



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DE UN BIOPOLÍMERO
OBTENIDO POR IRRADIACIÓN GAMMA A BASE DE QUITOSANO Y
POLOXÁMERO 407 PARA LA REPARACIÓN DE HERIDAS EXCISIONALES**

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICAS FARMACÉUTICAS BIÓLOGAS

PRESENTAN
ABIGAIL MADRID MARTÍNEZ
ERIKA ROCIO SANTILLAN REYES



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profesor: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
VOCAL: Profesor: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ
SECRETARIO: Profesor: GERARDO LEYVA GÓMEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS
2° SUPLENTE: Profesor: CARLOS JUÁREZ OSORNIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE TEJIDO CONJUNTIVO. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y ATENCIÓN DE QUEMADOS “CENIAQ”, INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”. MÉXICO DF, MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Gerardo Leyva Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. René Fernando Abarca Buis

SUSTENTANTES:

Abigail Madrid Martínez

Erika Rocio Santillan Reyes

A Dios y a nuestros padres.

“Lo que sabemos es una gota de *agua*; lo que ignoramos es el *océano*”.

Isaac Newton

Algunas amistades son eternas

*Algunas veces encuentras en la vida
una amistad especial:
ese alguien que al entrar en tu vida
la cambia por completo.
Ese alguien que te hace reír sin cesar;
ese alguien que te hace creer que en el mundo
existen realmente cosas buenas.
Ese alguien que te convence
de que hay una puerta lista
para que tú la abras.
Esa es una amistad eterna...*

*Cuando estás triste
y el mundo parece oscuro y vacío,
esa amistad eterna levanta tu ánimo
y hace que ese mundo oscuro y vacío
de repente parezca brillante y pleno.
Tu amistad eterna te ayuda
en los momentos difíciles, tristes,
y de gran confusión.*

*Si te alejas,
tu amistad eterna te sigue.
Si pierdes el camino,
tu amistad eterna te guía y te alegra.
Tu amistad eterna te lleva de la mano
y te dice que todo va a salir bien.*

*Si tú encuentras tal amistad
te sientes feliz y lleno de gozo
porque no tienes nada de qué preocuparte.
Tienes una amistad para toda la vida,
ya que una amistad eterna no tiene fin.*

Pablo Neruda

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación está organizado en once secciones (I – XI), en las cuales se muestran diferentes aspectos del proyecto, cada uno de ellos desarrollado de lo general a lo particular.

Inicia con la sección I integrada por un breve resumen que muestra el panorama general de la investigación realizada, seguida de la sección II con una introducción al tema, en donde se habla de la situación actual con respecto a la problemática de las heridas.

La tercera sección (III) es la de antecedentes, la cual está subdividida en cuatro capítulos que presentan diferentes temas relacionados al tratamiento de heridas cutáneas; en el primero, se menciona la anatomía y fisiología de la piel, la definición de una herida y el proceso de reparación que sigue el cuerpo humano para poder resolver lesiones profundas cutáneas, independientemente de su etiología.

El segundo capítulo está relacionado a los materiales que se utilizan como auxiliares en la curación de heridas o tejidos lesionados, se habla de su clasificación, componentes, aplicaciones terapéuticas, y las ventajas de cada uno de ellos, especialmente de los hidrogeles. En este mismo capítulo, se explican los fundamentos de las técnicas de caracterización fisicoquímica, antimicrobiana y antimicótica, a las cuales se someten los diferentes materiales para conocer las propiedades y el comportamiento que presentan o desarrollan.

El siguiente capítulo, aborda las generalidades de los materiales en estudio: propiedades físicas, químicas, biológicas e importancia clínica de un polímero natural, el quitosano, y un polímero sintético, el poloxámero 407. Finalmente, en el capítulo cuatro se señalan las aplicaciones de la irradiación gamma, principalmente para la obtención de apósitos para heridas.

A continuación, se presentan los objetivos y la hipótesis que fueron la base de la investigación, conformando las secciones VI y V respectivamente.

La sexta sección (VI) es la de procedimiento experimental, en la cual se muestran los materiales y equipos utilizados, y se explica la metodología llevada a cabo para cada una de las técnicas de caracterización fisicoquímica, biológica, e histológica de los hidrogeles utilizados.

La siguiente sección (VII), contiene los resultados obtenidos en forma de tablas, gráficos, figuras y pruebas estadísticas. Se divide en dos partes, en primer lugar se expone una breve descripción de las características físicas de las muestras con las que se trabajó, se presentan los resultados y análisis de cada una de las pruebas fisicoquímicas realizadas, y finalmente se muestran las pruebas antimicrobianas y antimicóticas. La segunda parte, presenta los resultados y análisis de la evaluación *in vivo*, con una descripción macroscópica e histológica de las heridas a las que se les aplicaron los tratamientos, así como los resultados correspondientes a las pruebas de inmunofluorescencia.

