (ver figura 4) (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007).

Debido al incremento en la permeabilidad vascular y la presencia de factores quimiotácticos como factores de complemento, interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), TGF- β , factor plaquetario 4, o productos bacterianos se estimula la migración de neutrófilos (Martin, 1997) y llegan al sitio de la herida y alcanzan su máximo a las 48 horas (ver figura 3). Los neutrófilos infiltrantes limpian el área herida de partículas extrañas y bacterias (Singer, 1999).

Los PMN son una fuente importante de citocinas en las etapas iniciales del proceso de inflamación en especial TNF- α que puede tener una influencia destacada en la angiogénesis y la síntesis de colágena. Asimismo, también liberan algunas proteasas como las colagenasas que participan en la degradación de la matriz y es la sustancia fundamental en la fase inicial de la cicatrización (Martin, 1997).

El siguiente grupo celular que se infiltra en el sitio de la herida es el de los monocitos, en respuesta a quimioatrayentes específicos, como fragmentos de proteína de matriz extracelular, factor de crecimiento transformante β y proteína quimiotáctica de monocitos. Cuando se transforman en macrófagos activados, liberan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento epitelial (EGF) (Singer & A.F, 1999). Asimismo, los macrófagos desempeñan una función importante en la regulación de la angiogénesis y el depósito y la remodelación de la matriz extracelular (Martin, 1997).

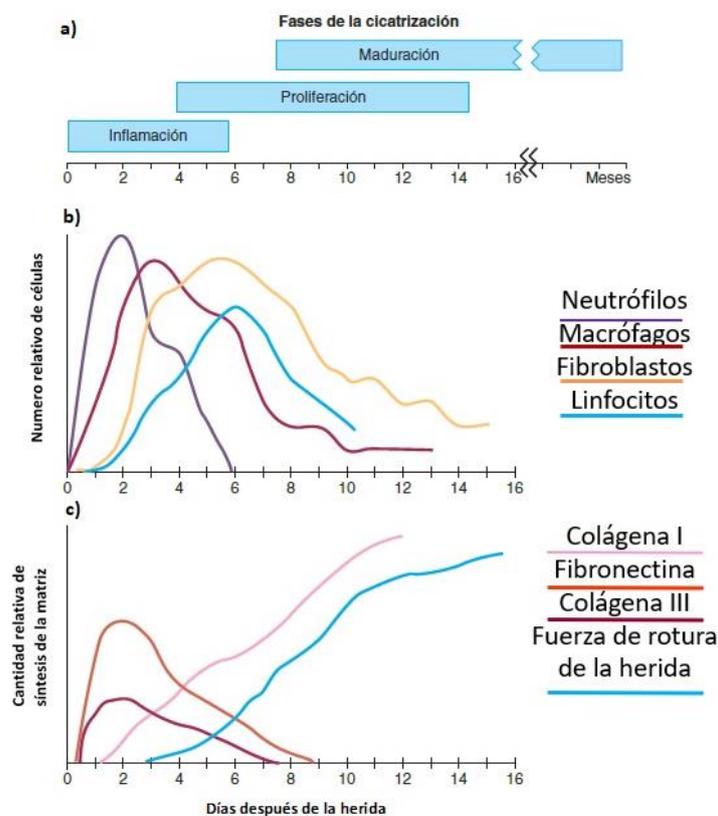


Figura 3. Fases celular, bioquímica y mecánica de la cicatrización de heridas. Modificado de (Andersen, y otros, 2015).

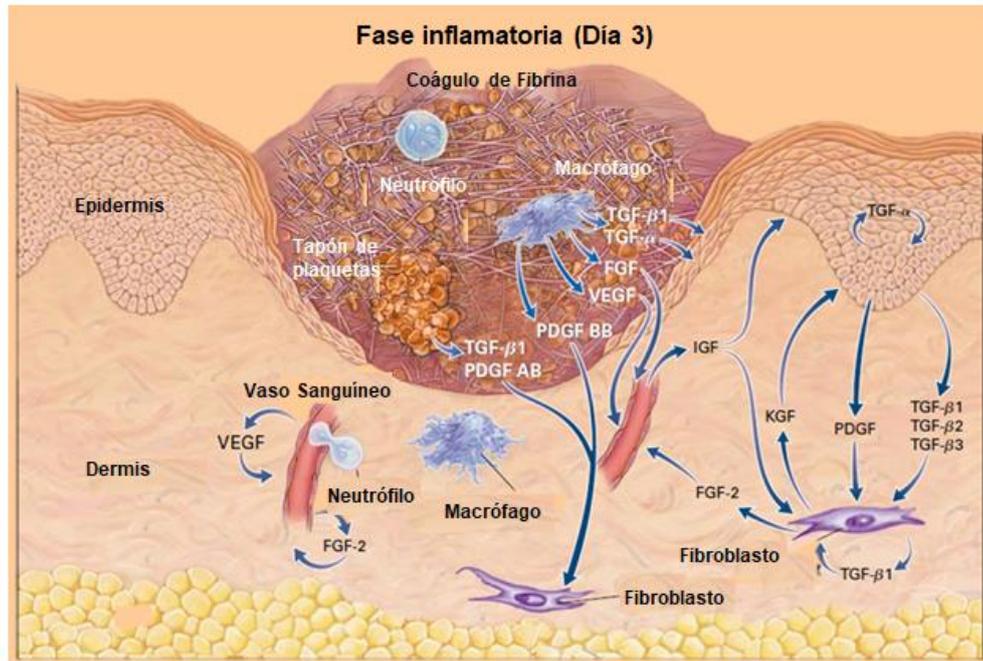


Figura 4. Mecanismo de la fase de inflamación cuando se produce una herida cutánea. Modificado de (Singer, 1999).

2.2.3.2 Proliferación.

La fase proliferativa es la segunda fase del proceso de cicatrización de heridas y que va de los días cuatro a trece días y comienza cuando los fibroblastos y las células endoteliales migran al sitio de la herida, debido a las citocinas y factores de crecimiento que los macrófagos previamente liberaron (ver tabla 1). En primer lugar los fibroblastos reclutados necesitan proliferar y activarse para realizar su principal función que es sintetizar y remodelar la matriz extracelular que contribuye a la formación del tejido de granulación (Martín, 1997).

La síntesis de la matriz extracelular se da después de que los fibroblastos migran al sitio de la herida y empiezan con la síntesis de colágena, de hecho se sabe que los fibroblastos aislados de heridas sintetizan más colágena que los que no provienen de heridas, proliferan menos y efectúan de modo activo la contracción de la matriz extracelular (Guarín Corredor, Santamaría, & Landínez Parra, 2013).

No obstante las células endoteliales también proliferan en forma extensa durante esta fase de la cicatrización. Estas células participan en la formación de nuevos capilares (angiogénesis), un proceso esencial para la cicatrización satisfactoria de la herida (Andersen, y otros, 2015).

La angiogénesis o neovascularización es un proceso en el cual se empiezan a formar nuevos vasos sanguíneos. La inducción de la angiogénesis se atribuye inicialmente al factor de crecimiento de fibroblastos. También se ha encontrado que otras moléculas tienen actividad angiogénica como el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento transformante, la angiogenina, la angiotropina, la angiopoyetina 1 y la trombospondina entre otros.

Tabla 1. Actividad de los macrófagos durante el proceso de cicatrización de heridas. Modificado de (Martin, 1997).

Actividad	Mediadores
Fagocitosis	Especies reactivas de oxígeno Óxido nítrico
Desbridamiento	Colagenasa y Elastasa
Incorporación y activación de células	Factores de crecimiento: PDGF, EGF, IFG Citocinas: TNF α , IL1, IL6, Fibronectina
Síntesis de matriz	Factores de crecimiento: TGF β , EGF, PDGF Citocinas: TNF α , IL1, INF γ Enzimas: Arginasa, Colagenasa Prostaglandinas Óxido nítrico
Angiogénesis	Factores de crecimiento: FGF, VEGF Citocinas: TNF α Óxido nítrico

Las células epidérmicas en la herida secretan grandes cantidades de factor de crecimiento de células endoteliales vasculares. Este factor es crítico para la angiogénesis durante la formación de tejido de granulación en los días cuatro a siete (Singer, 1999).

El tejido de granulación está formado por el crecimiento de capilares y vasos linfáticos en la herida, y la colágena es sintetizada por los fibroblastos

dando a la piel fuerza y forma. Al quinto día, se ha producido la máxima formación de vasos sanguíneos y tejido de granulación. Se produce un engrosamiento epitelial adicional hasta que la colágena une la herida. La proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena continúan durante dos semanas (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007).

2.2.3.3 Maduración y remodelación.

La fase de remodelación implica la formación de tejido conectivo celular y fortalecimiento del nuevo epitelio que determina la naturaleza de la cicatriz final. El tejido granular celular se cambia a una masa acelular desde varios meses hasta aproximadamente dos años (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007).

La etapa de maduración y remodelación de la cicatriz se caracterizan por una reorganización de la colágena sintetizada. Esta se cataboliza mediante metaloproteinasas de matriz (MMP), y el contenido neto de colágena de la herida es el resultado de un equilibrio entre la colagenólisis y la síntesis de colágena (Hosgood, 2006).

El depósito de matriz en el sitio de la herida sigue la siguiente secuencia característica: la fibronectina y la colágena tipo III van a constituir la estructura inicial de la matriz; los glucosaminoglicanos y los proteoglicanos son los siguientes componentes importantes de la matriz, y por último, la colágena tipo I representa la matriz final. La cantidad de colágena en la herida llega a una meseta varias semanas después de la lesión, pero la fuerza de tensión continúa en aumento durante varios meses más (Martin, 1997).

Sin embargo ocurre un recambio constante de colágena en la matriz extracelular, tanto en la herida cicatrizada como durante la homeostasia tisular normal. La síntesis como la lisis de colágena están controladas de modo estricto por citocinas y factores de crecimiento (Martin, 1997).

Una vez que la integridad y la fuerza del tejido se restablecen, se procede con el proceso de epitelización, cuyo propósito es restablecer la barrera externa

y se caracteriza por la proliferación y la migración de células epiteliales adyacentes a la herida. Algunos factores que promueven la epitelización son el EGF, el TGF- β , el factor de crecimiento fibroblástico básico, PDGF y el IGF-1.

Las células marginales del borde de la herida crecen y comienzan a migrar a través de la superficie de la matriz provisional (Hosgood, 2006).

Las células basales fijas en una zona cercana al borde del corte experimentan una rápida serie de divisiones mitóticas y migran moviéndose una sobre otra en forma de saltos hasta recubrir el defecto. Una vez que el defecto se cubre, las células epiteliales en migración pierden su aspecto aplanado y adquieren una forma cilíndrica y e incrementan su actividad mitótica. Las capas del epitelio se restablecen y al final la capa superficial se queratiniza (Andersen, y otros, 2015).

Finalmente ocurre la contracción de la herida que es evidente entre 5 y 9 días después de que se produjo la lesión. La contracción de la herida implica una interacción compleja de células, ECM y mediadores, incluidos TGF-b1, TGF-b2 y PDGF. Durante la segunda semana de curación, la aparición de fibroblastos de la herida con el fenotipo de miofibroblastos corresponde a la contracción de la herida. A medida que avanza la curación, el número de fibroblastos con fenotipos miofibroblásticos disminuye en la herida, lo que corresponde a una disminución en la contracción de la herida (Hosgood, 2006).

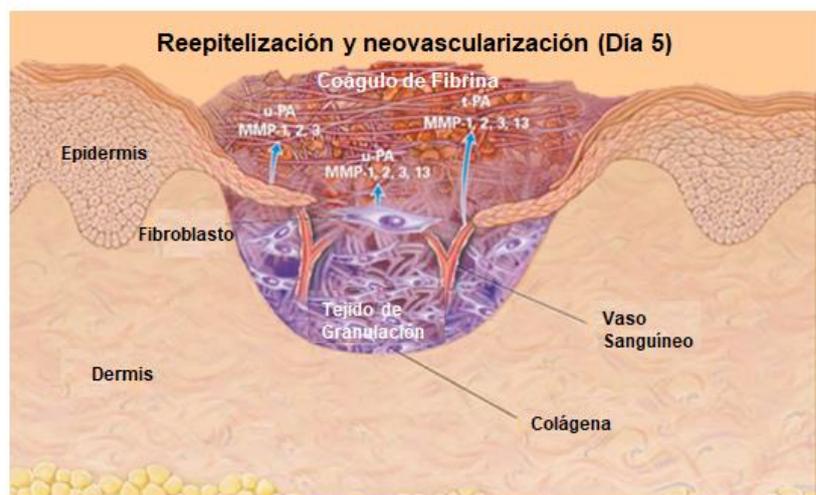


Figura 5. Proceso de reepitelización y neovascularización. Modificado de (Singer, 1999).

Tabla 2. Factores de crecimiento que participan en el proceso de cicatrización de heridas. Modificado de (Martin, 1997).

Factor de crecimiento	Origen de las células en la herida	Efectos Biológicos
PDGF	Plaquetas, macrófagos, monocitos, células de músculo liso y células endoteliales	Quimiotaxis, estimulación de angiogénesis, estimulación de síntesis de colágena, estimulación de la reepitelización
FGF	Fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, células de músculo liso y condrocitos	Estimulación de angiogénesis y mitogénesis
Factor de crecimiento de queratinocitos KGF	Queratinocitos y fibroblastos Fibroblastos	Homología con FGF y estimula queratinocitos Estimula fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, mioblastos, suprime la inflamación, formación de tejido de granulación, angiogénesis y reepitelización
EGF	Plaquetas, macrófagos, monocitos	Estimula la proliferación y la migración de todos los tipo de célula endotelial
TGF-α	Queratinocitos, plaquetas y macrófagos	Homología con EGF
TGF-β (tres isoformas β1,β2,β3)	Plaquetas, linfocitos T, macrófagos, monocitos, neutrófilos, fibroblastos y queratinocitos	Estimula la angiogénesis, estimula la quimiotaxis leucocitaria, regulación de la inflamación, TGF β 3 inhibe la formación de la cicatriz
Factores de crecimiento similares a la insulina (IFG-1 e IFG-2)	IFG-1: en concentraciones altas en hígado e IFG-2: en concentraciones altas durante el crecimiento fetal	Promueve la síntesis de proteínas/ Matriz extracelular.

2.2.4 Tratamiento para la cicatrización de heridas.

A lo largo de la historia, las heridas siempre han estado presentes en la humanidad, y con ello el tratamiento de estas. Los primeros relatos de la cicatrización de heridas datan de unos 2000 años a.c, cuando los sumerios utilizaban dos modalidades de tratamiento: un método espiritual que consistía en encantamientos y otro físico en el que se aplicaban materiales similares a cataplasmas a la herida. Los egipcios fueron los primeros que diferenciaron entre heridas infectadas en comparación con heridas no infectadas. El papiro quirúrgico de Edwin Smith, que data del año 1650 a.c, describe cuando menos 48 tipos diferentes de heridas. Un documento posterior (Papiro de Ebers, 1550 a.c) relata el uso de mezclas que contienen miel (propiedades antibacterianas), hila (propiedades absorbentes) y grasa (función barrera) para el tratamiento de heridas. Estas mismas propiedades aún se consideran esenciales en el tratamiento contemporáneo de heridas (Andersen, y otros, 2015).

Hoy en día el tratamiento de heridas por lo general comienza por la evaluación que hace el médico, para ello, se debe considerar lo siguiente de acuerdo a (Fonder, y otros, 2008):

- ✓ Descripción de cómo ocurrió la herida.
- ✓ Antecedentes de heridas, incluidos los diagnósticos previos y respuesta al tratamiento.
- ✓ Antecedentes familiares de heridas crónicas y/o pobre curación.
- ✓ Condiciones dermatológicas que predisponen a ulceración.
- ✓ Edema.
- ✓ La presencia o ausencia de dolor, con particular énfasis en la calidad del dolor, factores precipitantes, y métodos para aliviar el dolor.
- ✓ Condiciones sistémicas que pueden predisponer a desarrollo de la herida o curación deficiente.

- ✓ Hospitalizaciones y cirugías previas, incluido inserción de mallas, prótesis u otros cuerpos extraños.

2.2.4.1 Tipos de tratamiento de heridas.

2.2.4.1.1 Medicamentos.

Dentro de este grupo los más empleados son los medicamentos que van en contra de microorganismos para así poder controlar la infección como lo son los antibióticos. El tratamiento puede iniciarse con un solo antibiótico cuando se sospecha de un microorganismo específico aislado. Por el contrario, si se sospecha de la presencia de múltiples microorganismos, se debe realizar el tratamiento con un antibiótico de amplio espectro o la combinación de varios fármacos (Andersen, y otros, 2015).

2.2.4.1.2 Sustitutos de la piel.

Los injertos de piel se han usado desde hace mucho tiempo en el tratamiento de heridas agudas y crónicas. De tal modo los sustitutos vivos de la piel han demostrado beneficios para el tratamiento de úlceras venosas y úlceras neuropáticas diabéticas, mientras que los sustitutos de la piel sintéticos y alogénicos ahora también están disponibles para el cierre de heridas de larga duración (Fonder, y otros, 2008).

2.2.4.1.3 Factores de crecimiento.

Actualmente, los factores de crecimiento se administran a la herida por vía tópica (como el factor de crecimiento derivado de plaquetas) o mediante inyecciones subcutáneas (como el factor estimulante de colonias de granulocitos). Sin embargo, su efectividad es limitada debido a su corta vida media y la presencia de proteasas en heridas crónicas. Para superar esto, la terapia génica se ha investigado como un medio para proporcionar una fuente más duradera (Enoch, Grey, & Harding, 2006).

2.2.4.1.4 Oxigenoterapia hiperbárica.

La oxigenoterapia hiperbárica (OH) se usa ocasionalmente como un complemento del cuidado estándar de la herida. La OH, implica respirar oxígeno al 100% a presiones supra atmosféricas mientras está dentro de una cámara de compresión, se basa en la lógica de que la hipoxia tisular contribuye al fracaso de muchas heridas crónicas para sanar (Fonder, y otros, 2008).

2.2.4.1.5 Empleo de corriente de alto voltaje, monofásica y pulsada.

En el estudio de (Kloth & Feedar, 1988), se demostró que el tratamiento con alto voltaje eléctrico acelera la tasa de curación de úlceras dérmicas.

2.2.4.1.6 Apósitos.

El término de “apósito” se aplica a los productos elegidos para cubrir la herida y aislarla del medio ambiente. Sin embargo, se han desarrollado productos de vendaje que combinan esta función con otras propiedades, como desbridamiento o regulación de la humedad de la herida (Jeffcoate, Price, & Harding, 2004).

De acuerdo a (Kokabi, Sirousazar, & Hassan, 2007). Un apósito ideal para heridas debe cumplir las siguientes características:

- ✓ Mantener un ambiente húmedo local alrededor de la herida.
- ✓ Proveer de un intercambio gaseoso adecuado.
- ✓ Eliminar el exceso de exudados, pero no alcanzar la saturación en la superficie exterior de la herida.
- ✓ Proteger la herida de microorganismos que causen infecciones.
- ✓ Detener la desecación de la herida.
- ✓ Reducir la necrosis de la superficie de la herida.
- ✓ Estimular factores de crecimiento.

- ✓ Poseer protección mecánica.
- ✓ No ser alérgicos ni tóxicos.
- ✓ Biocompatibles y biodegradables.
- ✓ Fáciles y cómodos de eliminar y cambiar.
- ✓ Ayudar a reducir el dolor de la herida.
- ✓ Fácil esterilización.
- ✓ Costo comercial aceptable.

Clasificación de apósitos.

Existen numerosas formas de clasificar a los apósitos, en la figura 6. Se muestra un esquema donde se puede apreciar las diferentes formas en que se clasifican. Sin embargo nos centraremos los apósitos de acuerdo al material con el que son elaborados.

Apósitos según la naturaleza del material con el que están hechos.

Convencionales: El ejemplo que predomina en esta categoría son los apósitos compuestos de gasa o gasa de algodón, que se vendieron desde mediados de la década de 1970. Estos materiales se caracterizaron por su bajo costo, fácil uso y fabricación (Elbadawy A., Kenawy, & Xin, 2017). Sin embargo la gasa no es un apósito ideal ya que las gasas secas a menudo se unen a la superficie de la herida, causando dolor y trauma al lecho de la herida en los cambios de vendaje. Además los apósitos de gasa son susceptibles a la total saturación con fluido de la herida y tienen una capacidad limitada para proporcionar una barrera efectiva contra la invasión bacteriana (Fonder, y otros, 2008).

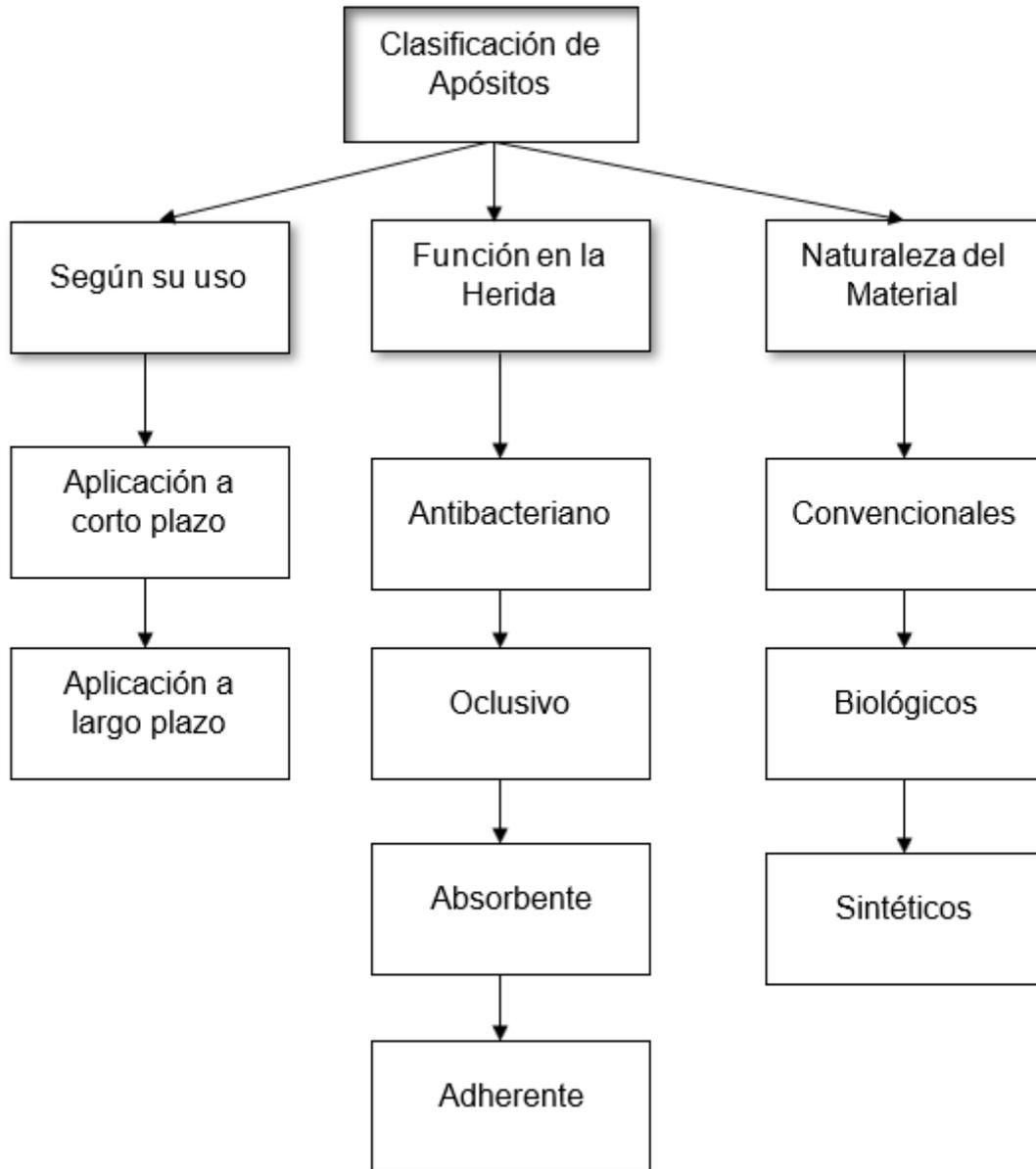


Figura 6. Clasificación de apósitos para heridas (Boateng, Stevens, Eccleston, & Matthews, 2007), (Sai K & Babu, 2000), (Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017).

Biológicos: Estos se derivan de tejidos naturales por lo general, consta de diversas formulaciones y combinaciones de colágena, elastina y lípidos. Los apósitos biológicos van desde aloinjertos, heteroinjertos de cerdos, perros y otras especies, hasta membranas embrionarias, embriones fetales y pieles neonatales, etc. (Sai, K & Babu, 2000).

Tabla 3. Sustitutos cutáneos bioactivos. Modificado de (Van der Veen, 2010).

Sustitutos cutáneos con actividad biológica

- Tejidos naturales
 - Aloinjertos cutáneos
 - Xenoinjertos cutáneos
 - Membranas amnióticas
 - Submucosa de intestino delgado porcino
 - Compuestos biológicos Sintéticos
 - Análogos dérmicos a base de colágena

 - Tejido derivado de cultivos
 - Bicapa de tejido humano
 - Queratinocitos cultivados
 - Análogos dérmicos con siembra de fibroblastos
 - Análogos dérmicos con siembra de células epiteliales
-

Sintéticos: Los apósitos artificiales están fabricados con materiales sintéticos tales como polímeros (Elbadawy A., Kenawy, & Xin, 2017).

Estos apósitos se pueden clasificar en:

Películas: Son vendajes homogéneos compuestos por una lámina de polímero recubierta por un lado con un adhesivo. Son altamente elastoméricos y transparentes. Los polímeros comúnmente usados son poliuretano, polietileno, policaprolactona, metacrilato dimetilaminoetilo (Sai, K & Babu, 2000).

Alginatos: Los alginatos son buenos absorbentes de exudado; se pueden usar como material de embalaje y algunos tienen propiedades hemostáticas. Tienden a biodegradarse cuando están en contacto con líquido de la herida y, por lo tanto, causan menos trauma cuando se eliminan, aunque a veces se secan y forman un tapón (Jeffcoate, Price, & Harding, 2004).