La sección VIII da a conocer las conclusiones del proyecto y la sección IX, las perspectivas del mismo. En la penúltima sección (X) se encuentran las referencias consultadas para la elaboración de este trabajo ordenadas de forma numérica; y finalmente, la última sección está conformada por una serie de anexos que complementan la investigación (sección XI).

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIX
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
1. Anatomía y fisiología de la Piel.....	5
2. Heridas	8
3. Proceso de reparación de heridas.....	8
3.1. Fase inflamatoria	8
3.2. Fase de proliferación	14
3.3. Fase de remodelación	17
4. Apósitos para heridas	21
5. Hidrogeles	25
5.1. Hidrogeles físicos.....	26
5.2. Hidrogeles químicos	26
5.3. Clasificación de los hidrogeles.....	28
5.4. Desarrollo de los hidrogeles.....	28
5.5. Hidrogeles naturales	29
5.6. Hidrogeles sintéticos.....	30
5.7. Hidrogeles mezclados.....	31
5.8. Aplicaciones farmacéuticas.....	32
6. Caracterización fisicoquímica	33
6.1. Pruebas de pH y precipitación	33
6.2. Microscopía electrónica de barrido	34
6.3. Calorimetría diferencial de barrido	36
6.4. Gelificación	39
6.5. Reología (viscosidad)	41
6.6. Captación de humedad.....	46
6.7. Bioerosión/Hinchamiento	47
7. Pruebas antimicrobianas/antimicóticas	49
7.1. Microbiología de las heridas	50
8. Quitosano	51
8.1. Origen y obtención del quitosano.....	51
8.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas.....	52
8.3. Aplicaciones farmacéuticas.....	57
9. Poloxámeros.....	61
9.1. Poloxámero 407.....	62
9.2. Aplicaciones.....	63
10. Aplicación de irradiación Gamma en polímeros	68
10.1. Síntesis de nuevos polímeros por irradiación gamma	69
10.2. Aplicaciones de la irradiación gamma en la obtención de nuevos polímeros para su aplicación en la cicatrización de heridas	72
IV. OBJETIVOS	74
V. HIPÓTESIS	74
VI. METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL	75
11. Lista de equipos, materiales y reactivos empleados.....	75
11.1. Equipos de laboratorio.....	75

11.2.	Materiales de laboratorio	75
11.3.	Reactivos	76
11.4.	Material biológico	77
11.5.	Anticuerpos	77
11.6.	Fármacos	77
12.	Preparación de las muestras	79
12.1.	Hidrogel de poloxámero 407 (25%p/v; P-407):	79
12.2.	Solución de quitosano (0.75% p/v; CH):	79
12.3.	Hidrogel de poloxámero 407+quitosano (mezcla física; CH+P).....	79
12.4.	Hidrogel de poloxámero 407- quitosano (mezcla irradiada; CH-P 4).....	79
12.5.	Hidrogel de poloxámero 407–quitosano irradiado a pH =7 (mezcla irradiada a pH de 7; CH-P 7)	80
13.	Pruebas de pH y precipitación	80
14.	Liofilización de las muestras.	80
15.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	80
16.	Calorimetría Diferencial de Barrido	81
17.	Tiempo y temperatura de gelación	81
18.	Determinación de los perfiles de viscosidad	82
19.	Prueba de captación de humedad.	82
20.	Prueba de bioerosión/hinchamiento	83
20.1.	Obtención del suero sanguíneo:	84
21.	Pruebas antimicrobianas/antimicóticas	85
22.	Evaluación <i>in vivo</i>	86
22.1.	Animales	86
22.2.	Creación de las heridas.	86
22.3.	Aplicación del tratamiento.....	87
22.4.	Criterios de inclusión.	87
22.5.	Criterios de eliminación.	87
22.6.	Criterios de exclusión	88
22.7.	Tamaño de la muestra.....	88
22.8.	Descripción de las variables de estudio.....	88
23.	Documentación de las heridas y su porcentaje de cierre.	88
23.1.	Medición de las áreas de las heridas.....	88
24.	Registro del peso de los animales.	89
25.	Técnicas histológicas	89
25.1.	Fijación, inclusión y corte de los tejidos	89
25.2.	Tinción de H&E para el análisis histomorfológico de las heridas.....	90
25.3.	Tinción Tricrómica de Masson para observar la matriz de colágena	91
25.4.	Tinción de Herovici para distinguir el tipo de colágena de la matriz	93
25.5.	Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de neutrófilos	94
25.6.	Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de macrófagos	95
25.7.	Inmunofluorescencia para analizar la expresión de α -SMA por fibroblastos activados.....	97
25.8.	Inmunofluorescencia para analizar la expresión de TGF- β_3	97
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
26.	Descripción de las muestras	99
27.	Pruebas de pH y precipitación	101
28.	Microscopía electrónica de barrido	103
29.	Calorimetría diferencial de barrido	105

30.	Temperatura y tiempo de gelificación.....	108
31.	Pruebas de viscosidad	112
32.	Prueba de captación de humedad.	116
33.	Bioerosión/Hinchamiento	118
34.	Pruebas antimicrobianas/antimicóticas.	122
35.	Porcentaje de cierre de las heridas	127
36.	Peso de los animales.	131
37.	Tinciones histológicas	133
37.1.	Tinción de H&E para el análisis histomorfológico de las heridas.....	145
37.2.	Tinción Tricrómica de Masson para observar la matriz de colágena	148
37.3.	Tinción de Herovici para distinguir el tipo de colágena de la matriz	151
38.	Pruebas de Inmunofluorescencia	154
38.1.	Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de neutrófilos	154
38.2.	Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de macrófagos	158
38.3.	Inmunofluorescencia para analizar la expresión de α -SMA.....	163
38.4.	Inmunofluorescencia para analizar la expresión de TGF- β 3	169
38.5.	Resultados de la cuantificación de la marca positiva para los diferentes anticuerpos empleados en las pruebas de inmunofluorescencia utilizando el programa Fiji Is just ImageJ.....	173
VIII.	CONCLUSIONES.....	175
IX.	PERSPECTIVAS.....	178
X.	REFERENCIAS.....	180
XI.	ANEXOS	196

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Costo unitario promedio por proceso de atención médica en función del tipo de herida	4
Figura 2. Representación gráfica de las partes de la piel de forma transversal.	7
Figura 3. Representación gráfica de las fases del proceso de reparación de heridas de piel.	20
Figura 4. Clasificación de apósitos para heridas.	21
Figura 5. Ejemplos de enlaces químicos / físicos formados entre hidrogeles y los tejidos circundantes.	26
Figura 6. Representaciones de hidrogeles formados por: A. gelificación física y B. gelificación química .	27
Figura 7. Microscopio electrónico de barrido y sus componentes.	36
Figura 8. Diagrama de las partes de un instrumento de DSC y ejemplo de termograma obtenido.	38
Figura 9. Proceso de gelificación.	39
Figura 10. Diagrama de un fluido en flujo constate simple. Para conocer el comportamiento viscoso de un líquido es necesario determinar el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación. Estas cantidades dependen del área de contacto, de la fuerza (F) necesaria para mover la placa superior a una velocidad (V) constante v y de la separación (L) entre las placas a una presión, temperatura y volumen constante.	42
Figura 11. Curvas de fluidez y viscosidad para diferentes tipos de fluidos.	43
Figura 12. Representación de un hidrogel ideal que absorbe exudados y libera agua en la zona de la herida.	46
Figura 13. Hinchamiento de los hidrogeles.	47
Figura 14. Mecanismos de degradación química.	48
Figura 15. Estructura química de la celulosa, la quitina y el quitosano.	52
Figura 16. Diagrama esquemático que muestra el posible mecanismo de degradación del quitosano por (A) lisozima y (B) NAGasa en el cuerpo humano	54
Figura 17. Resultados obtenidos de un estudio realizado en quemaduras de piel de rata para conocer el efecto de un hidrogel de quitosano.	58
Figura 18. Resultados de la aplicación de un hidrogel de quitosano de alto peso molecular y DD en quemaduras de piel realizadas en el área dorsal de ratas	59
Figura 19. Estructura química de los copolímeros no iónicos de tres bloques “poloxámeros”	61
Figura 20. Formación de micelas poliméricas de P-407 para la incorporación de fármacos	63
Figura 21. Resultados mostrados en un estudio para la aplicación tópica de un gel de P-407 contra un grupo control de solución salina.	66
Figura 22. Se observa una mayor contracción del cierre de heridas y una mejor resolución de las mismas tanto macroscópica como microscópicamente en el grupo tratado con el poloxámero, al realizar la comparación con el grupo control.	67
Figura 23. Síntesis de hidrogeles mediante polimerización tridimensional	69
Figura 24. Síntesis de hidrogeles mediante entrecruzamiento de polímeros solubles en agua	70
Figura 25. A) Decaimiento del Cobalto 60 y B) el alcance de los rayos gamma.	70
Figura 26. Mecanismo de entrecruzamiento de polímeros en solución acuosa	71
Figura 27. Evaluación de los hidrogeles irradiados de quitosano/gelatina en un modelo de rata mediante heridas cutáneas de espesor total	73
Figura 28. Diagrama de la metodología.	78
Figura 29. Heridas excisionales en los ratones de la cepa CD1.	87
Figura 30. Imagen de los materiales desarrollados, A) P-407, B) CH, C) CH+P, D) CH-P 4, E) CH-P 7.	99
Figura 31. En la parte superior de la imagen se muestran los materiales desarrollados a su pH original, y en la parte inferior se muestran ajustados a un pH de 7.	101
Figura 32. Estructura de la trietanolamina, amina terciaria.	102
Figura 33. Representación esquemática de la posible red conformada por el P-407 y el Quitosano	103
Figura 34. SEM. CH a 500X, barra = 50µm	103
Figura 35. SEM. CH a 1000X, barra = 20µm	103
Figura 36. SEM. P-407 a 500X, barra = 50µm	103
Figura 37. SEM. P-407 a 1000X, barra = 20µm	103
Figura 38. SEM. CH+P a 500X, barra = 50µm	104
Figura 39. SEM. CH+P a 1000X, barra = 20µm	104
Figura 40. SEM. CH-P 4 a 500X, barra = 50µm	104
Figura 41. SEM. CH-P 4 a 1000X, barra = 20µm	104
Figura 42. SEM. CH-P 7 a 500X, barra = 50µm	104
Figura 43. SEM. CH-P 7 a 1000X, barra = 20µm	104