Hidrocoloides: Son formulaciones compuestas que contienen un cóctel de adhesivos elastoméricos y agentes gelificantes (Sai K & Babu, 2000). Estos apósitos adhesivos, oclusivos y adaptables absorben el exudado de la herida para formar un gel hidrófilo que ayuda a mantener un ambiente de curación húmedo. En comparación con las películas, los hidrocoloides tienen menos

transmisión de vapor de humedad; por lo tanto, dependen principalmente de la absorción para el manejo del exudado (Fonder, y otros, 2008).

Hidrogeles: Los hidrogeles comprenden una mezcla de polímeros hidratados: el agua representa hasta el 90% de su peso. Las diferentes formulaciones dan como resultado una capacidad variable para donar agua y absorber líquido de la herida (Jeffcoate, Price, & Harding, 2004).

Espumas: Varios apósitos de espuma están disponibles, con diferentes grados de absorción. Las espumas también pueden proporcionar aislamiento térmico a la herida y pueden cortarse y conformarse fácilmente. El beneficio potencial de los apósitos de espuma puede basarse en su grado de absorción y protección (Jeffcoate, Price, & Harding, 2004).

En general el tratamiento de las heridas es un proceso complejo, como se mencionó anteriormente existen varios factores que pueden influir para una correcta cicatrización de la herida, que involucran desde la valoración médica, hasta la elección del tipo de tratamiento que se realizará, en el caso de este trabajo nos enfocaremos en los hidrogeles, cuyo tema será tratado en la siguiente sección.

2.3 Hidrogeles.

Los hidrogeles son redes tridimensionales, macromoleculares y muy hidrófilas, que se producen por reticulación química o física de polímeros solubles. Debido a las propiedades peculiares de los hidrogeles, como su alta sensibilidad a los ambientes fisiológicos, la naturaleza hidrófila, el contenido de agua similar a los tejidos blandos y la flexibilidad adecuada, los hacen excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas (Elbadawy A., Kenawy, & Xin, 2017). La propiedad más importante que presentan los hidrogeles es su grado de hinchamiento (Ortiz Lucio, Antonio Cruz, Cruz Gómez, Mendoza, & Morales Cepeda, 2006), esto es debido a la presencia de grupos químicos como -OH, -COOH, CONH₂ y -SO₃H (Escobar, García, Zaldivar, & Katime, 2002).

Los hidrogeles generalmente alcanzan su máximo hinchamiento cuando se produce un equilibrio entre las fuerzas impulsoras osmóticas que estimulan la entrada de agua o fluidos biológicos en la matriz del hidrogel hidrofílico y las fuerzas de cohesión ejercidas por las cadenas de polímero dentro del hidrogel. Estas fuerzas de cohesión resisten la expansión del hidrogel y la extensión de estas fuerzas depende particularmente de la densidad de reticulación del hidrogel (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

En general, cuanto más hidrófilo sea el polímero que forma el hidrogel, mayor será la cantidad total de agua absorbida, igualmente cuanto mayor sea la extensión de reticulación de un hidrogel particular será menor el grado de hinchamiento del gel. Los hidrogeles en sus formas secas generalmente se llaman "xerogeles". Mientras que los hidrogeles porosos y secos resultantes del uso de técnicas de secado como la liofilización o la extracción con solventes se denominan "aerogeles" (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Tabla 4. Factores que influyen en el grado de hinchamiento de los polímeros en los hidrogeles. Modificado de (Escobar, García, Zaldivar, & Katime, 2002).

Factores	Hidrogeles	Mecanismo
Especies Químicas	Hidrogeles con grupos electroaceptores	Los compuestos electroaceptores forman complejos de transferencia de carga produciendo cambios en el hinchamiento.
Fuerza iónica	Hidrogeles iónicos	Cuando hay cambios en la fuerza iónica se producen cambios en la concentración de iones dentro del gel y en el hinchamiento.
Magnético	Partículas dispersas en alginato en forma de microesferas	Cuando se aplica un campo magnético cambia la porosidad del gel, así como el hinchamiento.

pH	Hidrogeles ácidos o básicos	Cuando hay cambios en el pH del medio ocurren variaciones en el hinchamiento del polímero.
Temperatura	Hidrogeles termosensibles	Cuando hay cambios en la temperatura del medio, se producen cambios en la interacción polímero-polímero y polímero-solución provocando de esta manera variaciones en el hinchamiento de los hidrogeles.

La cantidad de agua en un hidrogel determinara la absorción y difusión de solutos a través del mismo. Los poros pueden formarse en hidrogeles por separación de fases durante la síntesis, o pueden existir como poros más pequeños dentro de la red. El tamaño de poro promedio, la distribución de tamaño de poro y las interconexiones de poros son factores importantes en una matriz de hidrogel que a menudo son difíciles de cuantificar, y generalmente se incluyen juntos en el parámetro llamado "tortuosidad (Hoffman, 2012). Un factor común utilizado para describir y "corregir" la difusión de pequeños solutos a través de los poros en las membranas porosas es la relación entre el volumen fraccional de poros, o porosidad (E) y el factor de tortuosidad (T). Si los poros se llenan con agua, como con los hidrogeles, la difusividad del soluto libre en el agua, D_0 , se multiplica por E/T para producir la difusividad "aparente" (D_{app}) , a través de la membrana (Dong, Hoffman, & Yan, 1994).

2.3.1 Clasificación de hidrogeles.

Los hidrogeles se clasifican de numerosas formas como se muestra en la figura 7.

2.3.1.1 Hidrogeles según su origen.

Los hidrogeles se pueden clasificar en naturales, sintéticos y semisintéticos según su origen. La mayoría de los hidrogeles sintéticos se sintetizan mediante polimerización tradicional de monómeros activados con vinilo. Los hidrogeles naturales están hechos de polímeros que incluyen polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos. Estos polímeros naturales se obtienen de diversos orígenes naturales. Por ejemplo, la colágena se obtiene de los mamíferos, mientras que el quitosano se obtiene de los exoesqueletos de mariscos (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Algunos de los polímeros sintéticos y naturales más empleados con aplicaciones biomédicas se muestran en las tablas 6 y 7 respectivamente.

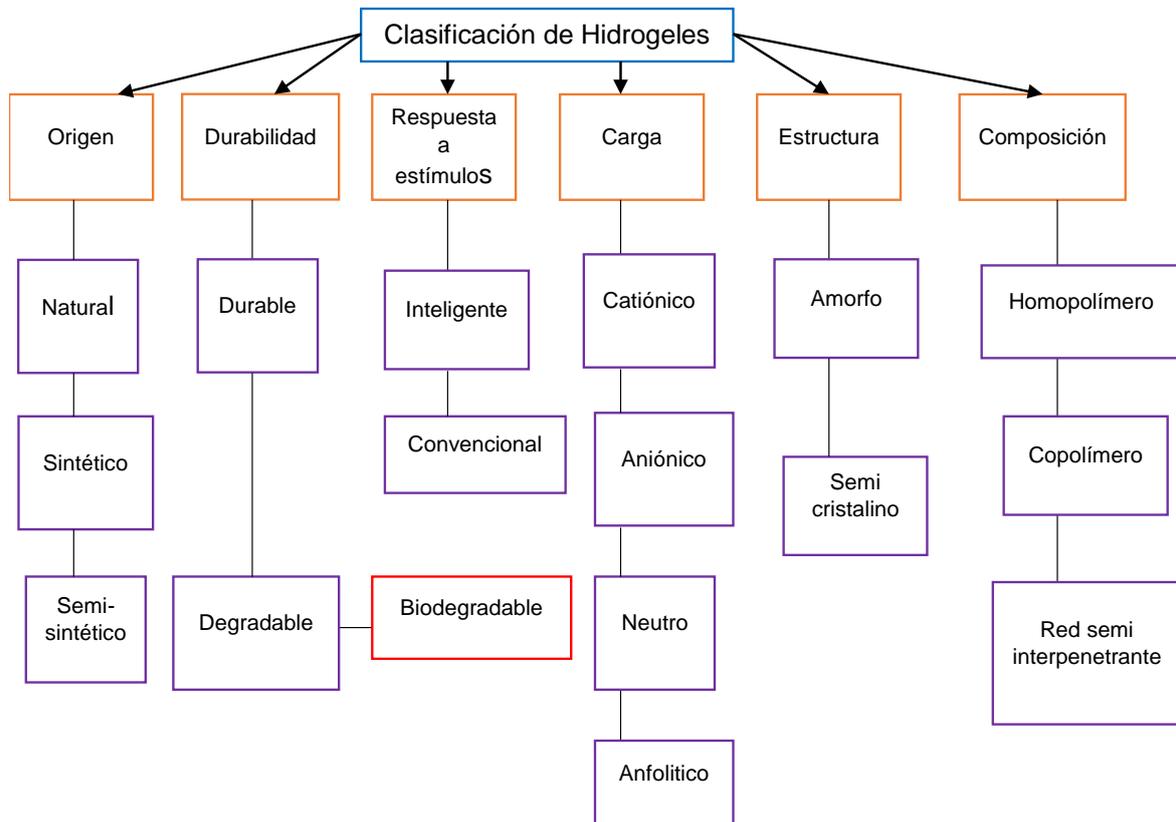


Figura 7. Diagrama esquemático que muestra algunas de las formas de clasificar a los hidrogeles. Modificado de (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Tabla 6. Polímeros sintéticos con aplicaciones biomédicas.

Polímero	Propiedades y usos	Referencia
Poli (ácido glicólico) (PGA)	Biodegradable y termoplástico. Este polímero fue utilizado para desarrollar la primera sutura absorbible sintética bajo la marca registrada de "Dexon".	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003).
Poli (ácido láctico)	Polímero termoplástico y biodegradable. Actualmente se utiliza en una serie de aplicaciones biomédicas, tales como suturas, medios de diálisis y dispositivos de administración de fármacos.	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003).
Poli (dioxanona)	Polímero biodegradable que se usa como sutura absorbible de larga duración y es ideal para tejidos internos.	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003)
Poli (caprolactona)	Polímero biodegradable. Es utilizada como sutura (vendido bajo la marca "Monocryl").	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003).
Poli (3-Hidroxitirato)	Polímero biodegradable, actualmente se vende bajo el nombre comercial "Biopol".	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003).
Poli (valcrolactona)	Polímero no tóxico y biodegradable.	(Gunatillake A. & Adhikari, 2003).
Poli (β -Ácido malónico)	Excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Entre sus principales aplicaciones está el diseño de dispositivos para la administración de fármacos y vendajes.	
Poli (N-vinilpirrolidona) (PVP)	Polímero biocompatible y biodegradable. Se ha utilizado anteriormente en membranas de hidrogel para sustitutos de la piel	(Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017).

Polietilenglicol (PEG)	<p>debido a su baja toxicidad, buena transmisión de vapor de agua e impermeabilidad para bacterias.</p> <p>PEG es un polímero sintético, anfifílico, viscoso y soluble en agua. Debido a sus propiedades biológicas destacadas como baja toxicidad, biocompatibilidad /biodegradabilidad y rentabilidad, esto lo hace un candidato apto para varias aplicaciones médicas.</p>	(Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017).
Poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAm)	<p>Es un polímero reversible térmicamente con una baja temperatura crítica de la solución en agua a 32 °C, además no es tóxico y es biodegradable y biocompatible.</p>	(Elbadawy A, Kenawy, & Xin, 2017). (Ward & Georgiou, 2011).

Tabla 7. Polímeros Naturales con aplicaciones biomédica.

Polímero	Propiedades y usos	Referencia
Colágena	<p>La colágena es la proteína más abundante en el cuerpo humano y es un componente importante del ligamento, cartílago, tendón, piel y hueso. Se han desarrollado gran variedad de hidrogeles a base de colágena para cicatrización de heridas debido a su gran participación en el proceso de reparación de la piel.</p>	(Ulery, Nair, & Laurencin, 2011).

Queratina	La queratina es una proteína estructural importante para mantener la durabilidad estructural de los tejidos, por lo tanto una de las aplicaciones biomédicas de la queratina se basa en el desarrollo de vendajes para la curación de heridas.	(Tabata, Miyao, Ozeki, & Ikada, 2000).
Elastina	La elastina es una proteína clave de la matriz extracelular encontrada dentro de la piel, pulmones, vejiga, cartílago elástico y arterias. La elastina desempeña un papel esencial en la biomecánica tisular proporcionando una combinación de fuerza y elasticidad, además de modular una variedad de interacciones celulares y de proteínas.	(Mithieux, Raskob, & Weiss, 2004).
Ácido hialurónico	El ácido hialurónico está presente en la mayoría de los tejidos vivos y en grandes cantidades en la piel, cerebro y sistema nervioso central. Además juega un papel como regulador de la hidrodinámica tisular.	(Catanzano, y otros, 2015).
Quitosano	El quitosano es un polímero que se obtiene del exoesqueleto de los moluscos y que confiere propiedades importantes a los biomateriales, entre las cuales la más destacada es su actividad antimicrobiana.	(Konovalova, y otros,(s.f)).
Fibrina	Biopolímero reticulado compuesto de fibronectina, es	(Ulery, Nair, & Laurencin, 2011).

	<p>biocompatible, biodegradable, inyectable y capaz de mejorar la proliferación celular, de hecho hay un suplemento quirúrgico en el mercado con el nombre "Ethicon".</p>	
Alginato	<p>Los alginatos son copolímeros y debido a sus propiedades de biocompatibilidad y bioresorción, son muy usados en la elaboración de membranas para aplicaciones tópicas.</p>	(Catanzano, y otros, 2015).
Glucano	<p>Polímero biodegradable soluble en agua, derivado de la fermentación de plantas incubadas, el glucano tiene efectos antibacterianos.</p>	(Elbadawy A., Kenawy, & Xin, 2017).

2.3.2 El papel de los hidrogeles como andamios en ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles se han estudiado cada vez más como andamios para la ingeniería de tejidos. Con base en su diseñado como andamios de ingeniería de tejidos pueden contener poros lo suficientemente grandes para acomodar células vivas o pueden diseñarse para disolverse y degradarse, liberando factores de crecimiento y creando poros en los que las células pueden migrar y proliferar (Hoffman, 2012). Además pueden servir como depósitos de fármacos y de sustancias bioactivas que estimulen el proceso de reparación natural (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

En la tabla 8 se muestran algunas ventajas y desventajas de los hidrogeles como andamios en ingeniería de tejidos.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de los hidrogeles como matrices en ingeniería de tejidos. Modificado de (Hoffman, 2012).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • El ambiente acuoso puede proteger a las células y medicamentos frágiles (Péptidos, proteínas, oligonucleótidos) • Buen transporte de nutrientes a las células y productos de las células • Puede ser fácilmente modificado con ligandos de adhesión celular • Se puede inyectar in vivo como un líquido que gelifica a la temperatura corporal • Generalmente biocompatible 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ser difícil de manejar • Usualmente suele ser mecánicamente débil • Puede ser difícil cargar los medicamentos y las células para luego reticularse <i>in vitro</i> como una matriz prefabricada • Puede ser difícil de esterilizar

2.3.3 Criterios en el diseño de un hidrogel para andamios en ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles en la ingeniería de tejidos deben cumplir una serie de criterios de diseño para imitar la ECM y funcionar adecuadamente para promover la formación de nuevos tejidos. Los criterios de diseño deben incluir parámetros mecánicos y fisicoquímicos clásicos (como la biodegradación y la porosidad), y parámetros de rendimiento biológico (como la biocompatibilidad y la proliferación celular). Además de demostrar una vascularización mejorada. También los parámetros tales como la accesibilidad y la viabilidad comercial deben considerarse al desarrollar andamios de hidrogel para propósitos de ingeniería de tejidos (Hoffman, 2012).

Biodegradación: Un requisito básico de un andamio para la ingeniería de tejidos es mantener la proliferación celular y la distribución celular deseada durante la vida anticipada del andamio. La vida del andamio es hasta que se complete su degradación, por lo tanto se tiene que tener en cuenta el alcance y la velocidad de degradación, por ejemplo si se llegasen a emplear algunos de los polímeros mencionados en la tabla 6 y 7 se tendría que conocer cómo es su

comportamiento en este aspecto para así poder estimar en cuanto tiempo se degradaría el andamio (Hoffman, 2012).

Dos de los mecanismos de degradación de los polímeros son por vía hidrolítica y enzimática. La vía hidrolítica se presenta en polímeros que poseen grupos funcionales como: ésteres, orto ésteres, anhídridos, carbonatos, amidas, uretanos, ureas, etc., mientras que la vía enzimática se presenta en biopolímeros que incluyen proteínas y polisacáridos como el quitosano, ácido algínico, etc., por acción de ciertas enzimas (Nair & Laurencin, 2007).

Biocompatibilidad: Es necesario que el andamio diseñado sea compatible ya que no deben presentarse respuestas inmunológicas o tóxicas. Esto es de total relevancia ya que la naturaleza de los apósitos es interactuar continuamente con el cuerpo durante el proceso de curación, regeneración celular y degradación del andamio (Drury, 2003).

Tamaño del poro y extensión de la porosidad: Los andamios de hidrogel diseñados para la ingeniería de tejidos deben ser altamente porosos con una geometría abierta e interconectada, para permitir una gran área de superficie en relación con el volumen del andamio. Esta alta porosidad interconectada fomentará el crecimiento celular, la distribución celular uniforme y ayudará a la neovascularización de la matriz. El tamaño de poro ideal para andamios empleados en ingeniería de tejidos va de 10-150 μm (Drury, 2003).

Características mecánicas: La ECM tiene un cierto nivel de tensión isométrica entre las células de un tejido dado y esta varía en cada tipo de tejido, por lo tanto al diseñar el hidrogel como andamio para ingeniería de tejidos, se desea que tenga propiedades mecánicas similares al ECM (Hoffman, 2012). Algunas de las propiedades mecánicas descritas de apósitos para aplicaciones en piel son: el esfuerzo máximo a la tensión, módulo de elasticidad y porcentaje de elongación (Suárez, Tulandé, Mina, & Peñaranda, 2014).

Vascularización: Los andamios vascularizables deben tener un alto grado de porosidad, tamaños de poros deseables y permitir la remodelación vascular a medida que los tejidos maduran. Los hidrogeles han sido eficaces

como andamios vascularizables. Por ejemplo, se ha encontrado que los hidrogeles a base de alginato tienen mucho éxito en la recreación de hueso vascularizado (Drury, 2003).

2.3.4 Métodos de preparación de hidrogeles.

Existen diversas formas para preparar hidrogeles y estas se basan en reticulación física o química de polímeros tales como las que se describen a continuación:

2.3.4.1 Hidrogeles físicos.

Se le llama geles físicos o reversibles cuando las redes se mantienen unidas por enredos moleculares y fuerzas secundarias que incluyen fuerzas iónicas, puentes de hidrógeno o asociación hidrofóbica. Los hidrogeles físicos no son homogéneos ya que los dominios asociados hidrofóbicamente o iónicamente pueden crear falta de homogeneidad. Los extremos de la cadena libre también representan defectos transitorios de la red en los geles físicos (Hoffman, 2012).

Algunas técnicas de entrecruzamiento físico se muestran a continuación:

Complejación de polielectrolitos: Aquí lo que se busca es la preparación de hidrogeles mediante la formación de complejos de polielectrolitos, donde los enlaces se forman entre los pares de sitios cargados a lo largo de las cadenas de los polímeros (Akhtar, 2016).

Puente de hidrógeno: La formación del hidrogel se da por la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de los polímeros. Los hidrogeles desarrollados por esta técnica se ven afectados por muchos factores, como la concentración de polímeros, relación molar de cada polímero, tipo de disolvente, temperatura de la solución y grado de asociación (Akhtar, 2016).

Asociación hidrofoba: En esta metodología se forman estructuras separadas por microdominios hidrofobos. Estos dominios actúan como puntos de reticulación asociados en toda la estructura polimérica, y están rodeados por

regiones hidrofílicas que absorben agua (El-Sherbiny & Yacoub, 2013) y (Akhtar, 2016).

2.3.4.2 Hidrogeles químicos.

La reticulación química de polímeros es uno de los principales métodos para la preparación de hidrogeles (El-Sherbiny & Yacoub, 2013). Los hidrogeles químicos son redes tridimensionales formadas por la unión covalente de todas las cadenas de polímeros existentes en un sistema determinado hasta formar una sola macromolécula (Lárez Velásquez, 2003).

Algunos de los métodos de preparación de hidrogeles químicos se mencionan a continuación:

Polimerización de radicales libres: La preparación de hidrogeles utilizando esta técnica implica los pasos de iniciación, propagación, transferencia de cadena y terminación. En la etapa de iniciación se puede utilizar una amplia variedad de iniciadores de oxido-reducción, térmicos, ultravioleta, etc., para la generación de radicales libres. Estos radicales reaccionan con los monómeros convirtiéndolos en formas activas que reaccionan con más monómeros y así sucesivamente en la etapa de propagación los radicales de cadena larga resultantes se terminan mediante la transferencia de cadena o mediante la combinación de radicales formando matrices poliméricas (Akhtar, 2016).

Entrecruzamiento por irradiación de precursores poliméricos: Las técnicas de radiación ionizante son métodos muy efectivos para la síntesis de hidrogeles. Las radiaciones ionizantes, como el haz de electrones y los rayos γ tienen una energía lo suficientemente alta como para ionizar moléculas simples en el aire o en el agua (El-Sherbiny & Yacoub, 2013). Durante la irradiación de una solución de polímero se generan muchos sitios reactivos a lo largo de las cadenas del polímero. Entonces la combinación de estos radicales conduce a la formación de un gran número de nuevos enlaces químicos. La formación de hidrogeles utilizando este enfoque se puede realizar mediante la irradiación de los polímeros en masa o en solución. Sin embargo, la irradiación de una solución de polímero es la más favorecida debido a que se requiere menor energía para la formación

de macroradicales. Además en solución, la eficiencia de los radicales es alta debido a la reducida viscosidad de la mezcla de reacción (Akhtar, 2016).

La aplicación de irradiación al desarrollo del hidrogel ofrece diversas ventajas sobre otros métodos de preparación, por ejemplo, en los métodos de irradiación no se necesitan catalizadores ni aditivos para iniciar la reacción. Además los métodos de irradiación son simples y la extensión de la reticulación se puede controlar fácilmente variando la dosis de irradiación y de igual forma empleando este método se puede obtener materiales estériles (Young-Chang Nho, Jong-Seok Park, & Youn-Mook Lim, 2014) y (Rosiak & Ulanowski, 1999).

En este trabajo nos enfocaremos en la síntesis de hidrogeles por irradiación γ , por lo cual en el siguiente segmento se detalla más sobre esta metodología.

2.3.5 Síntesis de hidrogeles por irradiación gamma.

Los hidrogeles se pueden obtener mediante polimerización inducida por radiación, y como ya se mencionó, este método es muy efectivo para la síntesis de los mismos. Además es un método respetuoso con el medio ambiente ya que permite obtener materiales estériles y con esto evita el gaseamiento con bromuro de metilo y óxido de etileno los cuales son cancerígenos y dañan la capa de ozono (Jinot, Fritz, Vulimiri, & Keshava, 2018).

El uso de radiaciones de alta frecuencia tiene muchas aplicaciones como por ejemplo: entrecruzamiento de plásticos y gomas, curado de revestimientos y tintas, productos termocontraíbles, injertos, modificación de madera y otros productos naturales y esterilización de materiales. Por lo tanto este método es totalmente confiable para la elaboración de hidrogeles (Clough, 2001), ya que la irradiación gamma es un método físico comparable con la pasteurización, enlatado o congelación y está avalado por diversos organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Comisión Codex Alimentarius y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) (Fairand, 2002).

La radiación de alta energía, en particular gamma y haz de electrones, puede ser utilizado para polimerizar compuestos insaturados. Esto quiere decir que los polímeros solubles en agua con grupos vinilo, se pueden convertir en hidrogeles usando irradiación de alta energía (Hennink & van Nostrum, 2012).

2.3.5.1 Los rayos gamma.

Los rayos gamma son un tipo de radiación electromagnética que se produce por elementos radiactivos o por procesos subatómicos. Debido a las altas energías que poseen los rayos gamma constituyen un tipo de radiación ionizante capaz de penetrar en la materia profundamente. (Charlesby, 1960).

Las diversas fuentes de radiación de alta energía se dividen en dos grupos distintos.

El primer grupo hace uso de las radiaciones (α , β , γ , protón, neutrón) emitidas cuando los núcleos atómicos inestables se desintegran; tales núcleos pueden ser naturales o producidos artificialmente. El segundo grupo no está relacionado de ninguna manera con los cambios nucleares y se basa directamente en la aceleración de partículas a altas energías mediante el uso de técnicas de alto voltaje. (Charlesby, 1960).

En la tabla 10 se muestran las fuentes de radiación típicas y el intervalo de radiación que suministran.

En este trabajo nos enfocaremos en la radiación obtenida por cobalto 60 (^{60}Co), debido a que esta fue la fuente utilizada para irradiar los polímeros.

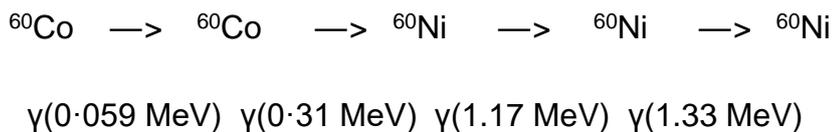
Tabla 9. Fuentes de radiación. Modificado de (Charlesby, 1960).

Fuente nucleares	Fuentes electrónicas
<ul style="list-style-type: none"> • Reactor nuclear (interior). • Reactor nuclear (escudo). • Fluidos radiactivos circulantes (Na, K). • Productos de fisión gaseosa (Kr, Xe). • Barras de combustible gastado. • Reactor liquido de combustible • Productos de fisión: soluciones y separados (¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr). • Elementos radiactivos naturales (por ejemplo, Ra, Rn). • Isótopos radiactivos (⁶⁰Co) 	<ul style="list-style-type: none"> • Transformador de alto voltaje. • Circuito duplicador de voltaje. • Generador de impulsos (capacitrón). • Acelerador de Van de Graaff. • Transformador resonante. • Acelerador lineal. • Betatrón. • Ciclotrón, sincrociclotrón, etc.