Figura 44. Termograma obtenido por DSC para las diferentes muestras, a la izquierda se aprecia completa, y a la derecha hay un acercamiento.....	106
Figura 45. Acercamiento del termograma obtenido por DSC para los hidrogeles.....	107
Figura 46. Representación gráfica en donde una solución coloidal de baja viscosidad pasa a ser un gel “fenómeno de transición sol-gel”.....	109
Figura 47. Gráfico en donde se representan los valores de tiempo y temperatura de gelación de cada una de las muestras.....	110
Figura 48. Representación del P-407 cuando A) se encuentra a una temperatura menor a la de formación de las micelas, y B) a una temperatura mayor a la de formación micelar.....	112
Figura 49. Gráfico de viscosidad del hidrogel P-407; “ <i>Fluido Tixotropico</i> ”.....	113
Figura 50. Gráfico de viscosidad del hidrogel CH+P; “ <i>Fluido Tixotropico</i> ”.....	113
Figura 51. Gráfico de viscosidad del hidrogel irradiado a pH de 4. Se pierde la tixotropía.....	114
Figura 52. Gráfico de viscosidad del hidrogel irradiado a pH de 7. Se pierde la tixotropía.....	114
Figura 53. Representación gráfica del fenómeno de tixotropía presentada por un hidrogel.....	115
Figura 54. Gráfica del comportamiento de los diferentes hidrogeles a las distintas humedades relativas del medio.....	117
Figura 55. Gráfica de porcentaje de Bioerosión y/o hinchamiento mostrado por los distintos geles.....	119
Figura 56. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria <i>E. coli</i> , para cada una de las muestras desarrolladas.....	123
Figura 57. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria <i>S. aureus</i> , para cada una de las muestras desarrolladas.....	123
Figura 58. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria <i>P. aeruginosa</i> , para cada una de las muestras desarrolladas.....	124
Figura 59. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra el hongo <i>C. albicans</i> , para cada una de las muestras desarrolladas.....	124
Figura 60. Fotografías macroscópicas que muestran la fase inicial de la herida excisional de espesor total y su resolución a los 3, 7 y 11 días posteriores a su realización al tratarlas con cada una de las muestras.....	127
Figura 61. Gráfica de dispersión en donde se presenta el porcentaje de cierre (contracción) de las heridas desde los 0 hasta los 11 días.....	129
Figura 62. Gráfico del peso de los animales, desde los 0 hasta los 11 días de tratamiento.....	132
Figura 63. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x.....	145
Figura 64. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x.....	146
Figura 65. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x.....	147
Figura 66. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x.....	148
Figura 67. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x.....	149
Figura 68. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x.....	150
Figura 69. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x.....	151
Figura 70. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x.....	152
Figura 71. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x.....	153
Figura 72. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona de la herida al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	155
Figura 73. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona superficial de la herida al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	156
Figura 74. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona superficial de la herida al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	157
Figura 75. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	160
Figura 76. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	161

Figura 77. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	162
Figura 78. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 10x. No se observa expresión de α -SMA que esté relacionada con fibroblastos activados en ninguno de los grupos estudiados.	166
Figura 79. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de la región superficial de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	167
Figura 80. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de la región superficial de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	168
Figura 81. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF- β_3 de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	170
Figura 82. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF- β_3 de la región superficial de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	171
Figura 83. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF- β_3 de la región superficial de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x.....	172
Figura 84. Porcentaje de neutrófilos presentes en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11	173
Figura 85. Porcentaje de macrófagos presentes en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11	173
Figura 86. Área total positiva para α -SMA de las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11	174
Figura 87. Porcentaje de expresión de TGF- β_3 en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11	174
Figura 88. Diagrama que muestra los pasos básicos para realizar una inmunohistoquímica.....	240
Figura 89. Diagramas de Jablonski que muestran (A) los niveles de energía de un átomo fluorescente hipotético, y (B) los niveles de energía de una molécula orgánica hipotético	241
Figura 90. Espectro de fluorescencia molecular que ilustra la ampliación de las líneas espectrales debido a los niveles de energía vibracionales y el desplazamiento de Stoke entre los picos máximos de excitación.....	242
Figura 91. Elementos que componen al Microscopio de epi-iluminación. A: Fuente de luz o lámpara de arco, objetivo/condensador y filtro cubo; y B partes que integran al filtro cubo: excitación (2), el espejo dicróico (3) y barrera (4).....	244
Figura 92. Espectros de excitación y emisión de diferentes fluoróforos: DAPI, Texas Red®, FITC y Alexa Fluor 488.	245
Figura 93. Estructuras de los fluoróforos Texas Red ®, DAPI, FITC y Alexa Fluor® 488	249

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores de crecimiento y citocinas producidos durante el proceso de reparación de heridas de piel, las células que los producen y su función	13
Tabla 2. Tipos de apósitos, su descripción y ejemplos.	23
Tabla 3. Polímeros hidrofílicos utilizados para sintetizar matrices de hidrogel.	29
Tabla 4. Polímeros sintéticos más utilizados para la elaboración de hidrogeles para aplicaciones biomédicas	30
Tabla 5. Clasificación de los diferentes tipos de fluidos, ejemplos y representación de sus curvas de fluides y viscosidad	45
Tabla 6. Aplicación del quitosano para el desarrollo de diferentes formas farmacéuticas y administración de fármacos.....	57
Tabla 7. Resumen de los efectos en el proceso de reparación de heridas de diferentes preparaciones de quitosano en estudios realizados in vitro e in vivo	60
Tabla 8. Ejemplos de algunos tipos de poloxámero y sus aplicaciones sugeridas.....	61
Tabla 9. Aplicaciones farmacéuticas del Poloxámero 407	64
Tabla 10. Concentración del glicerol y el porcentaje de humedad relativa que cada solución proporciona.....	83
Tabla 11. Tratamientos aplicados y días de evaluación.....	87
Tabla 12. Descripción y características de las muestras obtenidas.....	99
Tabla 13. Entalpía y puntos de fusión obtenidos mediante DSC, de las distintas muestras.	108
Tabla 14. Valores obtenidos para la temperatura y el tiempo de gelación de las distintas muestras.....	109
Tabla 15. Resultados del análisis estadístico para la comparación de los resultados obtenidos de cada una de las muestras en la prueba de temperatura y tiempo de gelación.	111
Tabla 16. Componentes del suero sanguíneo humano.....	118
Tabla 17. Halos de inhibición mostrados por las diferentes muestras, en el test de difusión en agar.....	122
Tabla 18. Valores numéricos de los porcentajes de cierre de herida mostrados por cada uno de los grupos tratados con las diferentes muestras a los días 3, 7 y 11	128
Tabla 19. Ficha de datos de seguridad del quitosano	196
Tabla 20. Propiedades físicas y químicas del Poloxámero 407	197
Tabla 21. Información toxicológica del Poloxámero 407.	197
Tabla 22. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH+P para calcular la temperatura de gelación.....	198
Tabla 23. Resultados de la temperatura y la viscosidad de P-407 para calcular la temperatura de gelación.....	198
Tabla 24. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH-P 7 para calcular la temperatura de gelación.....	199
Tabla 25. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH-P 4 para calcular la temperatura de gelación.....	199
Tabla 26. Datos del tiempo y temperatura de gelación obtenidos para las distintas muestras.	200
Tabla 27. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH+P.	200
Tabla 28. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH-P 4.	200
Tabla 29. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH-P 7.	201
Tabla 30. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P y CH-P 4.	201
Tabla 31. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P y CH-P 7.	202
Tabla 32. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P 4 y CH-P 7.	202
Tabla 33. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH+P.....	203
Tabla 34. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH-P 4.....	203
Tabla 35. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH-P 7.....	204
Tabla 36. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH+P y CH-P 4.....	204
Tabla 37. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH+P y CH-P 7.	205
Tabla 38. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH-P 4 y CH-P 7.	205
Tabla 39. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el P-407.	206
Tabla 40. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH+P.	207
Tabla 41. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH-P 4.	208
Tabla 42. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH-P 7.	209
Tabla 43. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el P-407.....	210
Tabla 44. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH+P.....	211
Tabla 45. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH-P 4.	212

Tabla 46. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH-P 7.	213
Tabla 47. Resultados obtenidos de la prueba de bioerosión/hinchamiento para las distintas muestras.	214
Tabla 48. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	215
Tabla 49. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	215
Tabla 50. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	215
Tabla 51. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	215
Tabla 52. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	216
Tabla 53. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	216
Tabla 54. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	216
Tabla 55. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	216
Tabla 56. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	216
Tabla 57. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	217
Tabla 58. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	217
Tabla 59. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.	217
Tabla 60. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 20% (P<0.05).	217
Tabla 61. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 20%.	217
Tabla 62. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 30% (P>0.05).	218
Tabla 63. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 40% (P>0.05).	218
Tabla 64. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 50% (P>0.05).	218
Tabla 65. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 60% (P<0.05).	218
Tabla 66. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 60%.	218
Tabla 67. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 70% (P<0.05).	219
Tabla 68. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 70%.	219
Tabla 69. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 80% (P>0.05).	219