Cobalto radiactivo.

El cobalto ⁶⁰Co es un isotopo radiactivo que se obtiene cuando el cobalto se somete a bombardeo de neutrones en la pila nuclear.

El esquema de desintegración para ⁶⁰Co es el siguiente:



Cada desintegración de un núcleo de cobalto radiactivo da lugar a dos fotones γ con energía de 1.33 y 1.17 MeV, que se absorben principalmente en la fuente (Charlesby, 1960).

Tabla 10. Características de algunas fuentes de radiación típicas. Modificado de (Charlesby, 1960).

Radiación	Fuentes	Fuerza Max.	Campo de radiación Orden de magnitud	Penetración
Rayos γ	^{60}Co , ^{137}Cs , Subproducto de fisión	10000 curies 2000 curies	10^5 - 10^6 r/hr 10^4 r/hr	Penetrante Penetrante
Electrones	Aceleradores: Van de Graaff Acelerador lineal Capacitron Transformador de resonancia	0-5-10 MeV y sobre 100-4000 μamp	10^{10} r/hr	Penetración limitada desde 0.5 cm a unos pocos centímetros
	^{198}Au , ^{90}Sr , etc.	1 Curie/cm ²	10^6 rep/hr	Fracción de cm
Neutrones y rayos γ	Reactores Ra-Be, y Foto- neutrón	10^{11} - $4 \cdot 10^{14}$ neutrones/cm ²	10^5 - 10^9 r/hr Insignificante	Penetrante Penetrante
Rayos X	Suaves Duros		10^8 r/hr $5 \cdot 10^6$ r/hr	1 mm Penetrante
Partículas positivas cargadas	Aceleradores Ciclotrón Acelerador- lineal Reactores para fragmentos de fisión.	16 MeV, 200 μamp $5 \cdot 10^{14}$ neutrones / cm ² *seg	10^{12} r/hr $\sim 10^{11}$ rep/hr	Espesor muy limitado Sección extremadamente delgada

2.3.5.2 Irradiadores gamma.

Hoy en día hay una gran variedad de irradiadores gamma, estos pueden ser desde irradiadores de bajo volumen cuyo uso es principalmente para actividades de investigación, hasta aquellos capaces de irradiar grandes cantidades de producto (Fairand, 2002).

Estos irradiadores se dividen en autocontenidos y panorámico. De acuerdo con la organización internacional de energía atómica se clasifican en función del almacenamiento de la fuente. Los primeros como categoría I (almacenamiento seco) y III (almacenamiento húmedo) y los segundos como Categoría II (almacenamiento seco) y IV (almacenamiento húmedo) (Fairand, 2002).

Los irradiadores autocontenidos se emplean cuando se requieren niveles de radiación y una capacidad de procesamiento menor, mientras que los irradiadores panorámicos se destinan a plantas piloto o de escala comercial y pueden procesar mayor cantidad de producto (Fairand, 2002).

A continuación se presentan algunos ejemplos de irradiadores panorámicos:

Irradiador gamma con cámara de irradiación: La fuente de irradiación está basada en cobalto 60 (^{60}Co) que se encuentra encapsulado en pequeños cilindros de acero inoxidable, que a su vez se introducen en una vaina o lápiz también de acero inoxidable. Estos irradiadores por lo general utilizan blindajes de concreto o acero. Su operación puede ser por lote o de manera continua. El producto se introduce en contenedores o se deposita alrededor de la fuente (Fairand, 2002).

Irradiador gamma en inmersión: Este también utiliza una fuente basada en cobalto 60 (^{60}Co). A diferencia del irradiador con cámara de irradiación blindada, dicha fuente permanece en el fondo de la piscina con agua. El producto a irradiarse se deposita dentro de contenedores herméticos que se introducen hasta el fondo de esta piscina junto a la fuente (Fairand, 2002).

2.3.5.3 Mecanismo de entrecruzamiento en solución acuosa.

Los polímeros se pueden entrecruzar al irradiarlos en estado sólido o en solución acuosa pero cada uno muestra un mecanismo diferente.

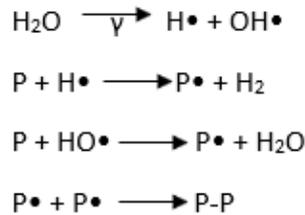
Se ha demostrado que cuando los polímeros en estado sólido se exponen a radiación ionizante ocurre uno de los siguientes dos efectos: El primero de ellos es que se produce la reticulación de las cadenas poliméricas, lo que conduce a un aumento en el peso molecular y eventualmente a dosis suficientemente altas a una red tridimensional. Por el contrario, el segundo efecto observado es que ocurre la degradación de las cadenas poliméricas, la cual se evidencia por la disminución del peso molecular.

No se ha reportado ningún patrón general para el comportamiento de los polímeros sólidos hacia la radiación ionizante (Miller, 1954). Sin embargo en este trabajo nos centraremos en el mecanismo de entrecruzamiento en solución acuosa que se describirá a continuación.

La reticulación de polímeros por irradiación y en solución acuosa muestra mejor eficiencia con respecto a la reticulación en estado sólido debido a que se forman más radicales.

El agua forma un papel importante en la reacción de reticulación debido a que absorbe gran cantidad de energía ionizante, conduciendo a la producción de radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), radical de hidrógeno ($\text{H}\cdot$), y otras especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), $e^-_{(\text{aq})}$, entre otras (Demeter, y otros, 2016).

Los radicales HO• y H• son las principales especies reactivas responsables de la formación de macroradicales. El esquema de la reacción se muestra a continuación:



Donde P: Representa la molécula polimérica (Sakurada & Ikada, 1964).

Se han elucidado algunos mecanismos de entrecruzamiento de polímeros por radiación gamma, por ejemplo (Leyva Gómez, y otros, 2018), propusieron el siguiente mecanismo de entrecruzamiento por radiación gamma en solución acuosa.

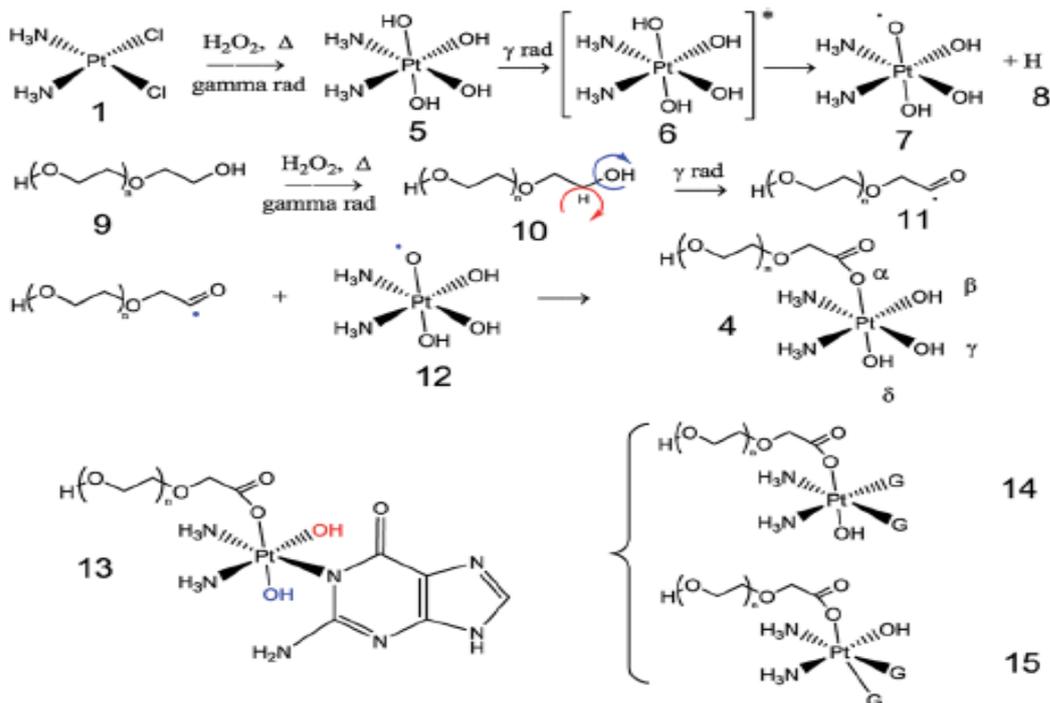


Figura 8. Mecanismo de entrecruzamiento de cis-platino y PEG en solución acuosa mediante irradiación gamma. En este mecanismo se observa la formación de radicales libres de PEG y cis-platino debido a la radiación gamma. Además se muestra la reacción que ocurre entre ellos y como consecuencia se forman nuevos enlaces covalentes produciendo nuevas especies químicas (Leyva Gómez, y otros, 2018).

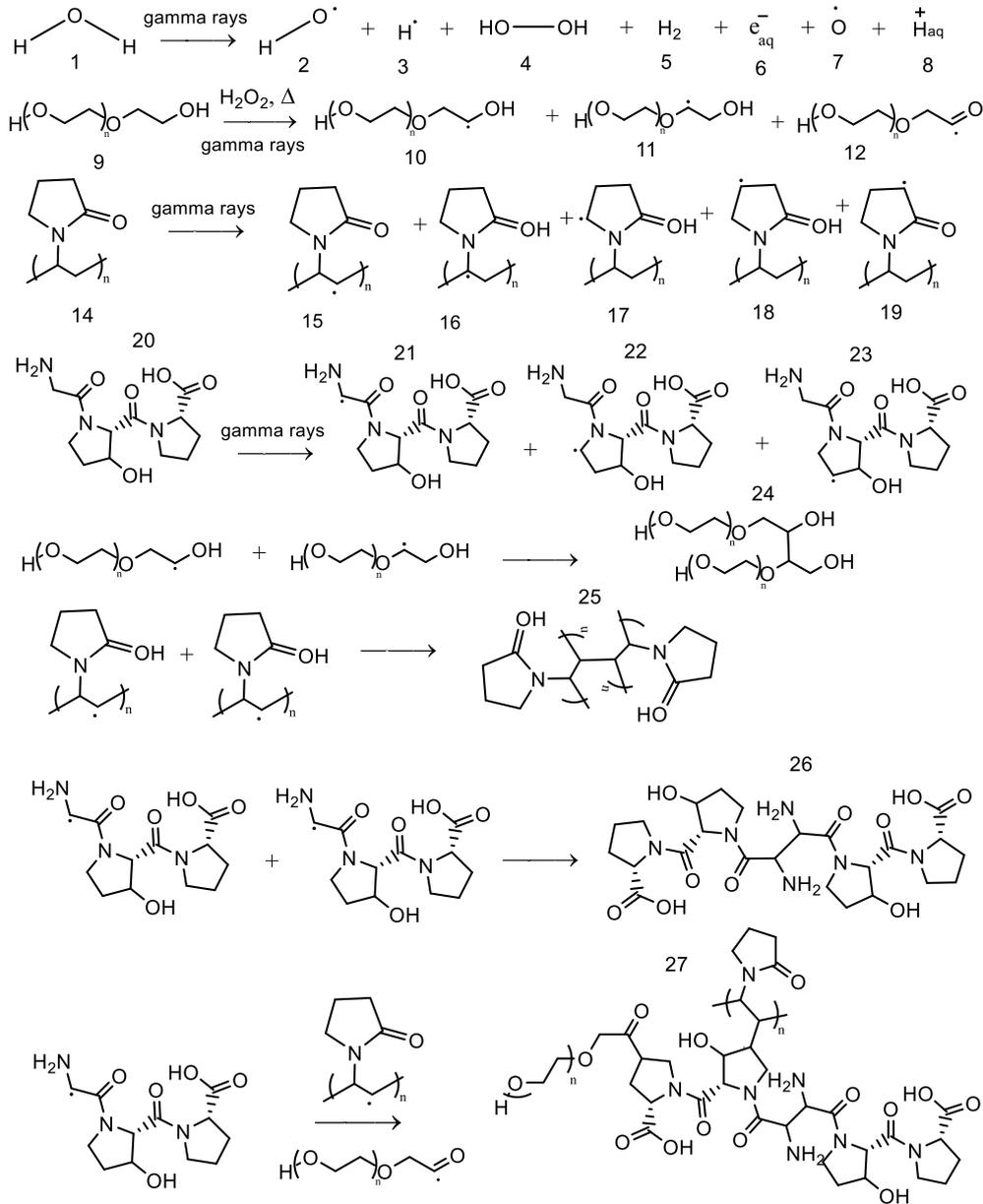


Figura 9. Mecanismo de entrecruzamiento de colágena-PVP-PEG en solución acuosa por irradiación gamma. El mecanismo ilustra como el agua absorbe la radiación gamma produciendo peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno que reaccionan con los polímeros y generan nuevos radicales poliméricos, los cuales se pueden combinar entre sí o reaccionar con otro radical diferente produciendo al final un entrecruzamiento entre los polímeros (González Torres, y otros, 2018).

Con relación a lo anterior, para comprobar que hay cambios en la estructura polimérica, se debe realizar algunas pruebas de caracterización fisicoquímica.

2.4 Pruebas de caracterización fisicoquímica en polímeros.

Existen numerosas técnicas para la caracterización fisicoquímica de diversos materiales, sin embargo nos enfocaremos principalmente en: microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

2.4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

El microscopio electrónico de barrido, es un instrumento que crea imágenes ampliadas que revelan información a escala microscópica sobre la morfología, composición, cristalografía y otras propiedades físicas y químicas de una muestra (Goldstein, y otros, 2018).

El principio de funcionamiento básico de la SEM implica la creación de un haz de electrones energéticos finamente enfocado mediante la emisión de una fuente de electrones. Después de la emisión de la fuente y la aceleración a alta energía, el haz de electrones se modifica mediante apertura de lentes magnéticas y/o electrostáticas y bobinas que actúan para reducir sucesivamente el diámetro del haz, para colocarlo secuencialmente en una serie de ubicaciones discretas en la muestra. En cada una de estas ubicaciones discretas en el patrón de exploración, la interacción del haz de electrones con la muestra produce dos tipos de electrones salientes: Los primeros son conocidos como “electrones retro dispersados” (EEB), que son electrones que emergen de la muestra con una gran parte de su energía incidente intacta después de experimentar la dispersión y desviación debido a los campos eléctricos de los átomos presentes en la muestra. Al segundo tipo se les llama “electrones secundarios” (SE), que son electrones que escapan de la superficie de la muestra debido a que los electrones del haz los expulsan de los átomos presentes en la muestra. En cada ubicación del haz, estas señales electrónicas salientes se miden utilizando uno o más detectores de electrones, la señal medida en cada ubicación de escaneo de la muestra se digitaliza y registra en la memoria de la computadora y se usa

posteriormente para formar un único elemento de imagen (Goldstein, y otros, 2018).

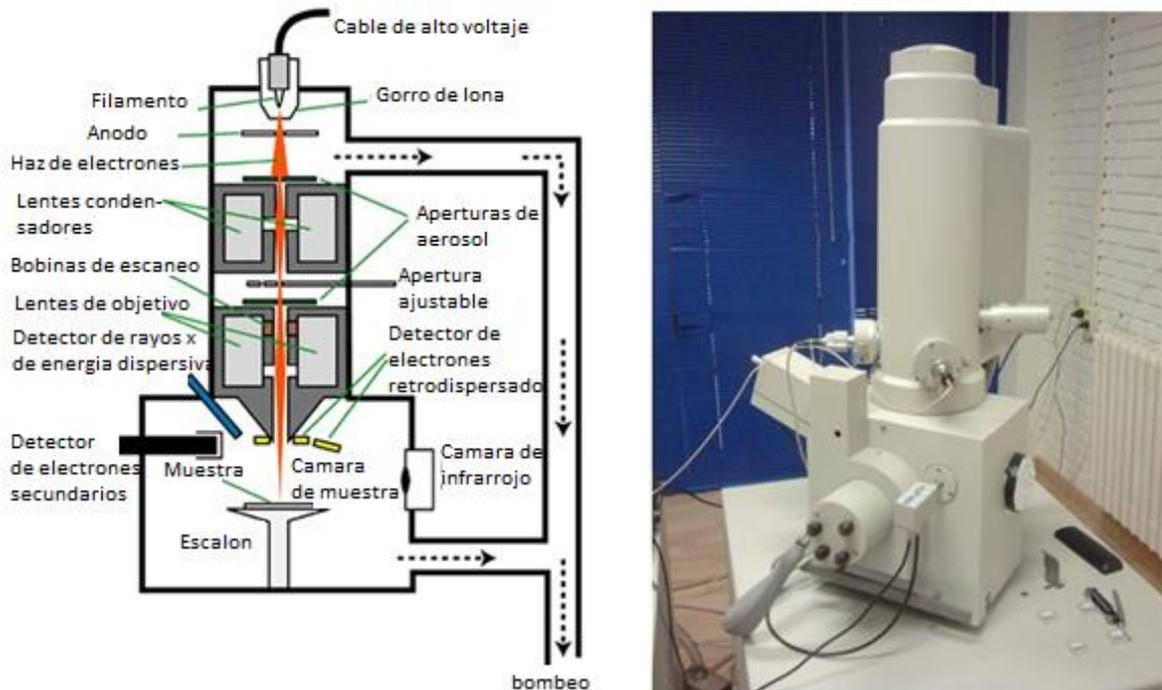


Figura 10. Instrumentación de un equipo de SEM. Modificado de (SEM, 2018, disponible en: <https://dayinlab.com/2015/03/22/burj-khalifa-el-nanohilo/sem/>).

2.4.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia infrarroja es la interacción que tiene la energía infrarroja con la materia.

El análisis de los espectros de infrarrojo nos pueden proporcionar información acerca de las moléculas o grupos funcionales que están presentes en una muestra, así como la concentración en la que se encuentran (Smith, 2011).

La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre 12800-10 cm^{-1} y se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): 12800-4000 cm^{-1} , IR medio: 4000-400 cm^{-1} ; IR lejano: 400-10 cm^{-1} , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales (Smith, 2011).

En lo que respecta al IR medio, existen espectrómetros que incorporan el método de transformada de Fourier, son los conocidos FTIR's, que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos (Smith, 2011).

Los espectros obtenidos de las diferentes especies moleculares en el infrarrojo son producto de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros, entre los cuales hay pequeñas diferencias de energía. Dichas transiciones de energía producen cambios en el momento dipolar en la molécula (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

Las dos principales categorías de vibraciones son las de tensión y flexión (ver figura 11). Las vibraciones de tensión son aquellas en las que hay un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace pudiéndose extender o contraer, mientras que las vibraciones de flexión se caracterizan porque ocurre un cambio en el ángulo entre los dos enlaces, estos pueden ser de cuatro tipos: balanceo en plano, tijereo en plano, aleteo fuera del plano y torsión fuera del plano (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

La transformada de Fourier es una operación matemática para transformar señales entre el dominio tiempo y el dominio de la frecuencia, es decir que se obtiene un solo espectro de frecuencias para toda la función. En el espectrómetro de transformada de Fourier (ver figura 14), la codificación se consigue dividiendo la fuente en dos haces cuya longitud de trayectoria puede variar en forma periódica para dar patrones de interferencia. La mayoría de los instrumentos de infrarrojo de transformada de Fourier que hay en el mercado se basan en el interferómetro de Michelson (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

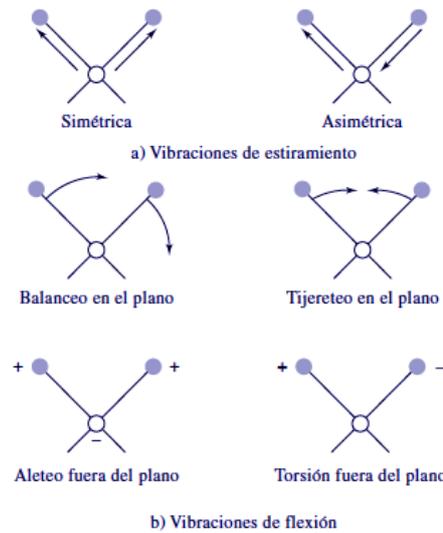


Figura 11. Diferentes tipos de vibraciones de tensión y flexión. Modificado de (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

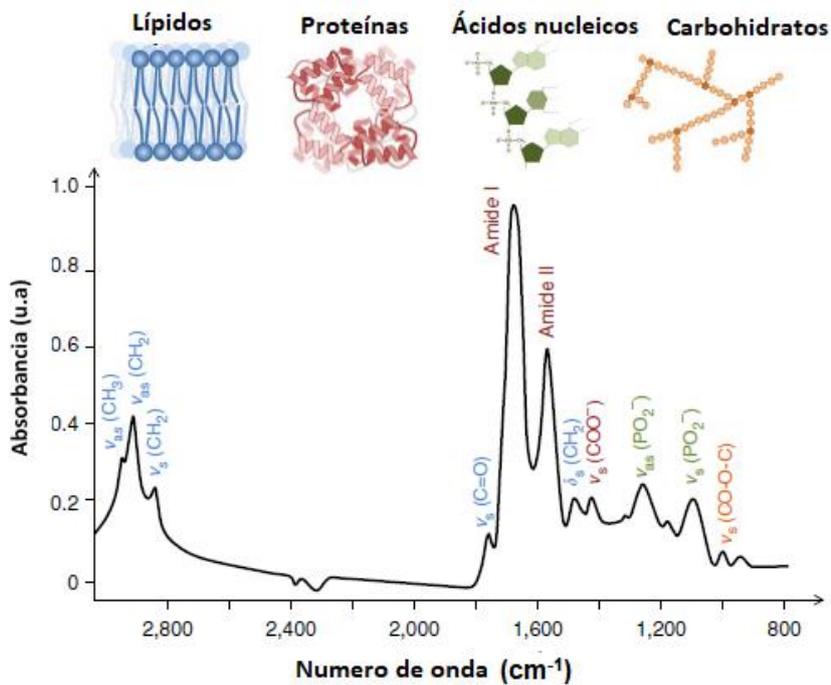


Figura 12. Asignación de bandas en un espectro de IR en materiales biológicos. Modificado de (Baker, y otros, 2014).

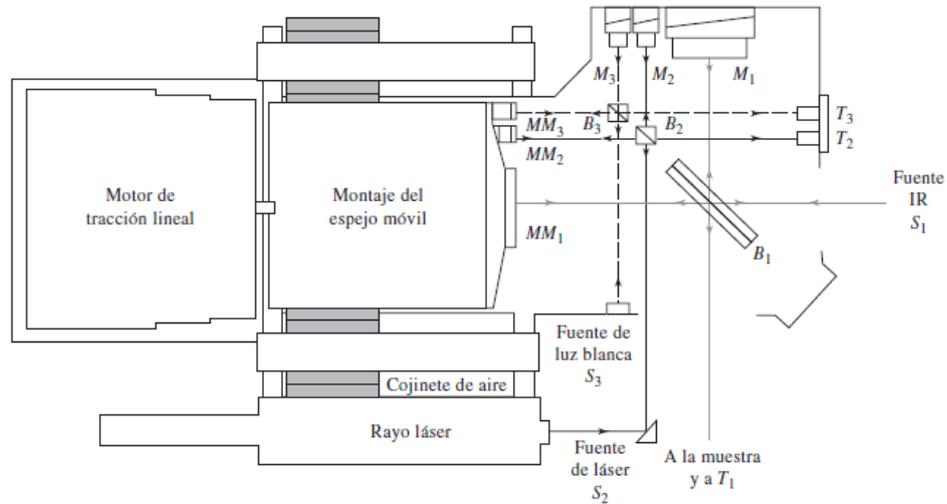


Figura 13. Esquema de interferómetros en un espectrómetro FTIR. (Los subíndices 1 indican la trayectoria de la radiación en el interferómetro de infrarrojo. Los subíndices 2 y 3 se refieren a los interferómetros de láser y de luz blanca respectivamente) Tomado de (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

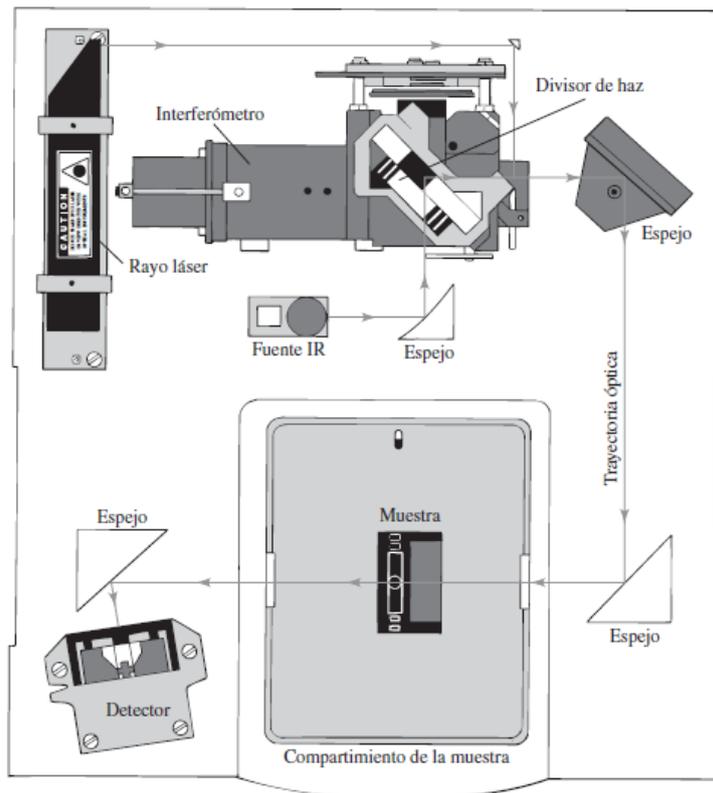


Figura 14. Diagrama de un espectrómetro básico FTIR. Tomado de (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

2.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es la técnica termoanalítica más empleada debido a que permite estudiar procesos en los que existen una variación en capacidad calorífica (C_p), donde se presentan transiciones de primer y segundo orden (Venegas Vásconez, 2017), lo cual nos sirve para determinar temperaturas de fusión, grado de cristalización de algunos materiales y temperatura de transición vítrea (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

La DSC, es una técnica que analiza el cambio de la capacidad calorífica de un material con respecto a la temperatura. Una muestra de masa conocida es calentada o enfriada y los cambios en su capacidad calorífica se monitorean como cambios en el flujo de calor. Los datos se obtienen como entradas diferenciales de calor en función de la temperatura (Venegas Vásconez, 2017).