Tabla 99. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 10 ($P < 0.05$).	225
Tabla 100. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 11 ($P < 0.05$).	225
Tabla 101. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con SS a los días 3, 7 y 11.	226
Tabla 102. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con SS a los días 3, 7 y 11.	226
Tabla 103. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con P-407 a los días 3, 7 y 11.	226
Tabla 104. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con P-407 a los días 3, 7 y 11.	226
Tabla 105. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH a los días 3, 7 y 11.	227
Tabla 106. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH a los días 3, 7 y 11.	227
Tabla 107. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH+P a los días 3, 7 y 11.	227
Tabla 108. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH+P a los días 3, 7 y 11.	227
Tabla 109. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.	228
Tabla 110. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.	228
Tabla 111. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.	228
Tabla 112. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.	228
Tabla 113. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 3 ($P > 0.05$).	229
Tabla 114. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 7 ($P < 0.05$).	229
Tabla 115. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 7.	229
Tabla 116. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 11 ($P > 0.05$).	229
Tabla 117. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 118. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 119. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 120. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 121. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 122. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 ($P > 0.05$).	230
Tabla 123. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 3 ($P > 0.05$).	231
Tabla 124. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 7 ($P < 0.05$).	231
Tabla 125. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 7.	231
Tabla 126. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 11 ($P > 0.05$).	231
Tabla 127. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 ($P < 0.05$).	232

Tabla 128. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11.....	232
Tabla 129. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	232
Tabla 130. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11.....	232
Tabla 131. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	232
Tabla 132. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11.....	232
Tabla 133. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	233
Tabla 134. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	233
Tabla 135. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.....	233
Tabla 136. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	233
Tabla 137. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.....	233
Tabla 138. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 3 (P>0.05).....	234
Tabla 139. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 7 (P>0.05).....	234
Tabla 140. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 11 (P>0.05).....	234
Tabla 141. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	234
Tabla 142. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.....	234
Tabla 143. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	235
Tabla 144. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	235
Tabla 145. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	235
Tabla 146. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	235
Tabla 147. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.....	235
Tabla 148. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).....	236
Tabla 149. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.....	236
Tabla 150. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 3 (P>0.05).....	236
Tabla 151. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 7 (P>0.05).....	236
Tabla 152. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 11 (P>0.05).....	236
Tabla 153. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	237
Tabla 154. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	237
Tabla 155. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).....	237

Tabla 156. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 ($P>0.05$).....	237
Tabla 157. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 ($P>0.05$).	237
Tabla 158. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 ($P>0.05$).	237

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%p/v	Porcentaje peso volumen
°C	Grados celsius
°F	Grados Fahrenheit
⁶⁰ Co	Cobalto 60
A	Adenina
Å	Armstrong
AAc	Ácido acrílico
AAm	Acrilamida
AIBN	2,2-azo-isobutironitrilo
Al	Aluminio
AN	Acrilonitrilo
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
C	Carbono
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
c.b.p.	Cuanto baste para
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation)
CE50	Concentración efectiva 50
CH	Quitosano
CH	Solución de quitosano
CH+P	Hidrogel de poloxámero 407 + Quitosano (mezcla física)
CH-H	Quitosano de alto peso molecular
CH-L	Quitosano de bajo peso molecular
CH-M	Quitosano de mediano peso molecular
CH-P 4	Hidrogel irradiado de poloxámero 407 con Quitosano (mezcla irradiada a pH de 4.66)
CH-P 7	Hidrogel irradiado de poloxámero 407 con Quitosano y ajustado a un pH=7 (mezcla irradiada a pH de 7)
CHy	Solución de quitosano irradiado a 25 KGy
CIM	Concentración mínima inhibitoria

CL50	Concentración letal 50
cm	Centímetro
CMC	Concentración micelar crítica
CM-CH	Carboximetil-quitosano
CMT	Temperatura de concentración micelar crítica
-CONH-	Amida secundaria
-CONH₂	Amida primaria
-COOH	Grupo carboxilo
cps	Centipoise
Cu	Cobre
CXC	Quimiocina
D	Velocidad de deformación
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DD	Grado de desacetilación
DL50	Dosis letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMA	Etil metacrilato
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramos
G´	Módulo elástico, de almacenamiento o de cizallamiento
G´´	Módulo viscoso, de pérdida o fluencia
GEMA	Glucosiletil metacrilato
GlcN	D-glucosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
h	Hora
<i>h</i>	Constante de Planck

HA	Ácido hialurónico
HCl	Ácido clorhídrico
HEMA	Hidroxoetil metacrilato
Hg	Mercurio
HMIS	Sistema de Identificación de Materiales Peligrosos (Hazardous Materials Identification System)
HMPA	Hidroxietil metacrilato
HNO₃	Ácido nítrico
HR	Humedad relativa
IL	Interleucina
IR	Infrarrojo
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramos
kGy	Kilograys
M	Concentración molar, Molaridad
mBar	Milibar: unidad de presión equivalente a 10 ⁻² Pascales
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
MIP-1α	Proteína quimioatrayente de macrófagos
mL	Mililitros
MMA	Metil metacrilato
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MPa	Megapascal
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
NAGasa	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
NaOH	Hidróxido de sodio
NCCLS	Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínica
NFPA	Asociación Nacional para la protección de Incendios (National Fire Protection Association)
NH	Hidrógeno unido a un nitrógeno del grupo acetoamida
NH₂	Grupo amina
NH₃⁺	Ion amonio

NHS	Sistema Nacional de Saludo del Reino Unido
Ni	Níquel
NIPAAm	N-isopropil acrilamida
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
O	Oxígeno
O=C	Grupo carbonilo
-OH	Grupo hidroxilo
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P-407	Poloxámero 407
PBO	Poli-(óxido de butileno)
PCL	Policaprolactona
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Poli-(etilenglicol)
PF	Propilen fumarato
pH	Potencial de hidrógeno
pH	-Log [h ⁺]
PHB	Poli-(hidroxi butirato)
pKa	-Log ka
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido-poliláctico-co-glicólico
PM	Peso molecular
PNVP	Poli-(N-vinilpirrolidona)
POE	Poli-(óxido de etileno)
pp	Precipitación (precipitado)
PPO	Poli-(óxido de propileno)
PVA	Poli-(vinilalcohol)
PVAc	Poli-(vinilacetato)
QY	Número de fotones de fluorescencia emitidos por fotón de excitación absorbido
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies Reactivas de oxígeno

rpm	Revoluciones por minuto.
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S₀	Estado fundamental
SD	Ratas sprague-dawley
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
SMA	Actina de Músculo Liso
S_n	Nivel de energía, en donde n es número cuántico principal; estado singlete
-SO₃H	Grupo sulfónico
T	Timidina
T/temp.	Temperatura
T_{gel}	Temperatura de gelación
t_{gel}	tiempo de gelación
TGF	Factor de crecimiento transformante
T_n	Estado triplete
TNF	Factor de Necrosis tumoral
TPF	Éster tetrafluorofenilo
U	Uracilo
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WVTR	Tasa de transmisión de vapor de agua
Zn	Zinc
λ	Longitud de onda
μ	Viscosidad
μm	Micrómetro
v	Frecuencia
τ	Esfuerzo cortante

I. RESUMEN

La piel es una barrera que cubre y protege los órganos internos de cuerpo. Al ser un órgano externo, es propensa a sufrir lesiones. Cuando ocurre una lesión profunda, se presenta un proceso de reparación que consta de una fase inflamatoria, una fase de proliferación y una fase de remodelación que resultan en una cicatriz. Actualmente, existen diferentes tratamientos que aceleran la reparación y mejoran la resolución de la cicatriz. Tal es el caso de los hidrogeles hechos a base de polímeros, que proporcionan humedad al lecho de la herida y reducen el dolor. Se ha observado que el quitosano (CH) y el poloxámero 407(P-407) han servido como auxiliares en la reparación de las heridas, y que la aplicación de irradiación Gamma a una dosis ≥ 25 kGy a mezclas de hidrogeles mejora sus propiedades fisicoquímicas y produce un entrecruzamiento de los polímeros que potencializa su actividad terapéutica. En este trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica de un hidrogel obtenido por irradiación gamma a base de quitosano y poloxámero 407, y se evaluaron los efectos de su aplicación tópica en heridas excisionales de espesor total realizadas en el dorso del ratón. Los materiales que se evaluaron fueron: CH 0.75%p/v, P-407 25%p/v, una mezcla de P-407 25%p/v con CH 0.75%, y esta última irradiada a 25 KGy a su pH original (4) y a pH neutro (7).

Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica mediante las pruebas de pH y precipitación, microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido, temperatura y tiempo de gelificación, perfil de viscosidad, absorción de agua o captación de humedad, bioerosión/hinchamiento, y pruebas antimicrobianas, en las cuales se puso en evidencia las propiedades de los compuestos e hidrogeles; especialmente el del hidrogel con la mezcla de polímeros antes y después de ser sometido a irradiación gamma. En estas pruebas se observó que la irradiación en el hidrogel mantiene la característica de la termorreversibilidad inversa, hace posible el ajuste a un pH neutro sin exhibir un fenómeno de precipitación, cambia su morfología, disminuye los valores de la entalpía y punto de fusión, aumenta el tiempo y temperatura para su gelificación, no altera su comportamiento de liberación de agua en atmósferas de 20 a 90% de HR, mejora sus propiedades de hinchamiento, proporcionando un entorno húmedo propicio, y presentan propiedades antimicrobianas/antimicóticas contra microorganismos que se encuentran frecuentemente en el lecho de las heridas.