Existen dos mecanismos de operación de DSC:

DSC de flujo térmico: Aquí la muestra y un material de referencia se calientan a una velocidad lineal en un mismo horno y el calor se transfiere a la muestra y referencia a través de un disco termoeléctrico (Venegas Vásconez, 2017).

DSC compensando en potencia: En esta técnica, la muestra y el material de referencia se colocan en hornos separados. Sin embargo se mantienen a la misma temperatura y se mide la diferencia de potencia térmica requerida para mantenerlas a la misma temperatura y se traza en función de la temperatura (Venegas Vásconez, 2017).

Cada una genera una gráfica de potencia o flujo de calor contra temperatura, que se denomina *termograma*.

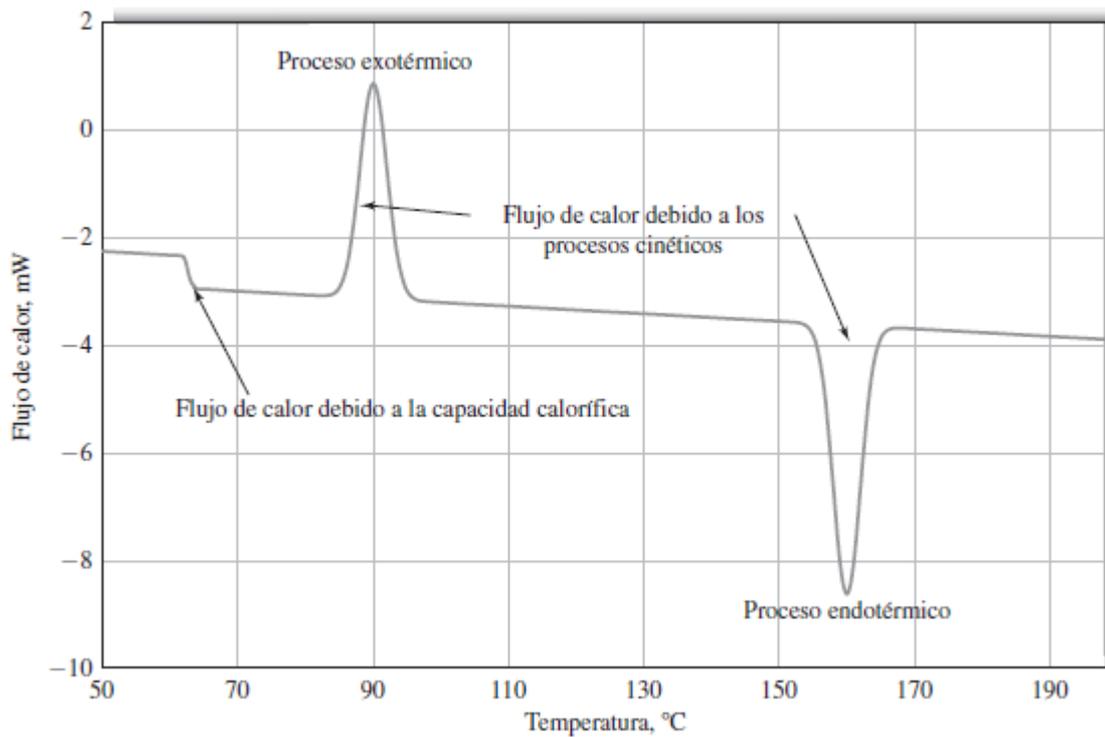


Figura 15. Se muestra un termograma el cual describe el barrido característico para un material polimérico, en donde se observan etapas de transición y fenómenos endotérmicos y exotérmicos Tomado de (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

2.4.4 Análisis termogravimétrico (TGA).

En un análisis termogravimétrico se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo en que aumenta su temperatura. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

En la figura 16 se observa el ejemplo de un termograma de algunos materiales poliméricos comunes y las condiciones en las que se realizó el análisis.

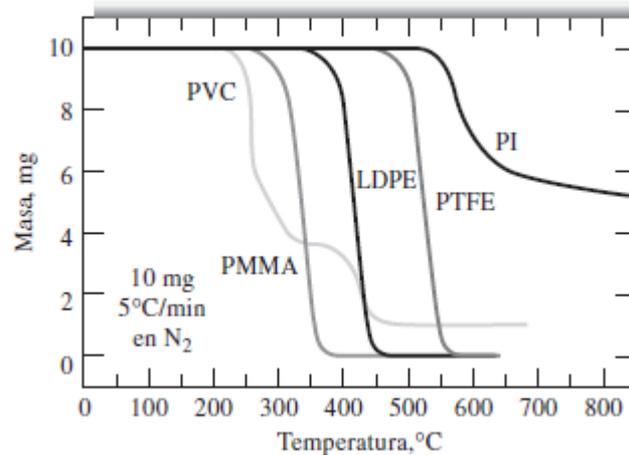


Figura 16. Termogramas de algunos polímeros comunes. (PVC = Policloruro de vinilo; PMMA = Metacrilato de polimetilo; LDPE = Polietileno de baja densidad; PTFE= Politetrafluoroetileno; PI = Polipiromelitimida aromática (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

En el presente trabajo los polímeros empleados para la obtención del nuevo biopolímero fueron la elastina y la polivinilpirrolidona, por lo cual en la siguiente sección se describirá cada uno de estos polímeros y se mencionará el papel que desempeñan en el proceso de cicatrización de heridas y su uso como biomateriales.

2.5 Elastina.

La elastina (ELT) es una proteína clave en la matriz extracelular que es fundamental para la elasticidad y resistencia de muchos tejidos, incluyendo arterias, pulmones, ligamentos, tendones, cartílago y piel (Mithieux & Weiss, 2006).

La ELT humana se sintetiza a partir de moléculas de tropoelastina reticuladas que se combinan con microfibrillas para formar fibras elásticas. La tropoelastina es un precursor soluble con un peso molecular de 72 KDa (Almine, Wise, & Weiss, 2012), se expresa y se secreta por células de músculo liso, células endoteliales, fibroblastos y condrocitos (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

La ELT tiene una composición de aproximadamente un 75% de residuos hidrófobos (Glicina (Gly), Valina (Val), Alanina (Ala)). Por otro lado la molécula de tropoelastina consiste típicamente en dos tipos de dominios codificados por exones separados: dominios hidrófobos con muchos residuos de Gly, Val, Ala y prolina (Pro), que a menudo ocurren en repeticiones de varios aminoácidos, como Gly-Val-Gly-Val-Pro, Gly-Val-Pro-Gly-Val y Gly-Val-Gly Val-Ala-Pro y dominios hidrofílicos con muchos residuos de lisina (Lys) y Ala que son importantes en la reticulación (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

Los residuos de lisina (Lys) a menudo se intercalan entre los residuos de Ala (Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Ala), y son importantes en la formación de enlaces cruzados tetrafuncionales. Cuatro residuos de Lys de dos moléculas de tropoelastina reaccionan entre sí para formar desmosina e isodesmosina (ver figura 17) (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

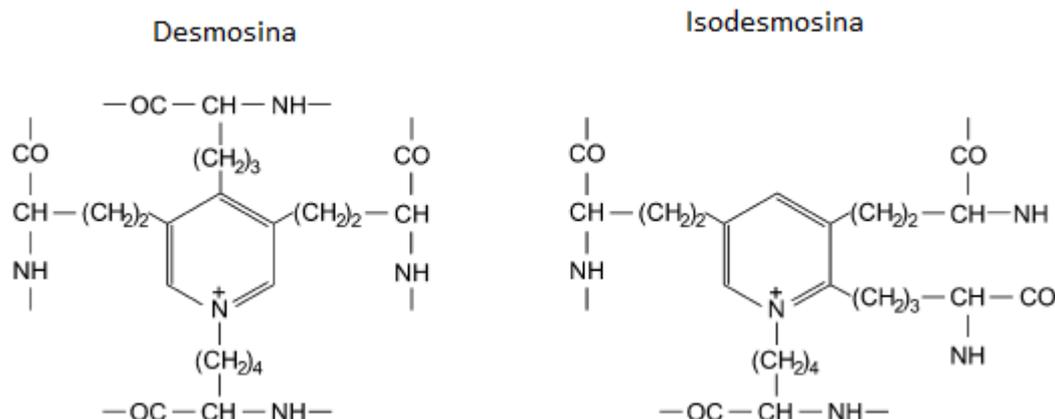


Figura 17. Estructura química de la Desmosina e Isodesmosina. Tomado de (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

2.5.1 Elastogénesis.

La formación de fibras de ELT *in vivo* requiere la coordinación de varios procesos importantes. Estos incluyen el control de la transcripción intracelular y la traducción de tropoelastina, el procesamiento intracelular de la proteína, la secreción de la proteína en el espacio extracelular, el suministro de monómeros

de tropoelastina a sitios de elastogénesis, la alineación de los monómeros con tropoelastina y finalmente la conversión al polímero de elastina a través de la acción de reticulación de la lisil oxidasa (Mithieux & Weiss, 2006).

2.5.1.1 Gen de ELT.

El gen humano que codifica para tropoelastina se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q11.2). Esta secuencia codifica un mRNA de 3.5 kb que consiste en un segmento de codificación de 2.2 kb y una región no traducida de 1.3 Kb relativamente grande (Debelle, 1999).

2.5.1.2 Regulación de la expresión de ELT.

La elastogénesis ocurre principalmente durante los períodos fetales tardíos y neonatales tempranos. Una vez que se ha depositado la ELT, su síntesis cesa y se observa muy poca rotación de ELT durante la vida adulta, a menos que las fibras elásticas estén sujetas a lesiones.

Los factores exógenos que alteran la transcripción de ELT incluyen miembros de la familia del factor nuclear-1, factor de crecimiento similar a la insulina-1, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de necrosis tumoral, interleucina 1 beta e interleucina 10 (Debelle, 1999).

2.5.1.3 Secreción.

Después de que ocurre un procesamiento por splicing donde se eliminan las regiones no codificantes, el mRNA maduro de tropoelastina se exporta desde el núcleo. La traducción ocurre en la superficie del retículo endoplásmico rugoso (ERR), que forma un polipéptido de 70 KDa, con una secuencia señal de 26 aminoácidos, que se escinde a medida que la proteína ingresa en el lumen del ERR. Después de la liberación del péptido señal, la proteína viaja a través del lumen y es transportada al aparato de Golgi y es excretada (Mithieux & Weiss, 2006).

2.5.1.4 Incorporación de tropoelastina en la fibra elástica.

Una vez secretada la elastina, es posible que una proteína de unión a elastina (EBP), administra tropoelastina al sitio de la estructura de la fibra en el andamio microfibrilar. La unión de los galactoazucres microfibrilares a la EBP da como resultado la liberación de tropoelastina. Aquí interactúa con las microfibrillas, que alinean los monómeros de tropoelastina, para la posterior formación de la fibra elástica. La formación de un enlace cruzado transglutaminasa específico entre fibrilina-1 y tropoelastina puede actuar para estabilizar covalentemente la tropoelastina recién depositada en las microfibrillas. La región C-terminal de la tropoelastina desempeña un papel fundamental en la deposición ordenada del monómero en el polímero de elastina en crecimiento (Mithieux & Weiss, 2006).

Los dos procesos principales requeridos para la incorporación de tropoelastina en la fibra elástica en crecimiento son la coacervación y la reticulación.

2.5.1.5 Coacervación.

Para que las moléculas de tropoelastina se reticulen primero deben asociarse y alinearse para facilitar la generación de enlaces cruzados entre lisinas estrechamente espaciadas. Se propone que la coacervación sea el mecanismo molecular a través del cual puede ocurrir la alineación y la concentración.

La coacervación se refiere a una transición adversa de la temperatura por la cual las moléculas de tropoelastina se agregan a medida que aumenta la temperatura. Es un proceso reversible impulsado por la vía entrópica que involucra interacciones entre los dominios hidrófobos de la tropoelastina (ver figura 18) (Debelle, 1999).

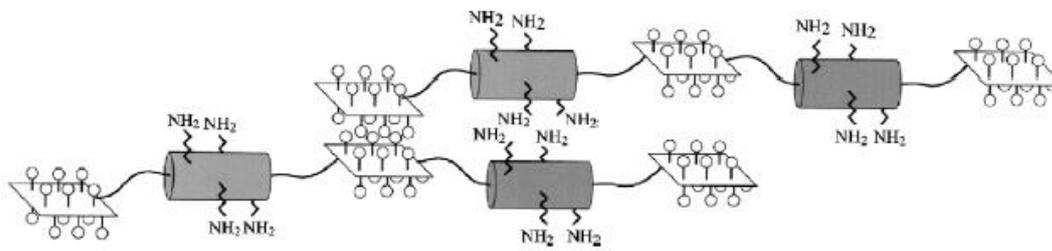


Figura 18. Alineación de péptidos de tropoelastina durante la coacervación. Los dominios hidrófobos (estructuras planas cuadradas) de dos moléculas interactúan entre sí mediante cadenas laterales hidrófobas (estructuras esféricas) y por lo tanto, permiten la alineación de los dominios de reticulación (cilindros) con sus pares de residuos de lisina. Tomado de (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

2.5.1.6 Entrecruzamiento.

Las moléculas de tropoelastina se reticulan en el espacio extracelular a través de la acción de la amina oxidasa dependiente de cobre, la “lisil oxidasa”. La lisil oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de los grupos α amino en los residuos de lisina dentro de la tropoelastina para formar el α aminoadípico- δ semialdehído (Mithieux & Weiss, 2006).

La alisina es el precursor reactivo de una variedad de enlaces cruzados inter e intramoleculares que se encuentran en la ELT. Estas reticulaciones se forman por condensación espontánea no enzimática de alisina con otra alisina o residuos de lisilo no modificados. La reticulación es esencial para la integridad estructural y la función de la ELT. Hay varios tipos de enlaces cruzados, los cuales incluyen, enlaces cruzados bifuncionales alisina-aldol y lisino-leucina, el enlace mutuo trifuncional merodesmosina y los enlaces entrecruzados tetra funcionales desmosina e isodesmosina (Debelle, 1999).

2.5.2 Propiedades de ELT.

2.5.2.1 Propiedades biofísicas.

La elasticidad, transición vítrea y la coacervación son una serie de propiedades cruciales para el papel biomecánico y fisiológico de la elastina en el cuerpo.

Con respecto a la elasticidad, el módulo de Young es aquel que proporciona una medida de la elasticidad o rigidez de un material, cuanto mayor sea el módulo de Young, mayor rigidez presentara el material. El módulo se determina a partir de la pendiente de una curva de tensión/deformación. El módulo de Young para fibras de ELT es de 300-600 kPa, mientras que el de la colágena es de 1×10^6 kPa (Mithieux & Weiss, 2006).

La temperatura de transición vítrea (T_g) es una característica importante de los polímeros. Por debajo de la T_g , un polímero generalmente se comportará como un material rígido/quebradizo, mientras que por encima de la T_g , el polímero se comportará como un elastómero o un fluido viscoso. La ELT experimenta una transición vítrea en un intervalo de temperatura que depende de su contenido de agua, en estado deshidratado la T_g de la ELT es de 200 °C, mientras que al estar 30% hidratada la T_g disminuye a 30°C (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

Por otra parte la coacervación en materiales basados en ELT, al aumentar la temperatura se forman agregados o estructuras ordenadas como resultado de las interacciones de los dominios hidrofóbicos (Debelle, 1999).

2.5.2.2 Aplicaciones de la ELT como biomaterial.

La necesidad de un comportamiento elástico en el remplazo de muchos tejidos, y las diversas propiedades biológicas que tiene la ELT, han llevado a un mayor interés en el desarrollo de materiales a base de ELT, tales como hidrogeles, prótesis para paredes vasculares, matrices calcificables que podrían inducir la osificación en áreas donde se desea la formación de hueso, recubrimiento de injerto arterial para explotar el efecto anti-proliferativo en células de músculo liso, matrices para la formación in situ de tejido cartilaginoso y administración de fármacos dirigidos (Debelle, 1999).

Por otro lado la ELT también es muy usada en autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Algunos ejemplos conocidos son: autoinjertos de piel para heridas por quemaduras, venas safenas autólogas, aloinjertos de vena umbilical, para

cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria y xenoinjertos de válvula cardíaca aórtica. (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

En la tabla 11 se presentan las diversas formas de ELT natural y sintética.

Recientemente se encontró que una digestión proteolítica de ELT indujo la deposición de fibras elásticas. Se encontró un aumento de la síntesis de fibras elásticas cuando se inyectaron fibroblastos dérmicos estimulados en la piel de ratones (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

También se ha estudiado la aplicación de ELT y de diversos péptidos en ingeniería de tejido ocular. En este estudio los péptido ELT se han adsorbido a las superficies de vidrio y se ha demostrado que promueven la unión de las células epiteliales y la proliferación (Nettles, Chilkoti, & Setton, 2010). Debido a estos atributos, la ELT tiene un alto potencial en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa para la reparación de cartílago, tejido de disco intervertebral, injertos vasculares de pequeño diámetro, vejigas urinarias, matrices de células madre, guías neurales, tratamiento de heridas posquirúrgicas y generación de células madre. Además, los bloques multiméricos de ELT con diversos dominios de unión a integrina han demostrado ser prometedores como una matriz extracelular artificial (ECM). Por lo cual es un biomaterial importante en la ingeniería de tejidos (Simnick, 2007).

2.5.3 El papel de la elastina en el proceso de reparación de heridas.

Al momento de producirse una lesión se generan fragmentos de ELT. Estos fragmentos se liberan en la ECM y pueden inducir respuestas biológicas en las células a través de su papel como ligandos biológicamente activos. Sin embargo a pesar del aumento en la expresión de la ELT al inicio de la lesión, la producción de monómeros de ELT es pobre durante la cicatrización de la herida, y las fibras obtenidas se organizan de manera aberrante y sin ningún tipo de orden. Esta falta de orden contribuye a la formación de una red de fibra elástica interrumpida que conduce a reducir la elasticidad y la resistencia de la cicatriz madura (Rodríguez Cabello, 2018). La presencia vital de ELT en la cicatrización de heridas se extiende más allá de una base mecánica, ya que se ha demostrado

que su influencia en las células atenúa la contracción de la herida y mejora la regeneración dérmica. La ELT realiza múltiples funciones durante la cicatrización de heridas en virtud de sus propiedades mecánicas y de señalización (Almine, Wise, & Weiss, 2012).

Por lo tanto, la restauración de una red de fibra elástica intacta y funcional es fundamental para recuperar la función completa de la piel después de una lesión.

2.5.3.1 Señalización celular inducida por ELT.

La tropoelastina es compatible con la adhesión de varios tipos de células, incluidos los fibroblastos, las células del músculo liso vascular, las células endoteliales y los condrocitos (Rodríguez Cabello, 2018).

Los péptidos de tropoelastina y ELT modulan el comportamiento celular, para provocar respuestas biológicas. Estas respuestas biológicas incluyen: quimiotaxis de monocitos, migración de fibroblastos, proliferación y la producción de proteasas. En particular, la migración de fibroblastos, la proliferación y la expresión de MMP-1 son inducidos por la ELT (Rodríguez Cabello, 2018).

Estas funciones son importantes para las fases de la cicatrización de heridas, ya que la integridad estructural del sitio de la herida se restablece a través de la secreción y la remodelación de componentes de la ECM (Almine, Wise, & Weiss, 2012).

Si bien la ELT no está presente en la epidermis, algunos estudios *in vitro* han demostrado que la ELT influye en la actividad de los queratinocitos al promover la migración y la diferenciación terminal (Almine, Wise, & Weiss, 2012).

También se demostró que la ELT influye en la angiogénesis al mejorar la migración endotelial y la expresión del tipo de membrana MMP-1 (MT1-MMP). Asimismo la ELT es una molécula de ECM multifactorial, que produce funciones proreparativas en diferentes tipos celulares cruciales para la cicatrización cutánea de heridas (Rnjak, Wise, Mithieux, & Weiss, 2011).

Tabla 11. Formas de elastina de origen natural y sintético. Modificado de (Daame, Veerkamp, Van Hest, & Van Kuppevelt, 2007).

Categorías	Subtipo	Método de preparación	Masa molecular
<i>ELT Natural</i>			
Tejido descelularizado		Diversas extracciones químicas	Muy alto
ELT insoluble		Diversas extracciones químicas	Muy alto
Tropoelastina		Diversas extracciones químicas	72 kDa
ELT hidrolizada		Diversas extracciones químicas	60 kDa
	α	Solubilización en ácido oxálico	3-10 kDa
	β	Solubilización en ácido oxálico	70 kDa
	κ	Solubilización en KOH	25 kDa
	PSP	Solubilización en pepsina	25 kDa
	ASP	Solubilización en ácido	
	ESP	Solubilización en elastasa	
<i>Elastina Biosintética</i>			
Tropoelastina		Recombinante (<i>E.coli</i>)	72 kDa
Fragmentos de tropoelastina		Recombinante (<i>E.coli</i>)	3-31 kDa
Polipéptidos similares a la ELT		Síntesis química o recombinante (<i>E. coli</i>)	Dependiendo de la longitud del péptido y las repeticiones.
Híbridos con otras moléculas	Elastina-fibronectina	Recombinante (<i>E.coli</i>)	↓
	Seda-elastina	Recombinante (<i>E.coli</i> o plantas)	

2.6 Polivinilpirrolidona.

La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero sintético que se obtiene a partir del monómero N-vinilpirrolidona por polimerización vinílica mediante radicales libres (ver Figura 20), tiene una buena biocompatibilidad y durante muchos años se ha aplicado como un biomaterial o aditivo a las composiciones de medicamentos (Zhao, Xu, Mitomo, & Yoshii, 2006).

2.6.1 Características y propiedades físicas, químicas y biológicas.

La estructura química del PVP (ver figura 19), consta esencialmente de grupos lineales 1-vinil-2-pirrolidona. Se caracteriza por su viscosidad en soluciones acuosas, relacionados con el agua, expresados como un valor de K, con un intervalo entre 10 y 120 (Ver tabla 12). El valor K se calcula utilizando la secuencia de Fikentscher (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

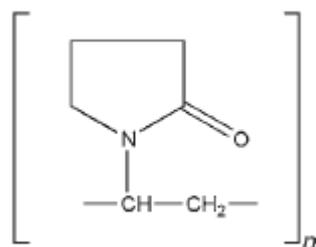


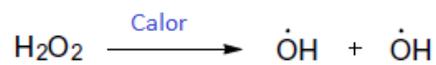
Figura 19. Estructura química de la polivinilpirrolidona (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

A mayor valor de K presentara más viscosidad en solución acuosa. El PVP es soluble en agua y otros solventes polares. Una vez seco es un polvo escamoso claro, que absorbe fácilmente hasta un 40% de su peso en agua de la atmósfera. En solución tiene excelentes propiedades humectantes y forma fácilmente películas. Su densidad es de 1,2 g/cm³ y su punto de fusión es 150-180°C ("Tecnología de plásticos", 2012).

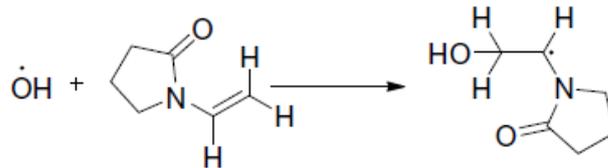
Tabla 12. Diferentes grados y pesos moleculares de la polivinilpirrolidona. Modificado de (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

Valor de K	Peso Molecular aproximado (Da)
12	2500
15	8000
17	10000
25	30000
30	50000
60	400000
90	1000000
120	3000000

Paso 1



Paso 2



Paso 3

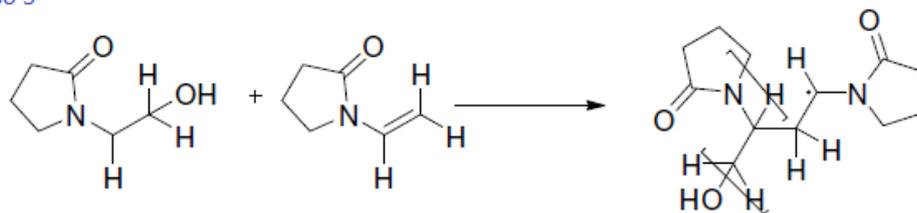


Figura 20. Síntesis de PVP por reacción de polimerización mediante radicales. Modificado de (Awasthi, y otros, 2018).

En cuanto a sus propiedades biológicas el PVP es un polímero biodegradable y biocompatible que se ha empleado con anterioridad en membranas para sustitutos de la piel debido a su baja toxicidad, buena transmisión de vapor de agua e impermeabilidad para bacterias (Elbadawy A., Kenawy, & Xin, 2017).

2.6.2 Aplicaciones.

El PVP tiene una numerosa cantidad de aplicaciones tanto en la industria farmacéutica y cosmética, por ejemplo: en la segunda guerra mundial se empleó como expansor del plasma sanguíneo (Zhao, Xu, Mitomo, & Yoshii, 2006), también se utiliza como aglutinante en la elaboración de comprimidos por vía húmeda, así como agente solubilizante en formulaciones orales y parenterales, además se puede usar como agentes de recubrimiento. Otras de las aplicaciones del PVP es en productos de cuidado personal, tales como champús, gel fijador de cabello, crema dental, etc. (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

En el área biomédica el PVP es empleado en la elaboración de andamios para la reparación de la piel en formulaciones de hidrogel en combinación con otros polímeros.

Pero también tiene gran cantidad de aplicaciones técnicas, como adhesivo en barra de pegamento, como un aditivo especial para baterías eléctricas, cerámicas, fibra de vidrio, tintas, como un fotoprotector de tubos de rayos catódicos, para la producción de membranas, como filtros de diálisis y de purificación de agua, como aditivo para extracción de RNA y en análisis Western blot se suele utilizar como agente de bloqueó ("Tecnología de plásticos", 2012).

CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La atención de heridas agudas y crónicas es un problema de salud pública ya que representa un elevado costo económico para las unidades médicas de la Secretaria de Salud, debido a que se requiere de la formación y contratación de recursos humanos especializados en el cuidado de heridas, la adquisición de insumos de alta tecnología, etc. Además de que la prevalencia de heridas es y seguirá siendo elevada debido a que estas se pueden derivar de enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, oncológicas entre otras (Vela Anaya, Stegensek Mejía, & Leija Hernández, 2018).

De acuerdo con el estudio de (Vela Anaya, Stegensek Mejía, & Leija Hernández, 2018), la incidencia por tipo de herida en la población mexicana es la siguiente: heridas traumáticas 27.5%, úlceras de pie diabético 24.4%, lesiones por presión 16.0%, úlceras venosas 15.9%, dehiscencias quirúrgicas 8.3%, quemaduras 4.9%, heridas neoplásicas 1.8%, úlceras arteriales 0.6% y lesiones por incontinencia 0.6%, en dicho estudio también estiman el costo mensual que con lleva el tratamiento de cada tipo de herida (ver tabla 13), en este sentido hoy en día se buscan nuevas alternativas para el tratamiento de heridas que sean eficientes y de bajo costo.

Para brindar una atención oportuna y de vanguardia a los pacientes con heridas, se tienen como alternativas el tratamiento tradicional y avanzado. El tratamiento tradicional se caracteriza por el empleo de apósitos de baja absorción y algunos insumos tradicionales (ver tabla 14), los cuales requieren de cambios frecuentes, además tienden a adherirse en la herida y al retirarlos pueden dañarla y no generan un ambiente adecuado para que se lleve de manera adecuada el proceso de cicatrización. Por otro lado el abordaje avanzado se caracteriza por emplear apósitos que generan y mantienen un ambiente adecuado en el lecho de la herida (Vela Anaya, Stegensek Mejía, & Leija Hernández, 2018), es por esto que en el presente trabajo se busca elaborar un nuevo material polimérico, que cumpla con todas las características deseadas

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

para un apósito, además de que pueda representar una opción más costo-efectiva para promover la cicatrización de heridas.

Tabla 13. Estimación de los costos directos mensuales por tipo de herida. Modificado de (Vela Anaya, Stegensek Mejía, & Leija Hernández, 2018).

Tipo de herida	Costo mensual en MXN (atención ambulatoria)	Costo mensual en MXN (atención hospitalaria)
Heridas Traumáticas	17 520 599.65	389 975 080.76
Úlceras de pie diabético	11 029 189.80	398 388 469.99
Lesiones por presión	2 647 210.96	715 416 914.19
Úlceras vasculares	8 628 456.22	91 060 396.40
Dehiscencias quirúrgicas	2 552 137.03	148 373 352.92
Quemaduras	3 188 899.12	86 132 540.24
Heridas neoplásicas	996 577.99	34 777 682.38
Total	46 563 070.76	1 864 124 436.89

MXN= Pesos Mexicanos

Tabla 14. Insumos tradicionales utilizados en la curación de heridas. Modificado de (Vela Anaya, Stegensek Mejía, & Leija Hernández, 2018).

Insumos tradicionales	Media de cantidad por curación	Frecuencia de uso (%)
Gasa convencionales	13.9 (pieza)	95.3
Guantes	3.1 (pieza)	93.0
Cubre bocas	1.5 (pieza)	89.0
Jabón quirúrgico	34.5 (mL)	67.8
Tela adhesiva	16 (cm)	57.7
Agua inyectable	112.0 (cm)	53.2
Solución salina.	87.8 (mL)	48.7
Venda elástica	1.4 (pieza)	47.7
Desinfectante en spray	7.6 (disparos)	33.3
Tela transparente	17.2 (cm)	17.6
Agua oxigenada	29.1 (mL)	8.9
Apósito de algodón	1.8 (pieza)	8.1
Yodo povidona	30.7 (mL)	6.7
Clorhexidina	11.3 (mL)	4.4

CAPITULO IV. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Desarrollar un hidrogel a base de elastina y polivinilpirrolidona (ELT-PVP) mediante entrecruzamiento por irradiación gamma que tenga las propiedades fisicoquímicas y biológicas ideales para ser usado como andamio para la reparación de heridas.

Objetivos particulares.

1. Caracterizar el hidrogel mediante: microscopia electrónica de barrido, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico, para evidenciar los cambios producidos debido a la radiación.
2. Proponer el mecanismo de reacción que describa la reticulación de ELT y PVP mediante la irradiación gamma.
3. Determinar el comportamiento reológico del hidrogel para evaluar su desempeño en aplicaciones tópicas.
4. Evaluar la actividad biológica que posee el copolímero para acelerar el proceso de reparación de heridas mediante un ensayo de proliferación celular.
5. Demostrar que el copolímero no presenta efecto tóxico en el organismo mediante un ensayo de viabilidad celular y prueba de hemólisis.

CAPITULO V. HIPÓTESIS.

La irradiación de ELT y PVP en solución acuosa provocará la reticulación química de ambos polímeros, lo cual se verá reflejado en los resultados de las pruebas de caracterización fisicoquímica. Al mismo tiempo el hidrogel obtenido será biocompatible, tendrá propiedades reológicas adecuadas para aplicaciones tópicas y favorecerá la proliferación celular.

CAPITULO VI. METODOLOGÍA.

6.1 Equipos, materiales y reactivos empleados.

6.1.1 Equipos Empleados.

Balanza analítica “Precisa Gravimetrics AG, calorímetro “Q2000 V24.11”, campana de flujo laminar “VECO”, espectrómetro de infrarrojo “Alpha-FT-IR Bruker”, lector multimodal “Synergy”, liofilizadora “Labconco”, microscopio electrónico de barrido “BENCHTOP”; modelo (JCM6000), microscopio epifluorescente “Zeiss Axiovert”, potenciómetro PHS-3C, ultraturrax “IKA”; modelo (T18) y viscosímetro “Brookfield”; modelo (CAP2000).

6.1.2 Materiales Empleados.

Espátula de Cromo-Níquel, charolas de plástico para pesar, 2 frascos de vidrio de 250 mL, micropipeta 10-1000 µL “Dragon lab”, micropipeta 100-1000 µL “Dragon lab”, 1 probeta de 100 mL, tubos falcón de 15 mL, tubos eppendorf de 1.5 mL, vasos de Precipitados 50, 100 y 250 mL, parrilla con agitación magnética, y placas de 48 pocillos.

6.1.3 Reactivos Empleados.

Solución de elastina hidrolizada 0.5% m/v “Droguería Cosmopolita”, cristal violeta “ROTH”, estreptomicina “Gibco”, kit de viabilidad/citotoxicidad para células de mamíferos “ThermoFisher Scientific”, medio DMEM/F12 “ThermoFisher Scientific”, paraformaldehído (PFA 4% m/v) “Merck”, penicilina “Gibco”, polivinilpirrolidona K30 “BASF”, Suero Fetal Bovino (SFB 10% m/v) “Gibco”, tampón fosfato salino (PBS 1X) “Gibco”.

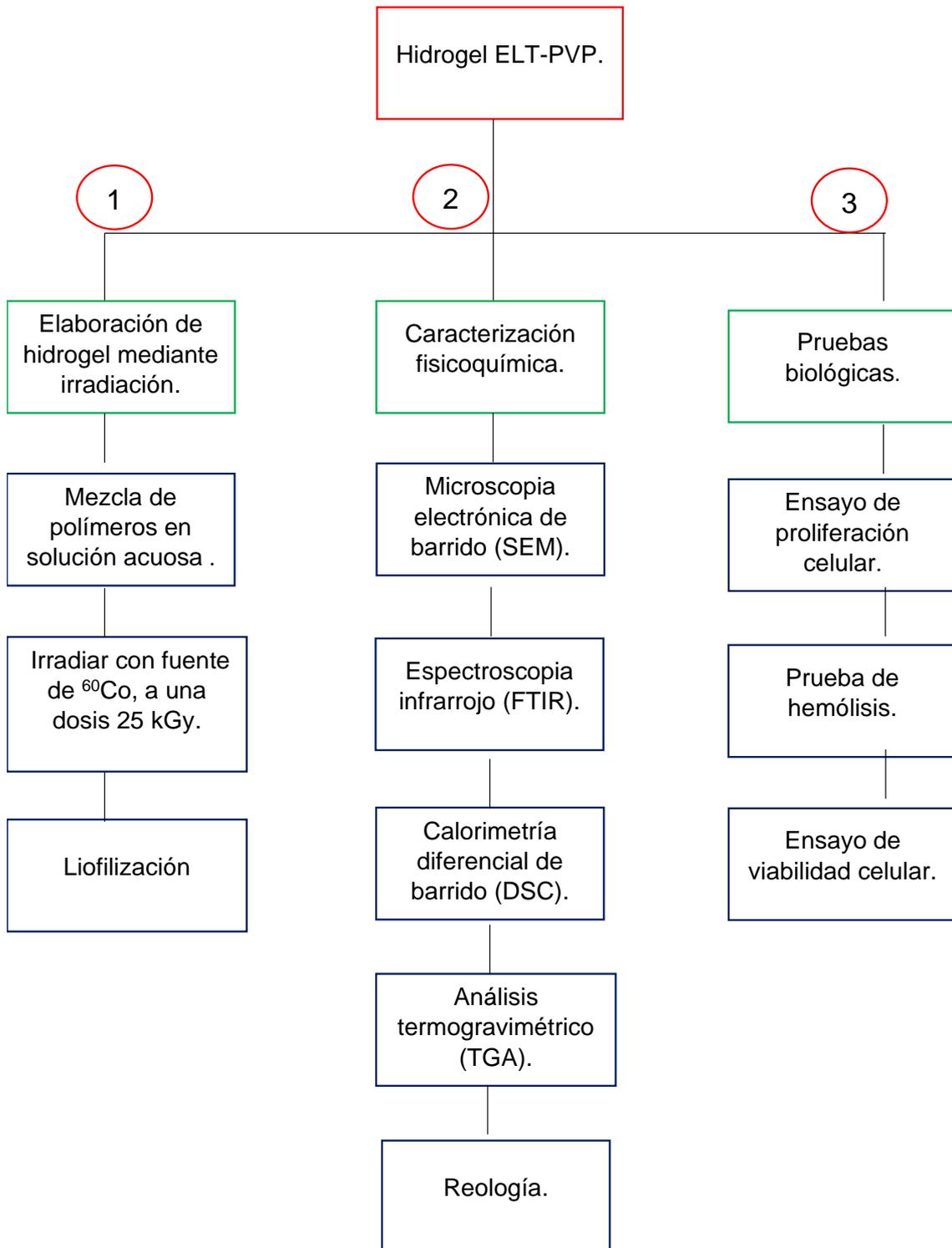


Figura 21. Diagrama general de la metodología experimental.

6.2. Preparación de hidrogel ELT-PVP mediante irradiación gamma.

Basándonos en el trabajo de (González Torres, y otros, 2018), se decidió manejar una relación (1:15) de ELT con respecto al PVP para la realización del hidrogel, debido a que en esta relación de concentraciones se obtuvieron resultados favorables en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de un andamio de colágena y PVP. El procedimiento empleado para la obtención del hidrogel ELT-PVP se muestra a continuación:

Se realizó una mezcla entre ELT hidrolizada en fracción alfa (70,000 Da, Droguería Cosmopolita, México) con PVP K-30 (8,000 Da, BASF, Ludwigshafen, Alemania), empleando una concentración de 0.5% m/v y 7.45% m/v de ELT y PVP respectivamente para obtener una concentración final de 7.95% m/v ELT-PVP. Posteriormente se sometió a irradiación empleando como fuente de irradiación ^{60}Co , en un radiador tipo piscina profunda Gammabeam 651PT a una dosis de 25 kGy. Para esto se han utilizado dosímetros de Fricke, acrílicos y películas de colorante radio cromático.

6.3 Liofilización de muestras.

Para los ensayos que requieren materiales en estado sólido, las muestras de ELT y copolímero (ELT-PVP) se liofilizaron. Para esto las muestras se congelaron entre 24 y 48 hrs, posteriormente se introdujeron en la liofilizadora (FreeZone 1, Labconco, Missouri, EE.UU.A) a una temperatura de -49°C y una presión de 0.06 mBar.

6.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Se empleó la SEM para determinar la morfología que presentan el nuevo copolímero, así como en las muestras de ELT, PVP y ELT+PVP manteniendo una relación (1:15), para esto se pesó aproximadamente 3 mg de cada una de las muestras y posteriormente se analizaron en un microscopio electrónico de barrido "BENCHTOP"; modelo (JCM6000). No se requirió de recubrimiento con oro con la finalidad de mejorar la conductividad eléctrica (las imágenes fueron obtenidas con alto y bajo vacío).

6.5 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Se empleó la FTIR para determinar los grupos funcionales presentes tanto en el nuevo copolímero como en las muestras de ELT, PVP, y ELT+PVP. La preparación de las muestras para el análisis fue similar al apartado 6.4. Se analizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo (Alpha-FT-IR Bruker). Las mediciones fueron realizadas por triplicado en un intervalo de 400 a 4,000 cm^{-1} y con una resolución de 2 cm^{-1} .

6.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La preparación de las muestras para el análisis DSC fue igual al que se empleó en el SEM (apartado 6.4). Las muestras se analizaron en un calorímetro Q2000 V24.11. El análisis se realizó en un intervalo de temperatura de 20°C a 350°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min y bajo atmosfera de nitrógeno.

6.7 Análisis termogravimétrico (TGA).

Las muestras utilizadas fueron obtenidas de la misma manera como se aborda en el apartado (6.4). El análisis TGA fue realizado en un calorímetro Q5000 V3.17. El intervalo de análisis fue de 0°C-800°C, usando una rampa de calentamiento de 10°C/min bajo atmosfera de nitrógeno.

6.8 Comportamiento reológico.

Para determinar los perfiles de viscosidad se utilizó un viscosímetro Brookfield CAP 2000 empleando la aguja número uno, con temperatura constante de 37°C y humedad controlada (véase en figura 22). El equipo fue calibrado con el estándar de calibración brookfield fluido 500.

El experimento de velocidad de corte se realizó de 1,600 a 8,000 s^{-1} y viceversa a intervalos de 1,600 s^{-1} . Los registros de viscosidad se realizaron después de girar durante veinte segundos a cada velocidad de corte. También se realizaron experimentos de velocidad de corte constante a 2,000 s^{-1} durante un tiempo de 1,800 s, el registro de viscosidad se realizó cada 120 s. Las

muestras analizadas fueron la mezcla ELT+PVP y el copolímero ELT-PVP. Cada muestra se analizó por triplicado en los respectivos experimentos.



Figura 22. Viscosímetro Brookfield CAP 2000 con control de humedad.

6.9 Ensayo de proliferación celular.

Para analizar el efecto biológico del copolímero sobre la proliferación celular, se realizó una curva de proliferación utilizando cristal violeta (CV) y fibroblastos dérmicos humanos. Se sembraron 2,500 fibroblastos en placas de cultivo de 48 pocillos y se incubaron con las siguientes condiciones experimentales: control (PBS, Gibco), 0,1, 0,15, 0,2 y 0,25% m/v de ELT o en su caso 0.1/1.5, 0.15/2.25, 0.2/3.0 y 0.25/3.75% m/v de ELT-PVP, en donde las relaciones de concentraciones del hidrogel ELT-PVP corresponden a la concentración de ELT y PVP respectivamente. Para cada día se sembró una

placa de cultivo con todas las condiciones experimentales, y se fijó una placa con PFA al 4% m/v (Sigma) durante 24 horas. Después de la fijación de la placa del tercer día, las células se lavaron con PBS 1X (Gibco) y se tiñeron con CV al 5% durante 15 minutos, posteriormente las células se lavaron diez veces con agua desionizada y los pocillos se secaron con papel de filtro. Se colocaron 200 μ L de metanol en los pocillos y se leyó el CV a una densidad óptica de 570 nm en un lector de placas (Synergy). Para obtener el número de células en el experimento, se desarrolló una curva estándar utilizando 2,500, 5,000, 10,000, 20,000 y 40,000 células por pozo.

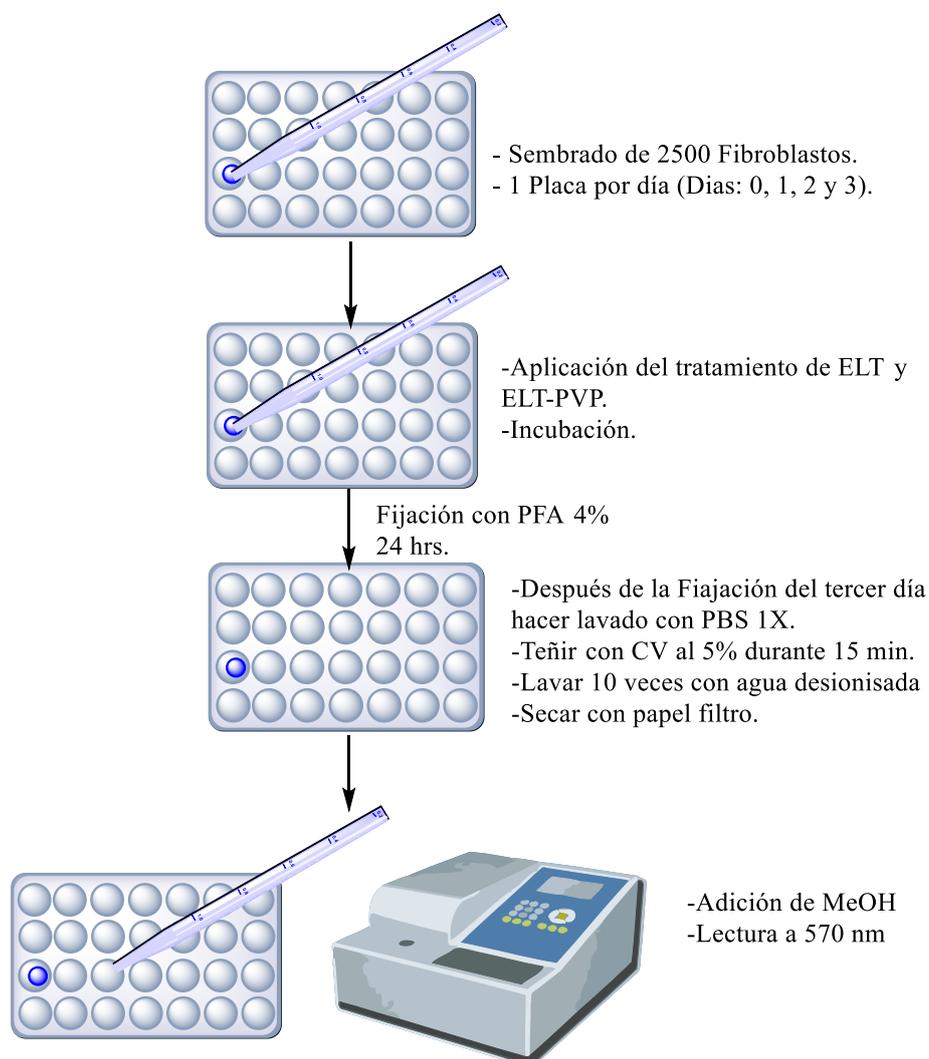


Figura 23. Esquema de metodología del ensayo de proliferación celular.

6.10 Prueba de hemólisis.

Con la finalidad de evaluar las interacciones tanto del nuevo copolímero como de los excipientes con la sangre humana, se realizó un ensayo de hemólisis de manera cualitativa, para esto se hicieron cuatro frotis, empleando una gota de sangre humana y una gota de los polímeros empleados (ELT, PVP, ELT+PVP y ELT-PVP) como se muestra en la figura 24. Posteriormente se realizó el extendido de la muestra sobre el portaobjetos y se observó en el microscopio óptico con un aumento 100X y aceite de inmersión.

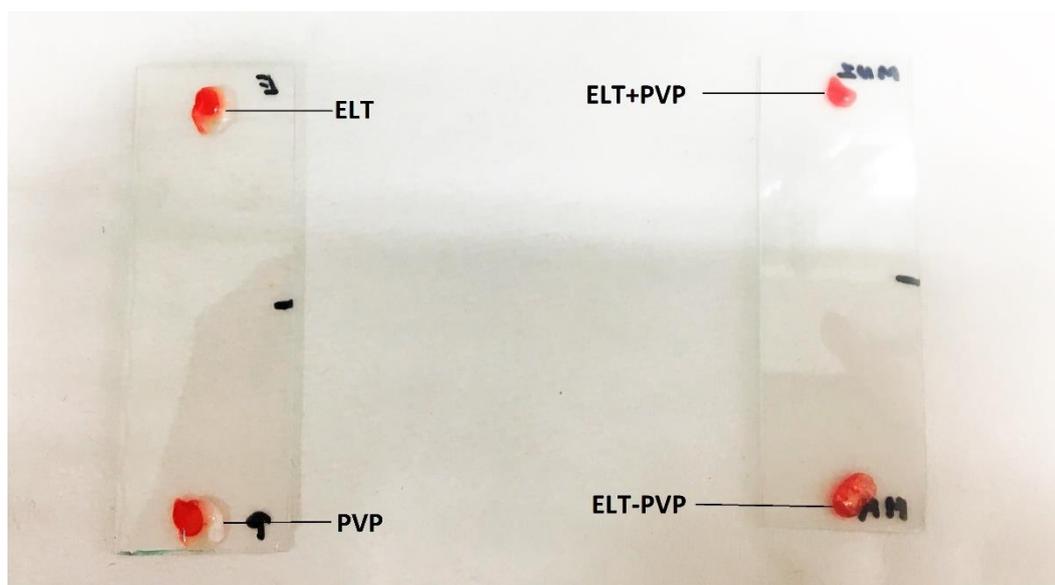


Figura 24. Preparación de frotis sanguíneo para prueba de hemólisis

6.11 Ensayo de viabilidad celular.

Se llevó a cabo un ensayo de acetoximetil diacetiléster de calceína (calceína-AM) y homodímero de etidio (EthD-1) en fibroblastos dérmicos humanos. Para este fin, se usó el kit de viabilidad/citotoxicidad para células de mamíferos (Thermo) y se siguió las especificaciones técnicas en la hoja de datos. Los fibroblastos se cultivaron con medio DMEM/F12 suplementado con 10% m/v de suero fetal bovino (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomina (Gibco). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Para el análisis, se cultivaron 10,000 células por pocillo en placas de cultivo de 48 pocillos y se trataron con las siguientes condiciones experimentales: control (PBS, Gibco), 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25% m/v de ELT; Otros tratamientos fueron: 0.1/1.5, 0.15/2.25, 0.2/3.0 y

0.25/3.75% m/v de ELT-PVP, en donde las relaciones de concentraciones del hidrogel ELT-PVP corresponden a la concentración de ELT y PVP presentes en el hidrogel respectivamente. Las células se incubaron con los tratamientos durante 24 horas y luego se tiñeron con calceína-AM $1\mu\text{M}$ y EthD-1 $2\mu\text{M}$ durante una hora. Finalmente se tomaron fotografías en un microscopio Epifluorescente (Zeiss Axiovert) y se contó el número y el porcentaje de células positivas para calceína y EthD-1 utilizando el software Image J.

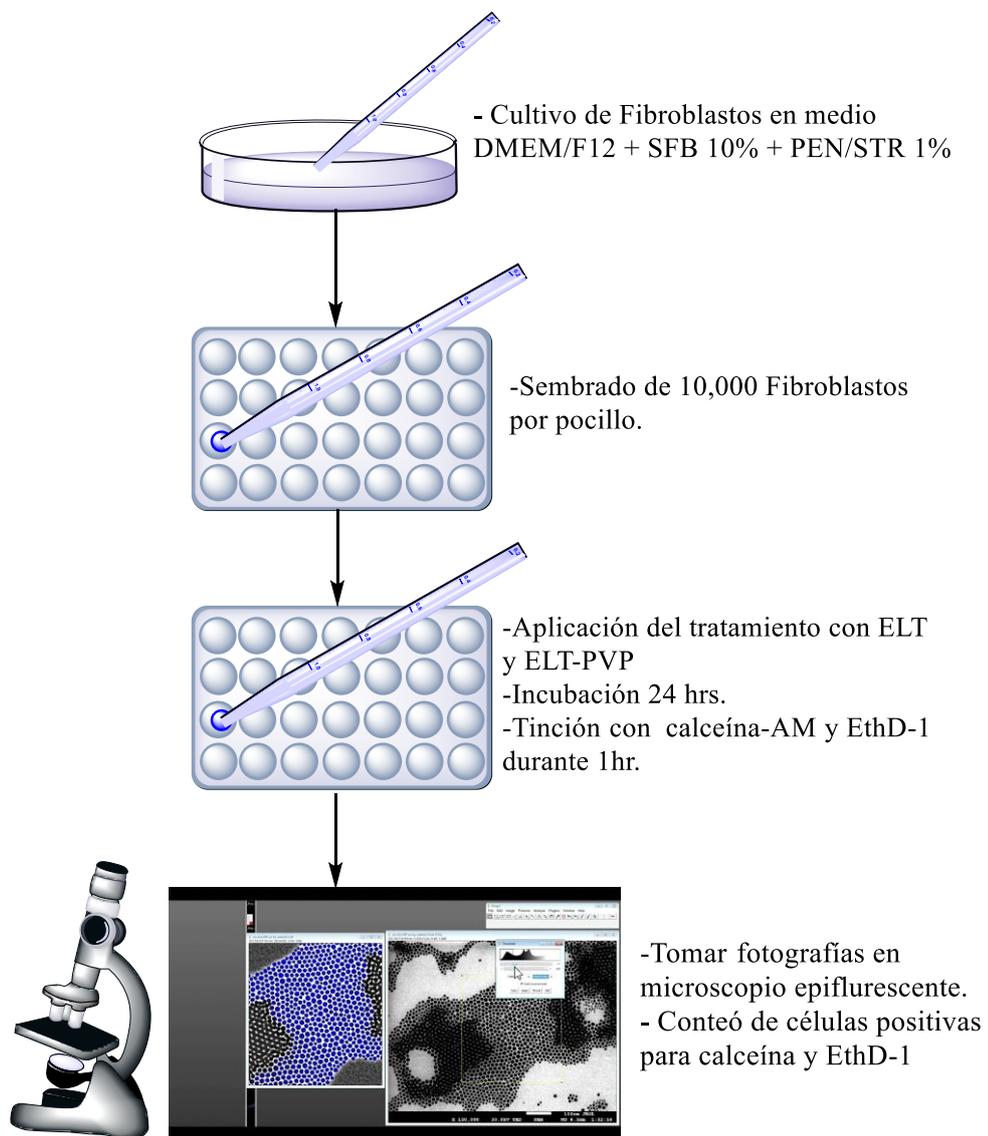


Figura 25. Esquema de la metodología del ensayo de citotoxicidad.

CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Descripción del hidrogel.

Se logró obtener un hidrogel (ELT-PVP) mediante irradiación gamma con ^{60}Co ; como se observan en las figuras 26 y 27. A simple vista hay un cambio muy notable entre la muestra sin irradiar e irradiado, el cual es el estado físico. Como se puede observar, la muestra antes de irradiar se encontraba en estado líquido, mientras que después de irradiar cambio ha estado semisólido. Esto puede deberse a la formación de enlaces covalentes entre la ELT y el PVP formando cadenas de polímeros altamente reticulados y de mayor peso molecular (ver propuesta de mecanismo de entrecruzamiento en la figura 30).



Figura 26. Muestra de Elastina y PVP K30 en solución acuosa. (Antes de irradiar con ^{60}Co).



Figura 27. Hidrogel ELT-PVP obtenido por irradiación gamma con ^{60}Co .

7.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

La imagen obtenida por SEM (figura 28) muestra la morfología de ELT, PVP, ELT+PVP y ELT-PVP, en donde se observa que la ELT tiene una estructura laminar y amorfa, en cambio el PVP posee aglomeraciones con estructuras esféricas. La mezcla física ELT+PVP muestra estructuras similares a las descritas anteriormente, esto es debido a que la ELT y el PVP solamente están unidos de manera física con lo que se esperaba observar estructuras similares a cada uno de los componentes en la mezcla. Sin embargo el copolímero ELT-PVP liofilizado presenta una morfología de una red interconectada y porosa. Esto exhibe que se presentaron cambios químicos en la estructura de los polímeros de ELT y PVP debido a la radiación gamma. El tamaño de poro promedio obtenido es de $16 \pm 8.42 \mu\text{m}$. Las redes porosas e interconectadas son importantes porque son esenciales para la proliferación y migración celular. También puede facilitar la llegada de nutrientes y oxígeno a las células, ya que permiten la regeneración de los vasos sanguíneos a través de la angiogénesis y la formación de nuevo tejido (Loh Q.L & Chong C., 2013). En el estudio de (Rnjak, y otros, 2011) se realizaron andamios sintéticos de ELT humana mediante electrohilado y obtuvieron tamaños de poro entre 8 y 11 μm que permitieron la infusión de fibroblastos dérmicos y la proliferación celular en la superficie del andamio. Mientras que en el estudio de (Annabi, y otros, 2009) se realizaron hidrogeles de ELT con alta presión usando CO_2 y obtuvieron tamaños de poro menores de 15 μm que eran adecuados para la difusión de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, no fueron lo suficientemente grandes para permitir la infiltración de fibroblastos. Se han reportado tamaños de poros y porosidad de varios tipos de andamios requeridos para diferentes actividades celulares. Donde el tamaño de poro para la infiltración celular de fibroblastos dérmicos en un andamio de ELT es de 11 μm y para la regeneración de la piel es de 20 μm (Yannas, Orgill, Skrabut, 1989). Además de eso, los materiales con alta porosidad permiten la liberación efectiva de biofactores como los factores de crecimiento y proteínas, etc. Con lo que pueden servir como plataformas para administrar sustancias bioactivas en el lecho de la herida (Hollister, 2005).

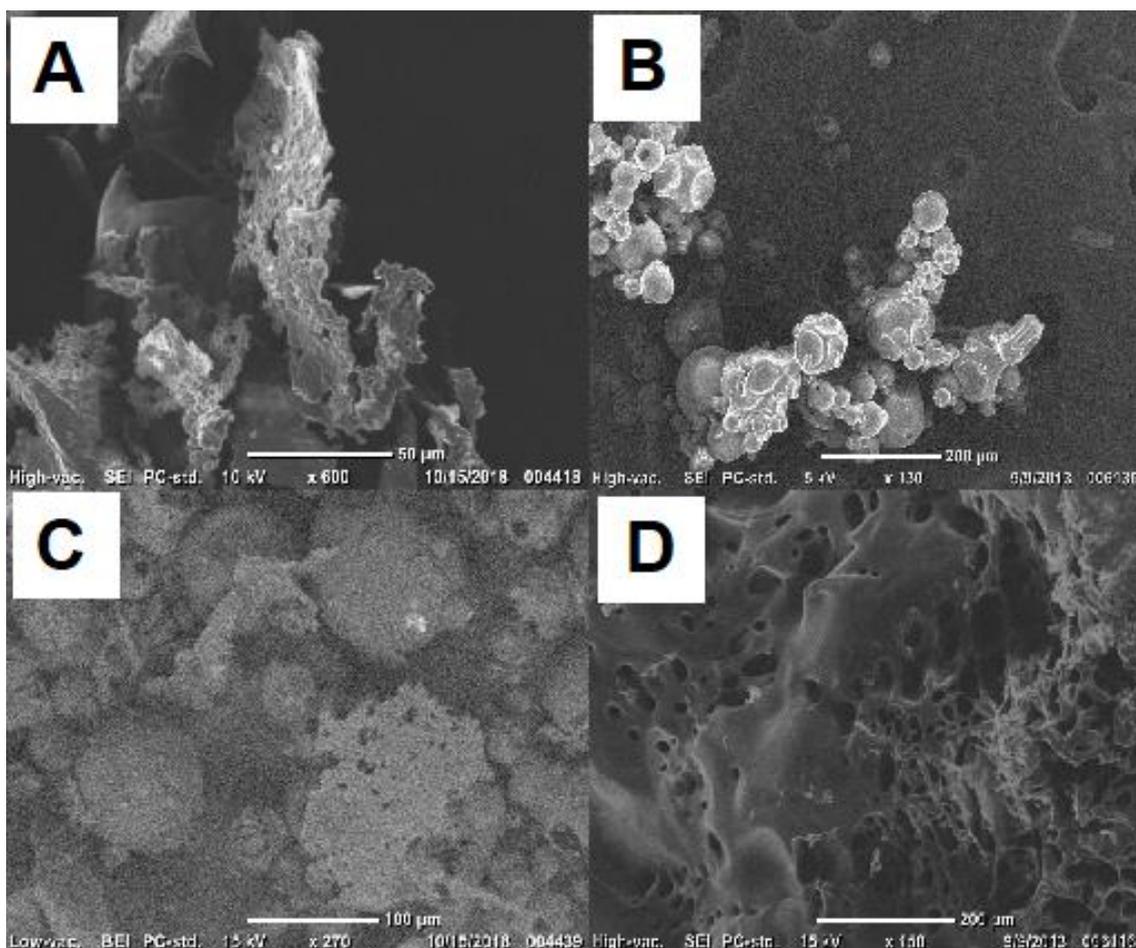


Figura 28. Imágenes obtenidas por SEM de a) ELT, b) PVP, c) ELT+PVP y d) ELT-PVP. En donde se observa que la morfología de ELT-PVP es distinta a sus componentes individuales, asimismo se puede apreciar que ELT-PVP es una red porosa e interconectada.

7.3 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).

Con la finalidad de encontrar los grupos funcionales presentes en las muestras se realizó la FTIR. La figura 29 muestra el FTIR de las muestras de ELT, PVP, y la mezcla física de ambos antes y después de irradiar. Como se puede observar en el espectro a), la señal de 1646 cm^{-1} corresponde a una amida I, también se pueden observar dos señales en 1538 cm^{-1} y 1222 cm^{-1} que se atribuyen a amida II (flexión) y amida III (estiramiento) respectivamente. Este tipo de señales se presentan comúnmente en espectros de proteínas (Baker, y otros, 2014). Mientras que el espectro b), las señales de 1646 cm^{-1} , 1407 cm^{-1} y 1276 cm^{-1} , corresponden a la banda de absorción del grupo carbonilo, vibraciones

características del estiramiento C-H y estiramientos C-N respectivamente, los cuales son característicos del PVP (González Torres, y otros, 2018). Por otro lado en los espectros c) y d) no se observa aparición o desaparición de bandas con respecto al espectro obtenido para el PVP. Esto puede deberse a que la concentración de PVP es mayor con respecto a ELT (15:1), por esto, las señales del PVP predominan. Sin embargo, en d) se puede observar una disminución en la intensidad de las bandas. Esto puede deberse al hecho de que los radicales generados en la reticulación ELT-PVP indujeron la escisión homolítica de los enlaces C-H y CO-H (Atrous, y otros, 2015). Por lo tanto, esto sugiere que sus concentraciones en el medio disminuyeron.

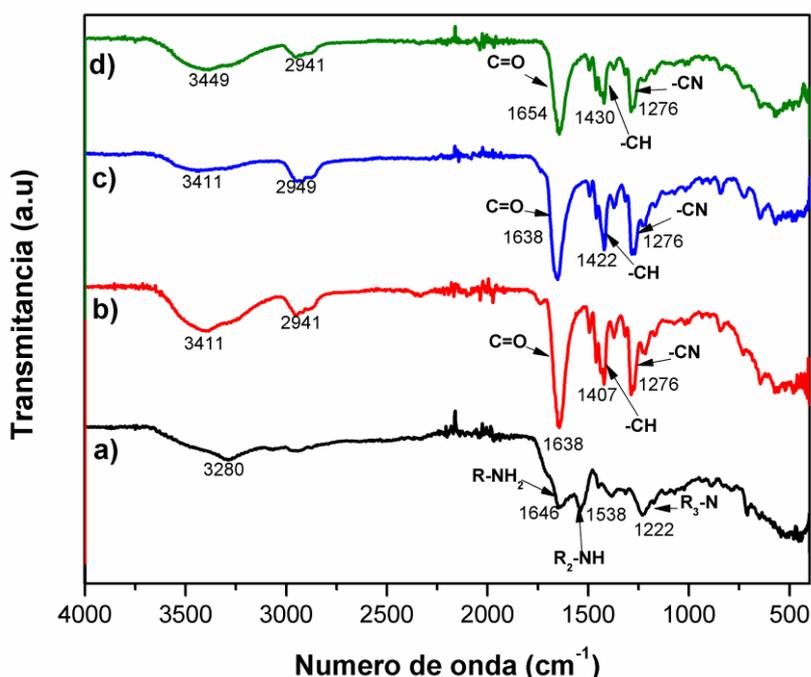


Figura 29. Espectro FTIR a) ELT, b) PVP, c) ELT+PVP y d) ELT-PVP.

7.4 Mecanismo de reacción de síntesis del hidrogel ELT-PVP mediante radiación gamma.

La figura 30 muestra la propuesta del mecanismo de síntesis del hidrogel de elastina-polivinilpirrolidona (ELT-PVP). El hidrogel ELT-PVP se preparó mediante el método de irradiación simultánea. Esta técnica es la más sencilla para la preparación de hidrogeles. Primero, la elastina (ELT) se irradia en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) y agua, bajo condiciones de aire. Posteriormente, el mecanismo de reacción podría ocurrir de la siguiente manera:

a) primero, la etapa de irradiación implica la formación de radicales primarios; b) segundo, la etapa de iniciación proporciona los radicales de la cadena del injerto; y finalmente, c) se realizan reacciones de terminación para producir el hidrogel ELT-PVP (Segura, y otros, 2016). La etapa de irradiación incluye la radiólisis del agua (ver compuesto 2-8) (Leyva Gómez, y otros, 2018), mientras que se forman diferentes radicales de ELT (compuestos 10–23) y PVP (compuesto 24) (etapa de iniciación). Los sitios donde se pueden desarrollar macroradicales ELT se representan con flechas. La reacción de terminación implica la desactivación de los macroradicales ELT con radicales PVP para producir el hidrogel ELT-PVP (compuestos 25-37). Además la complejidad de la reacción también incluye la posible formación de peróxidos e hidroperóxidos durante el proceso de irradiación (Nimse & Pal, 2015). Sin embargo, parece que la disminución en la banda de 3400 cm^{-1} en FTIR indica que los peróxidos no predominan en comparación con las reacciones de injerto para producir el hidrogel.

7.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la figura 31, se muestra el termograma DSC obtenido del análisis del copolímero ELT-PVP, así como el de sus componentes. Mientras que en la tabla 15 se presentan los valores de temperatura y entalpía asociados a los eventos térmicos que se aprecian en el termograma. En el caso de ELT (Curva a) se observan tres eventos endotérmicos, el primero de ellos se presenta a 73.7°C obteniéndose un valor de entalpía de 52.3 J/g , el segundo ocurre a 182.5°C con una entalpía de 171.6 J/g , y el último a una temperatura 297.5°C , obteniéndose un valor de entalpía de 113 J/g . Los valores que se obtienen de entalpía son positivos por lo que se trata de eventos de fusión, y esto indica la cantidad de energía necesaria para hacer que un mol de una sustancia que se encuentre en su punto de fusión pase del estado sólido al líquido (Incropera F. P., y otros, 2000).

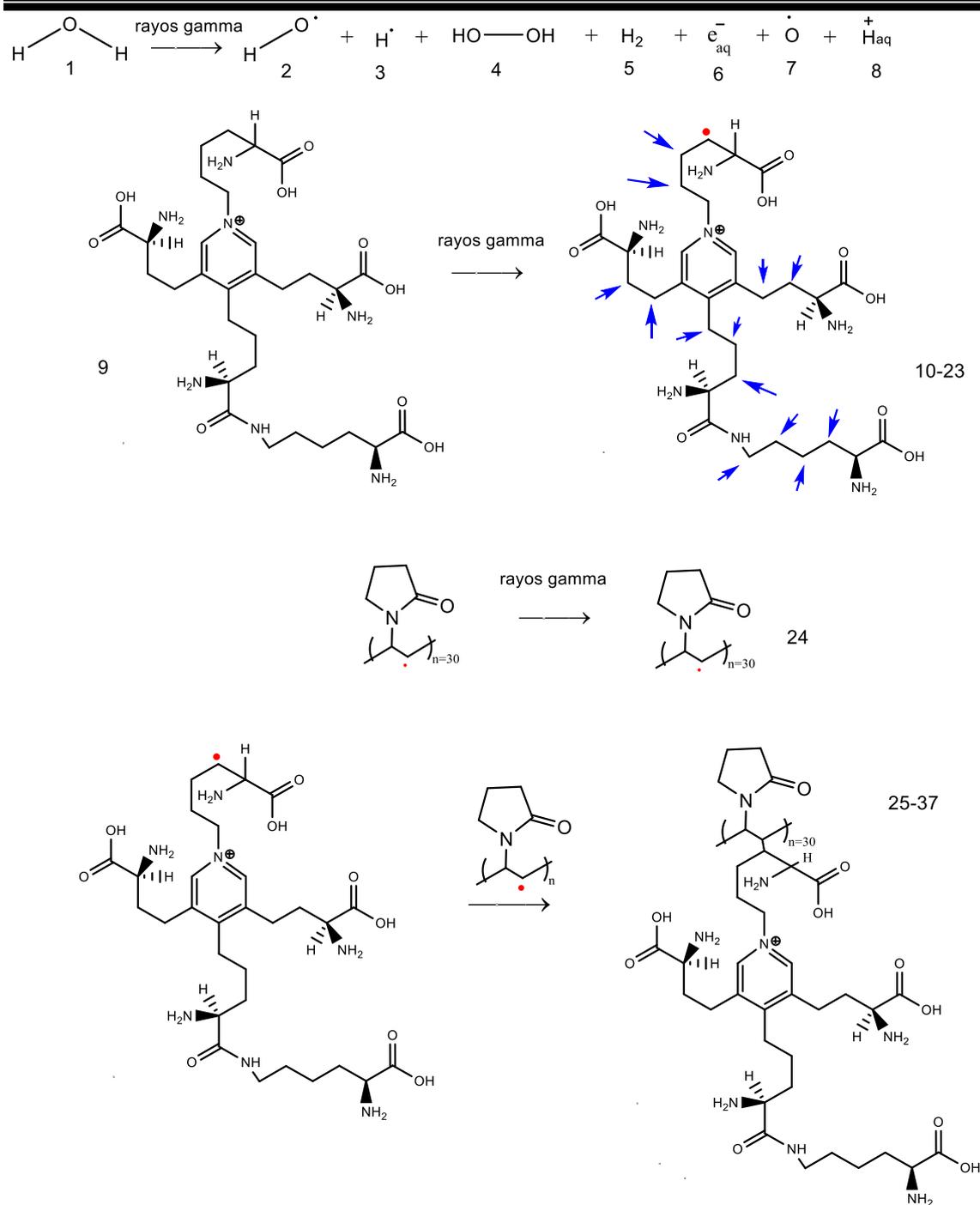


Figura 30. Mecanismo propuesto para la síntesis de hidrogel ELT-PVP inducida por radiación gamma. (Desarrollado por Maykel Gonzales Torres y Francisco Javier Gómez Zaldivar).

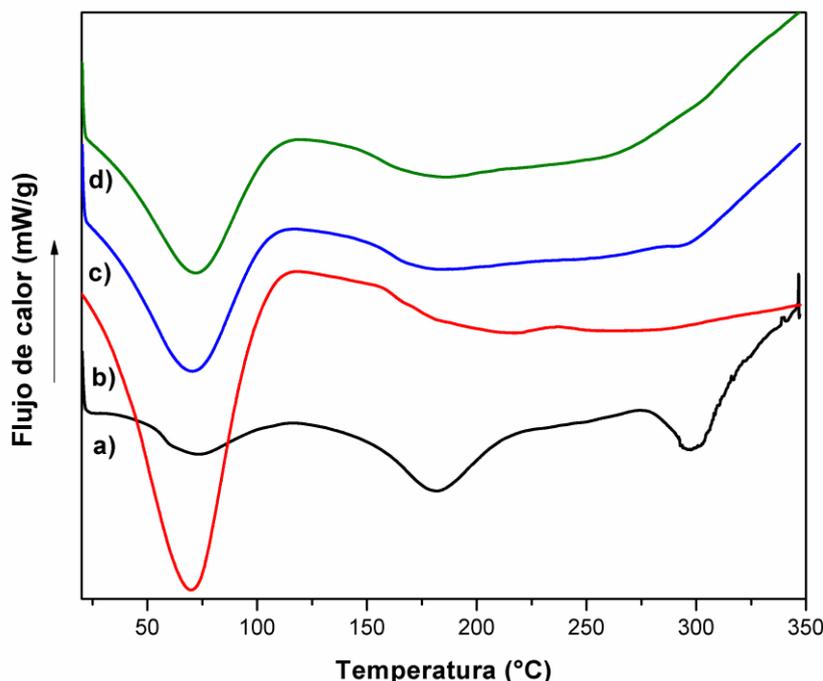


Figura 31. Termograma obtenidos mediante DSC de a) ELT, b) PVP, c) ELT+PVP y d) ELT-PVP.

Tabla 15. Valores de entalpía asociados a las transiciones térmicas en el análisis de DSC.

	T (°C)	ΔH (J/g)
Elastina	73.7	52.3
	182.5	171.6
	297.5	113
PVP	69.9	296
Elastina + PVP No irradiado	70.3	637
Elastina-PVP Irradiado	72.5	754

Estudios anteriores muestran que la elastina presenta un evento endotérmico a aproximadamente 85°C y una entalpía 191 J/g, esto lo atribuyen a la interacción entre el agua y las proteínas (Samouillan, y otros, 1999). En la curva b) se muestra solamente un evento endotérmico asociado al PVP a una temperatura de 69.9°C, obteniéndose una entalpía de fusión de 296 J/g. Este valor puede deberse al hecho de que el PVP es un material muy higroscópico, por lo que el vapor de agua puede afectar la capacidad calorífica. La temperatura de fusión reportada por (Gopal Venkatesh, y otros, 2010) para el PVP es de

aproximadamente 70°C, esto coincide con la obtenida en el análisis. Asimismo en la curva c), se observa un pico endotérmico a 70°C y una entalpia de 637 J/g. Finalmente en la curva d) se observa que para ELT-PVP se presenta una temperatura de fusión a 72.5°C y una entalpia de fusión de 754 J/g. Además en la figura 31 al comparar los termogramas c) y d), se observa que la curva d) está ligeramente desplazada hacia la derecha, lo cual sugiere la formación de nuevos enlaces debido al proceso de entrecruzamiento por irradiación gamma.

7.6 Análisis termogravimétrico (TGA).

Para evaluar la estabilidad de los excipientes y del copolímero, se monitoreo la masa con respecto a la temperatura. La figura 32 muestra las cuatro curvas de pérdida de peso por inducción térmica obtenidas en el análisis termogravimétrico. En el caso de ELT, se observan tres mesetas que indican pérdida de peso de manera significativa. La primera de ellas se presenta aproximadamente a 207°C, con una pérdida de peso del 26.76%, la segunda ocurre a una temperatura de 435°C con una pérdida de peso total del 68.32% y la última se presenta a 559°C teniendo una pérdida del 86.79%. Estas pérdidas de peso están asociadas a la descomposición de la ELT, debido a que va pasando de una estructura compleja a unas más simples. Las primeras temperaturas de descomposición se atribuyen a la desestabilización de interacciones no covalentes, las cuales no requieren de grandes cantidad de energía; conforme se va pasando a una estructura más simple se presentan uniones más fuertes como lo son de tipo covalente y para romperlas se necesita suministrar grandes cantidades de energía es por esto que las siguientes perdidas de materia se presentan en temperaturas más altas (Bellissent, y otros, 2016).

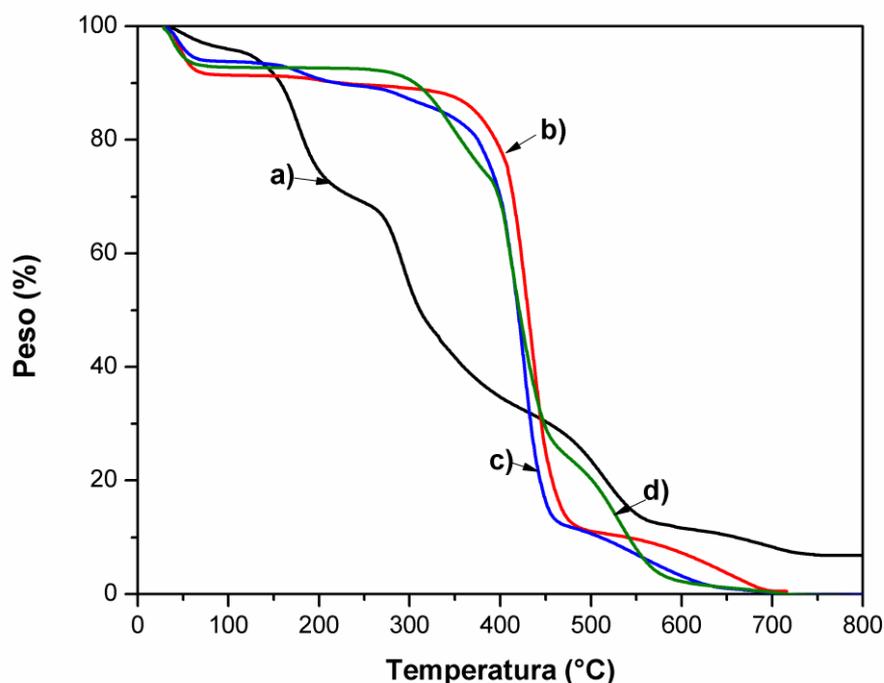


Figura 32. Termograma obtenido por TGA de a) ELT, b) PVP, c) ELT+PVP y d) ELT-PVP.

En un estudio previo se informó que para la ELT hay dos eventos de descomposición, el primero de los cuales ocurre a aproximadamente 230°C y el segundo ocurre a 450°C. Cabe mencionar que en dicho estudio el respectivo análisis se realizó en un intervalo de temperaturas de 30-550°C, por lo que no se observa la tercera pérdida de peso como en este caso (Samouillan, y otros, 1999). Para b) se observa que el PVP se descompone en una sola etapa a los 449°C con una pérdida de peso del 95% aproximadamente, lo cual se asemeja con lo reportado en diversos estudios, como el de (Peniche, y otros, 1993), el cual reportan un porcentaje de pérdida de peso del 97% a una temperatura cercana a 450°C. En el termograma c), la temperatura máxima de descomposición es de 458°C (similar al PVP) y la pérdida de peso es de 88%, esto se puede atribuir a la proporción en que se encuentra el PVP con respecto a la ELT, el cual es quince veces mayor. Por último en d) se presentan un perfil de descomposición diferente con respecto a sus componentes individuales, observándose tres pérdidas de peso, la primera de ellas ocurre a 390°C con un 27% de pérdida de peso, la segunda se da a 453°C perdiéndose 72% de la muestra y finalmente a 564°C se

pierde el 95% del peso total. Como se puede observar en el caso del nuevo copolímero hay cambios en las temperaturas de descomposición con respecto a ELT+PVP en donde se observan dos mesetas que indican pérdida de peso en el intervalo de temperaturas de 389°C y 560°C respectivamente. Esto puede deberse a las nuevas especies que se formaron debido a la irradiación gamma (ver figura 30), lo cual indica que existe un cambio químico de la ELT y el PVP al ser sometidos a radiación con ^{60}Co . Los diferentes cambios se pueden deber a la descomposición de la estructura tridimensional, la cual pasa de ser una red tridimensional compleja y estabilizada por puentes de hidrógeno u otras interacciones débiles, a una estructura más sencilla en donde lo único que predomina son enlaces covalentes, es por esto que cada vez requiere más energía para ir descomponiendo la macromolécula (Wang, Duan, Xu, & Duan, 2016).

7.7 Comportamiento reológico.

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia (Barnes, Hutton, & Walters, 1989). Algunos materiales cuando experimentan una deformación debido a una fuerza exhiben propiedades combinadas de un líquido y un sólido al mismo tiempo, estas pueden variar de acuerdo a la estructura interna del material (Herrera López, 2017). Para ciertos fluidos el esfuerzo cortante tangente a la dirección de flujo es proporcional a la tasa de cambio de la velocidad con respecto a la distancia, a esto se le conoce como ley de viscosidad de Newton. Los fluidos que cumplen con esta ley se le conocen como fluidos Newtonianos. Por otro lado, los fluidos en los que no hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la variación de la velocidad se le conocen como fluidos no Newtonianos y estos se subdividen en dependientes e independientes del tiempo (Rojas, Briceño, & Avedaño, 2012).

Entre los fluidos no Newtonianos dependientes del tiempo se encuentran los fluidos tixotrópicos, que son aquellos en los que la viscosidad disminuye con el tiempo en el cual el fluido es sometido bajo un esfuerzo cortante. Mientras que los fluidos que están influenciados bajo esfuerzos cortantes en los que aumenta

la viscosidad conforme transcurre el tiempo se les conoce como reopécticos (Rojas, Briceño, & Avedaño, 2012).

Los fluidos no Newtonianos independientes del tiempo se caracterizan porque el esfuerzo cortante solo depende de la velocidad de deformación, entre los cuales se encuentran los fluidos plásticos de Bingham, los cuales no fluyen hasta que se haya superado un determinado valor de esfuerzo cortante. A partir de este punto el cambio en el esfuerzo cortante es proporcional a la tasa de corte. El otro tipo de fluido que se encuentra en este grupo son los fluidos pseudoplásticos en los cuales la viscosidad se reduce con el esfuerzo cortante (Rojas, Briceño, & Avedaño, 2012).

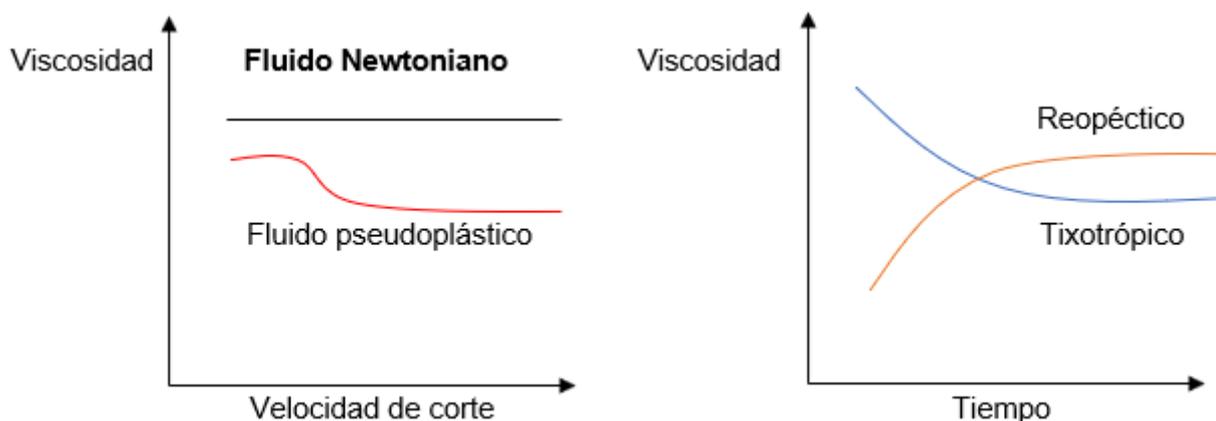


Figura 33. Curvas de fluidez de diferentes tipos de fluidos. Modificado de (Rojas, Briceño, & Avedaño, 2012).

Con el objetivo de determinar los cambios reológicos en el ELT-PVP derivados de la radiación gamma, se realizó un estudio reológico con el registro de la deformación y restructuración.

A partir del ensayo de velocidad de corte se puede determinar que el copolímero obtenido mediante irradiación gamma es un fluido no Newtoniano, debido a que la viscosidad presentó variaciones con respecto a la tasa de corte y el tiempo. De acuerdo con los perfiles (figuras 34, 36 y 38), el copolímero ELT-PVP exhibe un fluido pseudoplástico con tixotropía. En los fluidos pseudoplásticos la disminución de la viscosidad con respecto a la velocidad de

corte se debe principalmente a la relajación de microestructuras, lo cual permite al material fluir con cierta facilidad. Esto es debido a la reducción de fuerzas hidrodinámicas entre el fluido y las microestructuras (Herrera López, 2017).

Otro aspecto a notar es que al comparar los gráficos (figuras 34 y 35), se observa que la muestra irradiada presenta valores de viscosidad diez veces mayor que la mezcla física de los polímeros, lo cual se debe al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas de ELT y el PVP formando redes tridimensionales, con lo que hay un aumento del peso molecular y esto se traduce en el aumento de la viscosidad.

En la figura 36, se observa un área de histéresis característico de materiales tixotrópicos a partir de 6399.98 s^{-1} , en donde los valores de esfuerzo cortante son mayores en la curva azul con respecto a la curva roja, además en la zona marcada se muestran los puntos en donde se observa mayor separación con una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. En los fluidos con comportamiento tixotrópico (ver figura 40) el aumento de gradiente de velocidad (curva azul), provoca la relajación y disipación de las cadenas de polímero, mientras que la disminución de gradiente (curva roja) favorece la estructuración del material (Garriga A, 2002). Sin embargo no recupera por completo su estructura inicial.

En la mezcla física ELT+PVP (figura 37) no se observa un área de histéresis, aunque en la zona marcada se observa una separación de dos puntos en los cuales no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Esto quiere decir que la mezcla de polímeros antes de someterse a irradiación no tenía un comportamiento tixotrópico, lo cual sugiere que la radiación provocó cambios en el comportamiento reológico.

Por otro lado en el ensayo de viscosidad con respecto al tiempo a una velocidad de corte constante, se muestra que el hidrogel ELT-PVP (figura 38) presenta un incremento en la viscosidad conforme avanza el tiempo alcanzando un valor máximo aproximadamente a los 720 s, después de este punto hay una disminución de la viscosidad, lo cual se puede atribuir a su comportamiento

tixotrópico, mientras que en la mezcla física (figura 39) se mantiene constante, dicho comportamiento es similar al de un fluido Newtoniano (Osswald & Rudolph, 2015).

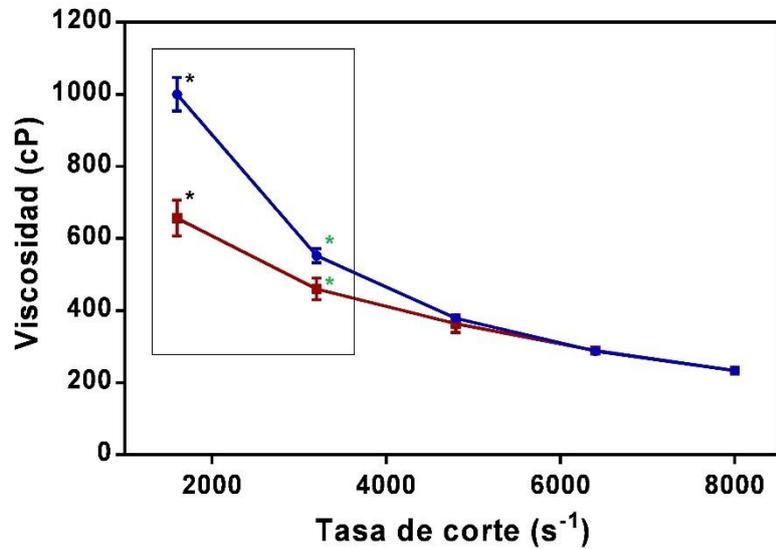


Figura 34. Variación de la viscosidad a diferentes tasas de corte del hidrogel ELT-PVP. (Nota: Los datos son medias \pm DE con N=3, la línea azul representa el análisis con incremento de la tasa de corte y la línea roja la del análisis con disminución de la tasa de corte. Los * indican que existe diferencia estadísticamente significativa).

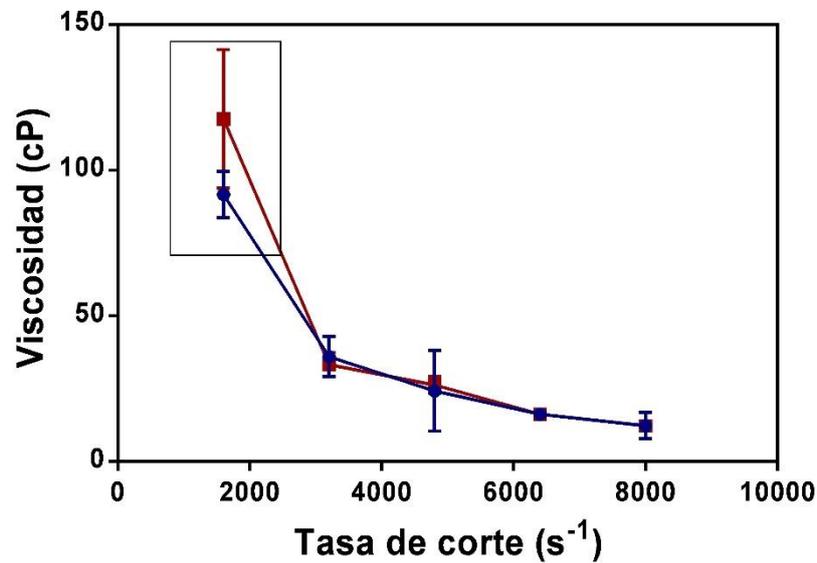


Figura 35. Variación de la viscosidad a diferentes tasas de corte de la mezcla ELT+PVP. (Nota: Los datos son medias \pm DE con N=3, la línea azul representa el análisis con incremento de la tasa de corte y la línea roja la del análisis con disminución de la tasa de corte).

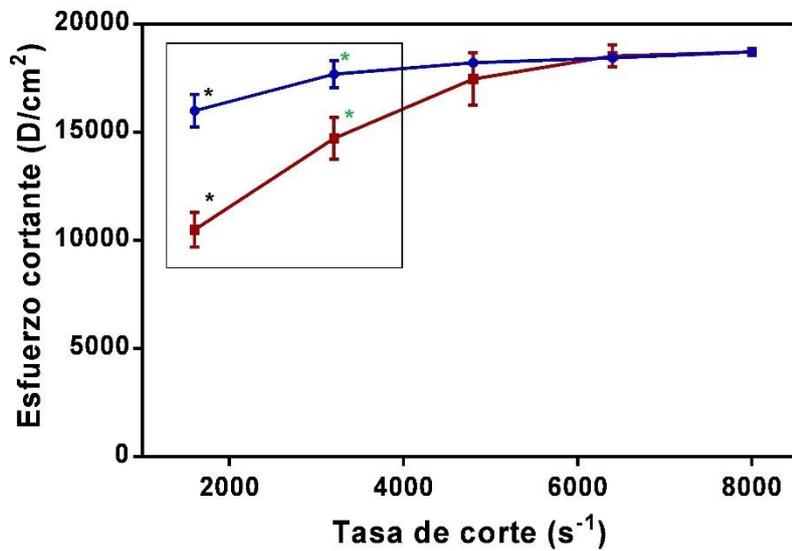


Figura 36. Variación del esfuerzo cortante a diferentes tasas de corte del hidrogel ELT+PVP. (Nota: Los datos son medias \pm DE con N=3, la línea azul representa el análisis con incremento de la tasa de corte y la línea roja la del análisis con disminución de la tasa de corte. Los * indican que existe diferencia estadísticamente significativa).

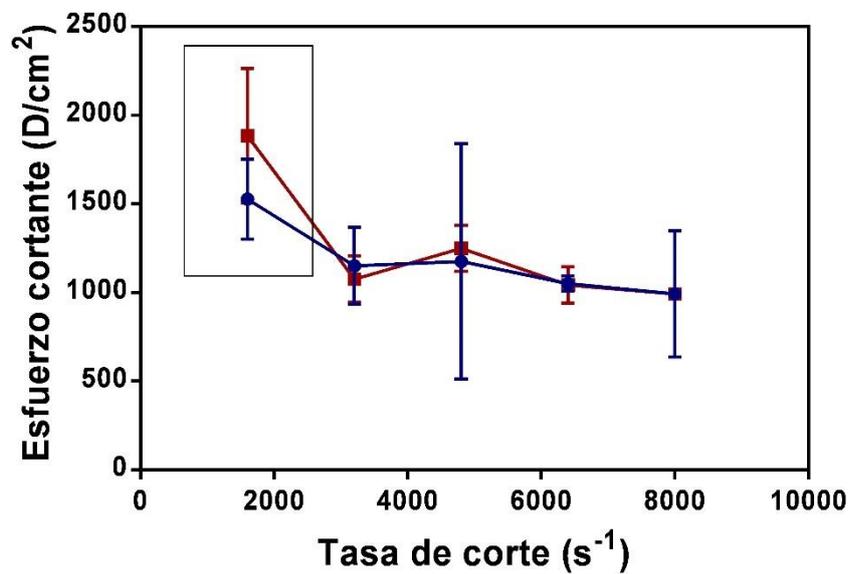


Figura 37. Variación del esfuerzo cortante a diferentes tasas de corte de la mezcla ELT+PVP. (Nota: Los datos son medias \pm DE con N=3, la línea azul representa el análisis con incremento de la tasa de corte y la línea roja la del análisis con disminución de la tasa de corte).

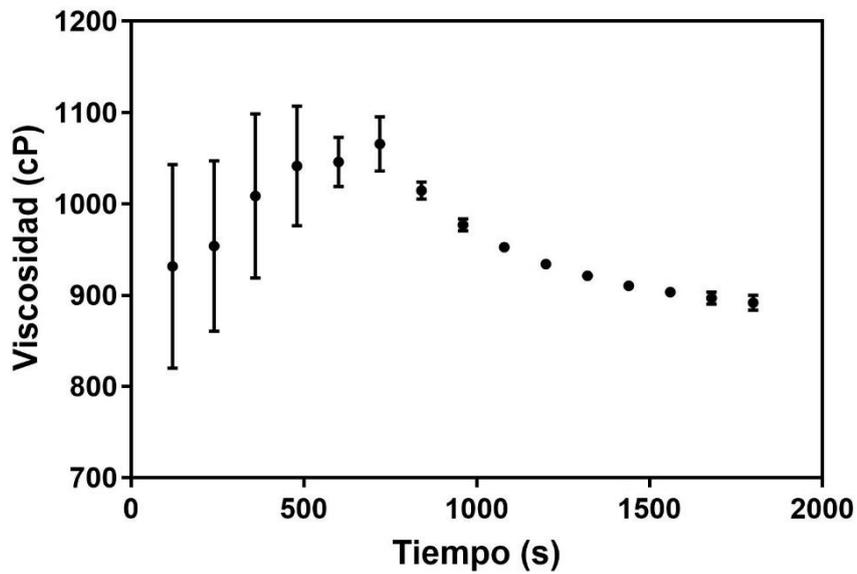


Figura 38. Variación de la viscosidad con respecto al tiempo a una tasa de corte constante (2000 s^{-1}) del hidrogel ELT-PVP (Nota: los datos son medias \pm DE con $N=3$).

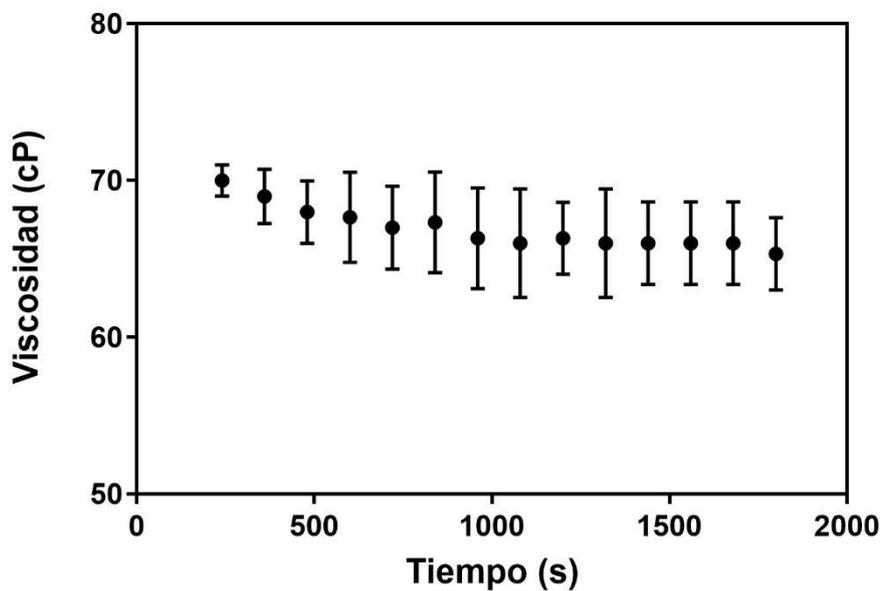


Figura 39. Variación de la viscosidad con respecto al tiempo a una tasa de corte constante (2000 s^{-1}) de la mezcla ELT+PVP (Nota: los datos son medias \pm DE con $N=3$).

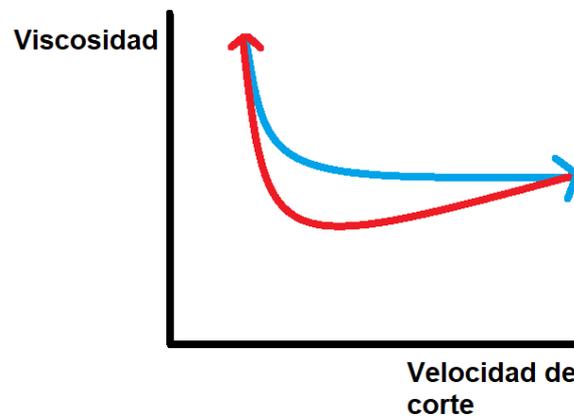


Figura 40. Curva de Histéresis de materiales tixotrópicos Modificado de (Herrera López, 2017).

Todo esto nos permite corroborar que la radiación gamma indujo cambios en la estructura molecular de ELT-PVP, lo cual se ve reflejado en su comportamiento reológico (ver figura 41), el cual corresponde a un fluido pseudoplástico con tixotropía. La pseudoplásticidad es adecuada en productos tópicos porque asegura una distribución uniforme del producto sobre la piel. Asimismo, la tixotropía es una propiedad deseada porque garantiza una distribución uniforme y ayuda a aumentar el tiempo de retención del material polimérico en el sitio de aplicación tópica. Además, el comportamiento pseudoplástico y tixotrópico puede influir en las propiedades de bioadhesión del apósito. La bioadhesión es la capacidad de algunas macromoléculas de adherirse a los tejidos biológicos, por lo tanto, esta es una propiedad importante para el andamiaje en la curación de heridas. Por ello los productos destinados a estar en contacto con la piel durante períodos prolongados estarán sujetos a diversas tensiones debido a las actividades diarias, por lo que debe asegurarse de que el andamio permanezca en el sitio de la herida (Carvalho, y otros, 2013), (Lee, Moturi, & Lee, 2009) y (Martín, y otros, 2015).

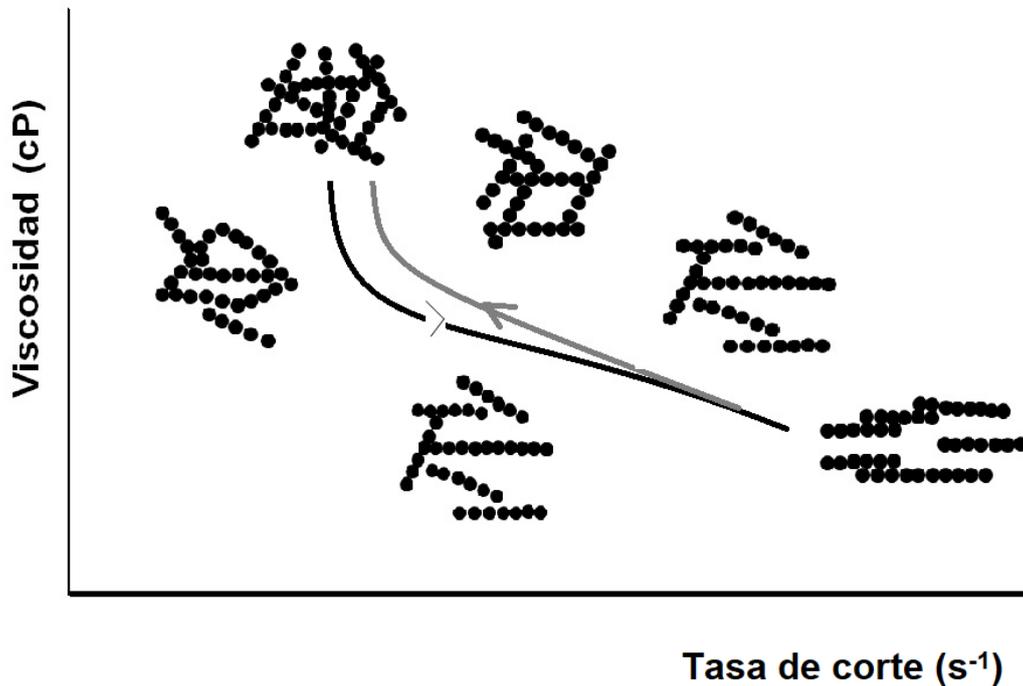


Figura 41. Interpretación estructural del comportamiento reológico del hidrogel ELT-PVP. La imagen muestra la representación gráfica que se propone sobre el comportamiento reológico del hidrogel ELT-PVP, en donde al aplicar una fuerza de cizallamiento, disminuye la viscosidad del hidrogel debido a que hay una desorganización de las estructuras poliméricas con lo que va perdiendo su estructura inicial. Por otro lado, cuando el análisis se realiza cesando el esfuerzo cortante, la viscosidad aumenta debido a la reorganización de las estructuras poliméricas, sin embargo no se llega a recuperar la estructura inicial por completo.

7.8 Ensayo de proliferación celular.

La proliferación celular es un componente clave de muchos procesos biológicos, incluido el desarrollo embrionario, las respuestas inmunitarias, la cicatrización de heridas, la regeneración de órganos y la metástasis de las células cancerosas (Manzanares & Horwitz, 2011). Existen diversos métodos para determinar el curso temporal de la proliferación celular. Sin embargo en este estudio se empleó el ensayo de cristal violeta para la determinación de la proliferación celular de fibroblastos dérmicos en presencia de ELT y del copolímero ELT-PVP. La tinción con cristal violeta es un ensayo rápido y versátil que permite evaluar la respuesta proliferativa debido a que el colorante tiene la capacidad de unirse a proteínas y DNA, con lo que es posible la cuantificación

del número de células por medio de espectrofotometría UV-visible (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2018).

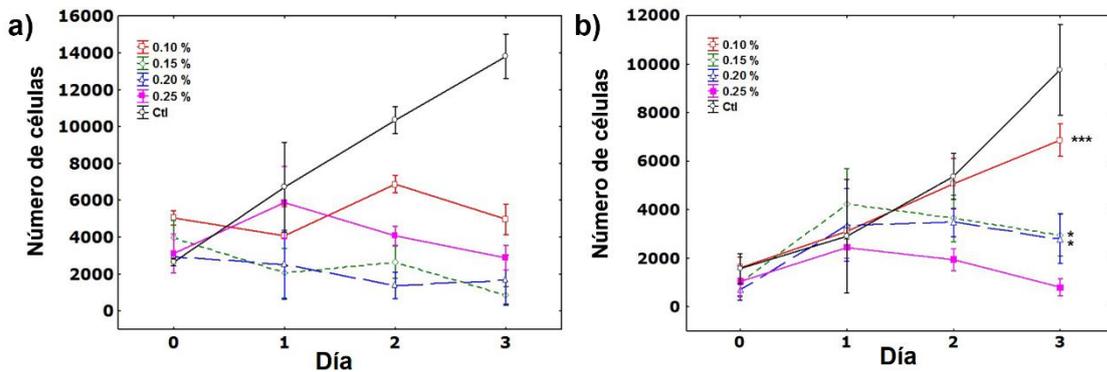


Figura 42. Proliferación celular a diferentes concentraciones de a) ELT y b) ELT- PVP.

En la figura 42, se muestran las curvas de proliferación celular de ELT (gráfico a) y del hidrogel ELT-PVP (gráfico b) a diferentes concentraciones. Los gráficos ELT muestran que el tratamiento de 0,10% m/v permite la proliferación de cultivos celulares, mientras que la combinación ELT-PVP promueve la proliferación durante todo el periodo de análisis, con una significancia de $***p < 0,0005$ para el tratamiento de 0.10/1.5% m/v y de $*p < 0,05$ para los siguientes dos tratamientos 0.15/2.25 y 0.20/3.0% m/v.

Los ensayos de proliferación celular mostraron que las tres primeras combinaciones de ELT-PVP (0.10/1.5; 0.15/2.25; 0.20/3.0% m/v) permiten la progresión del cultivo celular hasta el tercer día, mientras que en los tratamientos que contienen ELT, solo el primer tratamiento (0.10 %m/v) permite la proliferación del cultivo pero solo hasta el segundo día de tratamiento, lo cual sugiere que el hidrogel influye en la velocidad de cierre de heridas en los primeros días durante el curso de la cicatrización. Esto indica que el entrecruzamiento de ELT y PVP favorece la proliferación celular con respecto a la ELT.

En el ensayo de proliferación es razonable que a altas concentraciones de ELT no se induzca la proliferación celular ya que el porcentaje de muerte es alto en esta condición. Sin embargo, cuando los fibroblastos se ponen en contacto con la combinación ELT-PVP, los hidrogeles permiten la proliferación

del cultivo celular. En otros estudios, la combinación de PVP con polietilenglicol (PEG) permite la supervivencia de los fibroblastos L929, sin embargo, la relación de la concentración para los polímeros utilizados no está establecida (Biazar, y otros, 2012). Por otro lado, se ha establecido que el PVP de 40 a 360 kDa tiene una ocupación de volumen fraccional (FVO; volumen ocupado por macromoléculas) entre 18 y 54% y funciona como un aglomerante macromolecular, lo que permite la viabilidad, proliferación y construcción de la propia matriz extracelular como la colágena I y fibronectina. Sin embargo, esto parece estar relacionado con la línea celular que se utiliza (Rashid, y otros, 2014). Es importante decir que en un modelo animal podría ser diferente ya que en este informe el contacto de los materiales con las células es inminente, pero en un tejido como la piel esto podría ser muy diferente si se desea que el hidrogel induzca señales celulares en la capa de la dermis.

7.9 Prueba de hemólisis.

La interacción de los eritrocitos con biomateriales puede provocar daño a las células y liberar hemoglobina. Este proceso se denomina hemólisis y puede ser inducido por fuerzas físicas pero también por sustancias como monómeros, iones, etc., además por componentes activados del sistema del complemento como C5a, es por esto que se busca que los materiales que estén destinados a estar en contacto con el organismo sean biocompatibles (Siedlecki, 2018).

En esta ocasión el ensayo de hemólisis fue realizado de manera cualitativa. Como se muestra en la figura 43, se realizaron cuatro observaciones empleando los excipientes que se usaron para la elaboración del hidrogel, además de la mezcla ELT+PVP y el copolímero de ELT-PVP que se obtuvo por irradiación. En la figura 43 se observa que ninguno de los polímeros generó daño en los eritrocitos. Al tratarse de un ensayo cualitativo solamente se pueden determinar los cambios en la morfología celular, sin embargo este ensayo es un buen indicio preliminar para determinar si el copolímero es apto para estar en contacto con el organismo.

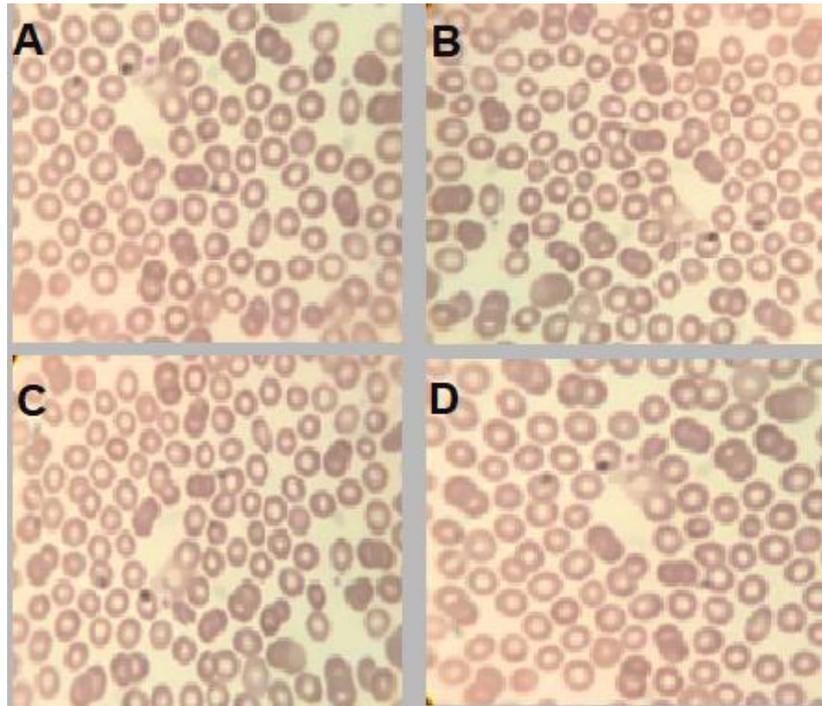


Figura 43. Observación de eritrocitos después de un ensayo de hemólisis, donde A) ELT, B) PVP, C) ELT+PVP y D) ELT-PVP (Aumento 100X).

7.10 Prueba de viabilidad celular.

Los ensayos de viabilidad celular se usan a menudo para determinar si las moléculas o compuestos de prueba muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular. Existen numerosos métodos para estimar la viabilidad celular y citotoxicidad, sin embargo en esta ocasión se empleó el ensayo de captación de calceína AM y homodímero de etidio debido a que es un ensayo sencillo, sensible, seguro y eficaz para la determinar la citotoxicidad.

La prueba se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas mediante sondas que reconocen dos parámetros de viabilidad celular que son la actividad esterasa intracelular (calceína AM) y la integridad de la membrana celular (EthD-1) (Gil Loyzaga, 2011). La calceína AM es un derivado de fluoresceína, se destaca como el primer indicador de viabilidad celular y citotoxicidad por su gran retención celular debido a que es un colorante vital altamente lipofílico, además de la insensibilidad relativa de su fluorescencia al pH en el rango fisiológico (Mitrofan, Palii, Estaquier, & Montreuil, 2005).

La calceína AM que no es fluorescente, ingresa rápidamente en las células vivas y es convertida, por la actividad esterasa intracelular en calceína que es un colorante polianiónico, el cual es retenido por las células y fluoresce intensamente en color verde en un intervalo de longitud de onda 495-515 nm. Mientras que el EthD-1 no penetra la membrana plasmática de las células vivas sino más bien ingresa en la membrana dañada de las células muertas y se une a los ácidos nucleicos y con esto aumenta su fluorescencia aproximadamente cuarenta veces, produciendo una señal de color rojo en un intervalo de longitud de onda de 495-635 nm (Gil Loyzaga, 2011).

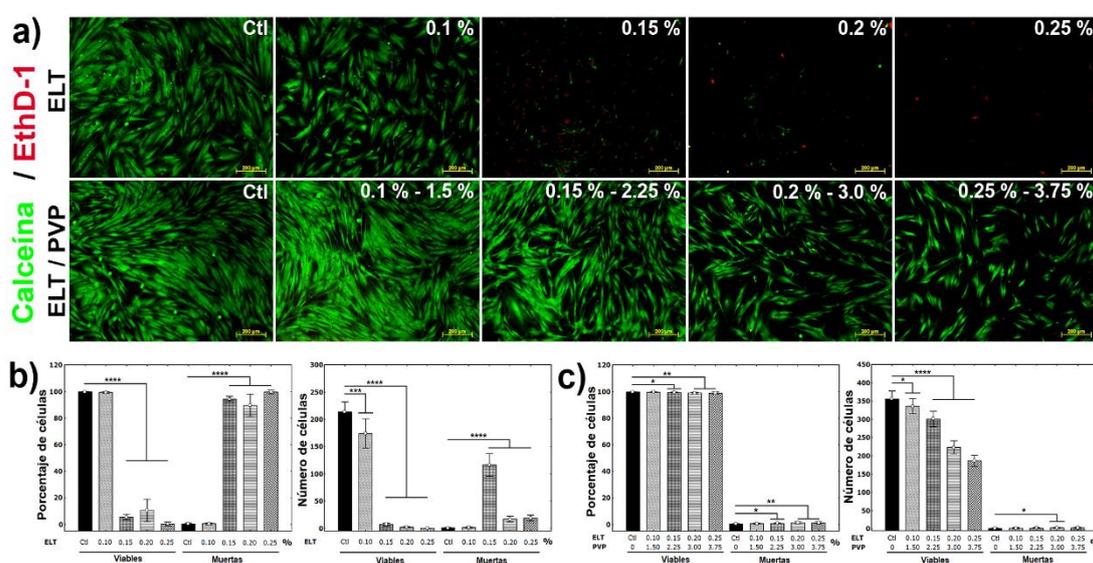


Figura 44. Viabilidad celular y citotoxicidad de ELT y ELT-PVP. a) En la parte superior, las fotografías muestran las células vivas en verde (calceína positivos) y las células muertas en rojo (EthD-1 positivos) con las diferentes condiciones experimentales. b) En la parte inferior se muestran los gráficos de porcentaje y número de células en ELT o c) porcentaje y número de células en el hidrogel ELT-PVP. Prueba ANOVA, *** $p = 0.0001$, **** $p = 0.00001$.

Dado que ELT es una proteína de matriz extracelular, se esperaba que mantuviera la viabilidad celular, sin embargo, solo la concentración de 0.1% de ELT muestra un alto porcentaje de viabilidad celular (99.4%) (ver figura 44). Mientras tanto, las concentraciones de 0.15, 0.2 y 0.25% m/v de ELT muestran altos porcentajes de células muertas. Esto puede deberse a la presencia del receptor elastina-laminina, ya que se ha reportado que la presencia de péptidos de ELT produce un efecto agonista de dicho receptor, el cual es dosis

dependiente, por lo que la presencia de concentraciones saturantes de péptidos de ELT da como resultado una sobreestimulación crónica del receptor con producción sostenida de radicales libres y enzimas líticas (Robert, 1998). Anteriormente se ha demostrado que en presencia de péptidos de ELT, se produce una amplificación de la producción de elastasa en las células vasculares del músculo liso y en los fibroblastos de la piel humana (Peterszegi, Texier, & Robert, 1999). También se demostró que los leucocitos y células endoteliales que activan el receptor elastina-laminina desencadenan la liberación de óxido nítrico y del anión super oxido y cuando estos dos radicales se combinan forman el anión peroxinitrito que es altamente tóxico (Robert, 1998).

Sin embargo este efecto adverso se mitigó cuando se combinó la ELT con el PVP, en todas las concentraciones el porcentaje de viabilidad celular fue cercano a 100%, lo cual indica que el copolímero ELT-PVP es un material biocompatible.

Los resultados obtenidos en las pruebas de proliferación celular y viabilidad celular sugieren que el entrecruzamiento ELT y PVP mediante irradiación gamma es una estrategia adecuada para las aplicaciones biológicas de ELT, ya que se logró disminuir la citotoxicidad de la ELT y permitió la proliferación celular.

Finalmente el método de irradiación gamma de polímeros puede ser una alternativa confiable para la síntesis de nuevos materiales poliméricos, ya que hoy en día existen numerosos polímeros con diversas propiedades biológicas y si se logran combinar se podría obtener una gran variedad de nuevos biomateriales con aplicaciones biomédica

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.

El método de irradiación de polímeros en solución acuosa mediante rayos gamma, resultó ser un método muy sencillo y eficaz para la reticulación química de polímeros tal como quedó evidenciado en las pruebas fisicoquímicas, permitiendo obtener el nuevo copolímero ELT-PVP.

Se obtuvo un hidrogel con alta porosidad, el cual es ideal como andamio en cicatrización de heridas ya que esta morfología permite la internalización y la migración de fibroblastos así como permitir el flujo de nutrientes y oxígeno a las células.

Por otro lado el comportamiento reológico resultó ser el de un fluido pseudoplástico con tixotropía. Estas propiedades son adecuadas para un andamio en cicatrización de heridas porque garantiza una buena distribución y retención del material polimérico en el sitio de la herida.

Por último se evaluó la actividad biológica del copolímero ELT-PVP sobre la proliferación celular en fibroblastos, citotoxicidad y su capacidad hemolítica obteniendo que el tratamiento con ELT-PVP permite mejor la proliferación celular y presenta superior viabilidad celular con respecto al tratamiento con ELT. Además no presenta daño en eritrocitos cualitativamente, lo cual quiere decir que la combinación de ELT con PVP mediante reticulación con radiación gamma es una estrategia versátil para poder obtener un nuevo biomaterial que es biocompatible y permite la proliferación celular.

CAPITULO IX. PERSPECTIVAS.

- Determinar la manera en la que influye la tasa de dosis de radiación en la reticulación polimérica y analizar cómo afecta en las propiedades fisicoquímicas del hidrogel.
- Realizar hidrogeles con diferentes concentraciones de ELT y PVP para determinar cómo varía la actividad biológica en cada uno de ellos con el objetivo de hallar la formulación que favorezca de mejor manera el proceso de cicatrización.
- Efectuar un ensayo de cicatrización de heridas empleando un modelo animal y monitorear todo el proceso de cicatrización con la finalidad de determinar si el hidrogel favorece el proceso de cicatrización en un tejido animal.
- Adicionar un compuesto bioactivo al hidrogel y comparar el proceso de cicatrización en presencia de dicho compuesto en solitario y en combinación con el hidrogel.

REFERENCIAS.

1. Akhtar, M. F. (2016). Methods of synthesis of hydrogels. A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 554-559.
2. Almine, J. F., Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2012). Elastin Signaling in Wound Repair. *Birth Defects Research*, 248-257.
3. Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., Matthews, J. B., & Pollock, R. E. (2015). *Schwartz. Principios de cirugía* (decima ed.). Ciudad de Mexico: Mc Graw Hill.
4. Atrous, H., Bettaïebc, N., Hosni, F., Danthine, S., Blecker, C., Attia, H., & Ghorbel, D. (2015). Effect of gamm radiation on free radicals formation, structural changes and functional properties of wheat starch. *International Journal of Biological Macromolecules*.
5. Awasthi, R., Manchanda, S., Das, P., Velu., Malipeddi, H., Pabreja, K.,Dua, K. (2018). Poly(vinylpyrrolidone). *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, 255-272.
6. Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 1771-1991.
7. Barnes, H., Hutton, J., & Walters, K. (1989). *An Introduction to Rheology*. Amsterdam: Elsevier.
8. Bellissent, M., Hassanali, A., Havenith, M., Henchman, R., Pohl, P., Sterpone, F., García, A. (2016). Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins. *ASC publications*, 7673-7697.
9. Biazar, E., Roveimiab, Z., Shahhosseini, G., Khataminezhad, M., Zafari, M., & Majdi, A. (2012). Biocompatibility Evaluation of a New Hydrogel Dressing Based on Polyvinylpyrrolidone/Polyethylene Glycol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-5.
10. Boateng, J. S., Stevens, H. N., Eccleston, G. M., & Matthews, K. H. (2007). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A review. *Wiley InterScience*, 2892-2923.
11. Carvalho, F., Calixto, G., Hatakeyama, I., Luz, G., Daflon Gremião, M., & Chorilli, M. (2013). Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1750-1757.
12. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, C. (2008). La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev Mex*, 211-213.

13. Catanzano, O., D' Esposito, V., Acierno, S., Ambrosio, M., De Caro, C., Avagliano, C., Quaglia, F. (2015). Alginate–hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process. *Carbohydrate Polymers*, 407-414.
14. Charlesby, A. (1960). *Atomic Radiation and polymers*. Oxford, London: Pergamon.
15. Clough, R. (2001). High-Energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* , 8-33.
16. Daame, W., Veerkamp, J., Van Hest, J., & Van Kuppevelt, T. (2007). Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 4378-4398.
17. Debelle, L. &. (1999). Elastin: molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 261-272.
18. Demeter, M., Virgolici, M., Vancea, C., Scarisoreanu, A., Georgiana, M., & Meltzer, V. (2016). Network structure studies on γ -irradiated Collagen–PVP superabsorbent hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 1-25.
19. Díaz González, J. M., Narro Llorente, R. A., Domínguez Cherit, J., & Contreras Ruiz, J. (2008). Relevancia del tratamiento integral del paciente con heridas extensas previo a la terapia con presión negativa. *Dermatología Rev Mex*, 182-187.
20. Dong, L. C., Hoffman, A. S., & Yan, Q. (1994). Dextran permeation through poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 473-484.
21. Drury, J. L. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 4337-4351.
22. Elbadawy A., K., Kenawy, E.-R. S., & Xin, C. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 5-7.
23. El-Sherbiny, I. M., & Yacoub, M. H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and practice*, 316-342.
24. Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Recent advances and emerging treatments. *BMJ*, 962-965.
25. Escobar, J. L., García, D. M., Zaldivar, D., & Katime , I. (2002). Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana Polímeros*, 1-25.

26. Incropera, F. P. y De Witt, D. P : *Fundamentos de Transferencia de Calor*, 4a Ed, Pearson Educación, México, 2000.
27. Fairand, B. P. (2002). *Radiation sterilization for health care product*. London: CRC press.
28. Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2018). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 343-346.
29. Fonder, M. A., Lazarus, G. S., Cowan, D. A., Aronson-Cook, B., Kohli, A. R., & Mamelak, A. J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *American Academy of Dermatology*, 185-206.
30. Garriga A. (2002). *Reología de espesantes celulósicos para pinturas al agua: modelización y mecanismo de espesamiento asociativo*. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona.
31. Gil Lozaga, P. E. (2011). *Cultivo de Células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid: Visión libros.
32. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N., J. Scott, J. H., & Joy, D. C. (2018). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Nueva York: Springer.
33. González Torres, M., Leyva Gómez, G., Rivera, M., Krötzsch, E., Rodríguez Talavera, R., Leonor Rivera, A., & Cabrera Wrooman, A. (2018). Biological activity of radiation induced collagen polyvinylpyrrolidone PEG hydrogels. *Materials Letters*, 224-227.
34. Gopal Venkatesh, S., Averineni Ranjith, K., Yogendra Nayak Usha, Om Prakash Ranjan, Kishore Ginjupalli, Sureshwar Pandey, & Nayababhirama Udupa. (2010). Enhanced dissolution and bioavailability of gliclazide using solid dispersion techniques. *International Journal of Drug Delivery*, 49-57.
35. Guarán Corredor, C., Santamaría, P. Q., & Landínez Parra, N. S. (2013). Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Rev. Fac. Med.*, 441-448.
36. Gunatillake A, P., & Adhikari, R. (2003). Biodegradable Synthetic Polymers for tissue engineerinn. *European Cells and Materials*, 1-16.
37. Herrera López V.H. (2017). *Reología de fluidos complejos considerando una cinética de microestructuras*. (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional.
38. Hennink, W., & van Nostrum, C. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 223-236.

39. Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18-23.
40. Hosgood, G. (2006). Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Vet Clin Small Anim*, 667-685.
41. Yannas, I. V, Lee, E., Orgill, D. P. and Skrabut, E. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, 86, 933–937.
42. Rnjak-Kovacina, Wise S. G., Li Z., Maitz P. K. M, Young C. J., Wang Y. and Weiss A. S., *Biomaterials*, 2011, 32, 6729–6736.
43. Jeffcoate, W. J., Price, P., & Harding, K. G. (2004). Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism research and reviews*, 78-89.
44. Jinot, J., Fritz, J., Vulimiri, S., & Keshava, N. (2018). Carcinogenicity of ethylene oxide: key findings and scientific issues. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 386–396.
45. Rosiak J.M., & Ulan Ski P. (1999). Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry* , 139-151.
46. Kloth, L. C., & Feedar, J. A. (1988). Acceleration of Wound Healing with High Voltage, Monophasic, Pulsed Current. *Physical therapy*, 503-508.
47. Kokabi, M., Sirousazar, M., & Hassan, Z. M. (2007). PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*, 773-781.
48. Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). *Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 203-213.
49. Konovalova, M. V., Markov, P. A., Durnev, E. A., Kurek, D. V., Varlamov, V. P., & Popov, S. V. (s.f.). Preparation and biocompatibility evaluation of pectin and chitosan cryogels for biomedical application. *Journal of Biomedical Materials Research*.
50. Lárez Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* , 91-109.
51. Lee, C., Moturi, V., & Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, 88-98.
52. Leyva Gómez, G., González Torres, M., Muñoz Soto, R., Ríos Perez, A., Cerna Cortez, J., Pfeiffer, H., Rivera, A. L. (2018). Synthesis of gamma radiation-induced PEGylated cisplatin for cancer treatment. *RSC Advances*, 34718–34725.

53. Manzanares, M. V., & Horwitz, A. R. (2011). Cell Migration: An Overview. *Cell migration Developmental Methods and Protocols* (pág. 1-25). London: Humana Press.
54. Martín, M., Calpena, A., Fernández, F., Clares, B., Mallandrich, M., & Gálvez, P. (2015). Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 140-149.
55. Martin, P. (1997). Wound Healing Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 75-81.
56. Mehrdad, K., Mohammad, S., & Zuhair, M. (2006). PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*, 773-781.
57. Mikesch, L. M., Aramadhaka, L. R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C., & Fox, J. W. (2013). Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics*, 190-200.
58. Miller, A. A. (1954). Effect of Chemical Structure of Vinyl Polymers on Crosslinking and Degradation by Ionizing Radiation. *Journal of Polymer Science*, 503-504.
59. Mithieux, S. M., Raskob, J., & Weiss, A. (2004). Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers. *Biomaterials*, 4921-4927.
60. Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2006). Elastin. *Advances in protein Chemistry*, 438-453.
61. Mitrofan, L., Palii, C., Estaquier, J., & Montreuil, J. (2005). Novel Fluorescence Assay Using Calcein-AM for the Determination of Human Erythrocyte Viability and Aging. *Cytometry Part A*, 78-84.
62. Murakami, K., Aoki, H., Nakamura, S., Nakamura, S., Takikawa, M., Hanzawa, M., Ishihara, M. (2010). Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 83-90.
63. N. Annabi, S. M. Mithieux, A. S. Weiss and F. Dehghani, Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 2009, 30, 1–7.
64. Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 762-798.
65. Nettles, D. L., Chilkoti, A., & Setton, L. A. (2010). Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1479-1485.
66. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 27986–28006.

67. Ortiz Lucio, E., Antonio Cruz, R., Cruz Gómez, J., Mendoza, A., & Morales Cepeda, A. B. (2006). Síntesis y caracterización de hidrogeles obtenidos a partir de acrilamida y metilcelulosa. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 247-253.
68. Osswald, T., & Rudolph, N. (2015). *Polymer Rheology*. Munich: Hanser Publications.
69. Palastanga, N., Field, D., & Soames, R. (2000). *Anatomía y movimiento humano. Estructura y funcionamiento*. Barcelona: Paidotribo.
70. Peniche, C., Zaldívar, D., Pazos, M., Páz, S., Bulay, A., & Román, J. S. (1993). Study of the thermal degradation of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) by thermogravimetry–FTIR. *Journal of Applied Polymer Science*.
71. Peterszegi, G., Texier, S., & Robert, L. (1999). Cell death by overload of the elastin–laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *European Journal of Clinical Investigation*, 166-172.
72. Loh Q. L and Choong C., *Tissue Eng. - Part B Rev.*, 2013, 19, 485–502.
73. Rnjak, J., Wise, S. G., Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2011). Severe Burn Injuries and the Role of Elastin in the Design of Dermal Substitutes. *Mary Ann Liebert, Inc* , 81-91.
74. Robert, L. (1998). Mechanisms of Aging of the Extracellular Matrix: Role of the Elastin-Laminin Receptor. *Gerontology*, 307-317.
75. Rodríguez Cabello, J. C. (2018). Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 118-133.
76. Rojas, O., Briceño, M., & Avedaño, J. (2012). *Fundamentos de Reología*.
77. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Londres: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
78. Hollister S. J., Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.*, 2005, 4, 518–524.
79. Sai K, P., & Babu, M. (2000). Collagen based dressings. *Burns*, 54-62.
80. Sakurada, I., & Ikada, Y. (1964). Effects of Degree of Polymerization on Crosslinking of Poly(Vinyl Alcohol) in Aqueous Solutions. 22-31.
81. Salem Z, C., Pérez , J. A., Henning L, E., Uherek P, F., Schultz O, C., Butte B , J. M., & González F, P. (2000). Heridas. Conceptos generales. *Cuad. Cir*, 90-99.

82. Samouillan, V., Dandurand-Lods, J., Lamure, A., Maurel, E., Lacabanne, C., Gerosa, G., Spina, M. (1999). Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprotheses. *John Wiley & Sons*, 532-538.
83. Segura, T., Arzate, M., León, F., Ortega, A., Burillo, G., & Peralta, R. (2016). Synthesis of narrow molecular weight distribution polyvinyl acetate by gamma rays initiated RAFT/MADIX miniemulsion polymerization. *Polymer*, 183-191.
84. SEM. [En línea]. Disponible en: <https://dayinlab.com/2015/03/22/burj-khalifa-el-nanohilo/sem/>
Consultado el: 18/10/2018 Hora: 16:34 p.m.
85. Siedlecki, C. A. (2018). Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications. *Woodhead publishing*.
86. Simnick, A. J. (2007). Biomedical and Biotechnological Applications of Elastin-Like Polypeptides. *Polymer Reviews*, 121-154.
87. Singer, A. J. (1999). Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, 738-746.
88. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Ciudad de Mexico: Cengage Learning.
89. Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Nueva York: CRC Press.
90. Sousa, M. P., Nieto, A. I., Correia, T. R., Miguel, S. P., Matsusaki, M., Correia, I. J., & Mano, J. F. (2018). Bioinspired multilayer membranes as potential adhesive patches for skin wound healing. *Biomaterials Science*, 1-14.
91. Suárez, L. F., Tulande, J., Mina, J. H., & Peñaranda, J. (2014). Desarrollo de apósitos de quitosano para su posible aplicación en la regeneración de tejido epitelial. *Revista Colombiana de Materiales*, 56-63.
92. Tabata, Y., Miyao, M., Ozeki, M., & Ikada, Y. (2000). Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *Journal of Biomaterials Science*, 915-930.
93. Tecnología de plásticos [Publicación en un blog]. (2012, 3 enero). Disponible en: <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/01/polivinilpirrolidona.html> Consultado el: 04/11/2018 Hora: 17:22.

94. Than, M., Smith, R. A., Hammond, C., Kelly, R., Marsh, C., Maderal, A. D., & Kirsner, R. S. (2012). Keratin-based Wound Care Products for Treatment of Resistant Vascular Wounds. *The journal of Clinical Aesthetic Dermatology*, 31-35.
95. Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *Journal of polymer Science*, 832-864.
96. Van der Veen, V. C. (2010). Biological background of dermal substitutes. *Burns*, 305-321.
97. Vela Anaya, G., Stegensek Mejía, E. M., & Leija Hernández, C. (2018). Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc*, 105-114.
98. Venegas Vásconez, D. (2017). Calorimetría diferencial de barrido. *Research Gate*.
99. Wang, M., Duan, X., Xu, Y., & Duan, X. (2016). Functional Three-Dimensional Graphene/Polymer Composites. *ASC Nano*.
100. Ward, M. A., & Georgiou, T. K. (2011). Thermo responsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*, 1215-1242.
101. Young-Chang Nho, Jong-Seok Park, & Youn-Mook Lim. (2014). Preparation of Poly(acrylic acid) Hydrogel by Radiation Crosslinking and Its Application for Mucoadhesives. *Polymers*, 891-897.
102. Zhao, L., Xu, L., Mitomo, H., & Yoshii, F. (2006). Synthesis of pH-sensitive PVP/CM-chitosan hydrogels with improved surface property by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 473-480.