La reparación de las heridas se analizó macroscópicamente, determinando el porcentaje de cierre, y microscópicamente por las tinciones histológicas de H&E, Masson y Herovici, y por pruebas de inmunofluorescencia utilizando marcadores moleculares para evaluar el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos por la expresión de elastasa y de F4/80 respectivamente; la activación de los fibroblastos por α -SMA, y la expresión de TGF- β_3 , como un indicador molecular de la calidad de la cicatriz. Las heridas tratadas con el gel irradiado a pH de 7 presentaron ligeramente un mayor porcentaje de cierre de la herida al día 3 en comparación con los otros tratamientos. Se encontró un mayor reclutamiento de macrófagos, un incremento en la expresión de α -SMA, y una aceleración de la formación del tejido de granulación y del depósito de la matriz extracelular en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados. Estos resultados muestran que los hidrogeles irradiados incrementan el reclutamiento de macrófagos, que promueven la activación temprana de los fibroblastos, resultando en un mayor depósito de colágena tipo I y en una maduración acelerada de la herida.

Los resultados obtenidos sugieren que los hidrogeles irradiados, presentan buenas propiedades estructurales, mecánicas, y biológicas que los hacen candidatos para la aplicación como apósitos en heridas.

II. INTRODUCCIÓN

La piel humana provee una barrera efectiva contra la penetración microbiana y su subsecuente infección; sin embargo, al ser un órgano externo, es propensa a sufrir lesiones físicas y mecánicas recurrentes. Cuando se presenta una lesión dérmica, el riesgo de contraer una infección es mayor, además de que los tejidos internos quedan expuestos a factores potencialmente dañinos. Por este motivo, el cierre y reparación de las heridas después de un evento traumático o una cirugía son de vital importancia en el área clínica y la investigación [1], el correcto tratamiento de las mismas, dará como resultado una cicatrización adecuada.

En este sentido, el tratamiento de las heridas requiere de diferentes tipos de materiales como auxiliares en la prevención de infecciones y promoción de una rápida cicatrización para obtener resultados tanto funcionales como cosméticos-estéticos; entre los más comunes se encuentran los vendajes, gasas, algodón, soluciones desinfectantes y material quirúrgico. Hoy en día las suturas siguen siendo la técnica más utilizada para el cierre de las heridas; sin embargo, tiene diversas desventajas (su colocación requiere anestesia, puede inducir infecciones, dañar el nervio, provocar reacciones inflamatorias, formar granulomas y cicatrices, y es un método que requiere de conocimientos y ciertas habilidades) [2].

Por otro lado, el manejo de las heridas es una práctica muy costosa en todos los países y representa una enorme carga para los recursos sanitarios; estudios han calculado que el costo del tratamiento de heridas en el Servicio Nacional de Salud (NHS: sistemas de salud financiados con fondos públicos en los países del Reino Unido) es de alrededor mil millones de £ *al año*, [1], asimismo, en México se ha estimado que el costo *mensual* de la atención rebasa el millón de pesos mexicanos sólo en instituciones de primer nivel de atención. La figura 1, muestra el costo unitario promedio por proceso de atención médica en el tratamiento de las diferentes heridas, en esta se observa que el pie diabético, las quemaduras y la úlcera de pierna, son los procesos más costosos ya que su atención supera el millón de pesos. [3]. Para reducir este costo, los productos para el tratamiento de heridas necesitan ser lo más económicos y eficaces posibles.

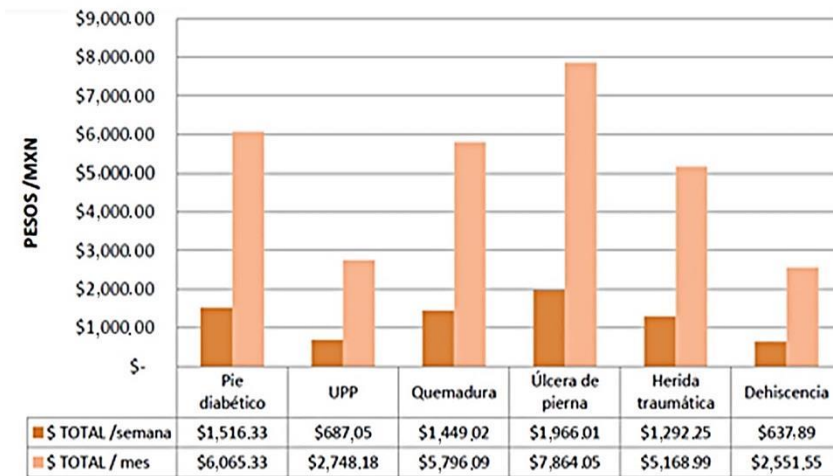


Figura 1. Costo unitario promedio por proceso de atención médica en función del tipo de herida [3].

Debido a estas razones, varios biopolímeros han generado interés por el gran número de aplicaciones biomédicas que presentan [1], dentro de las cuales el desarrollo de apósitos ha tenido un crecimiento notable en los últimos años gracias a su capacidad para formar hidrogeles. Actualmente, los hidrogeles son considerados como materiales esenciales para el tratamiento y reparación de las heridas debido a sus propiedades físicas y químicas modificables, entre ellas, capacidad de adhesión a los tejidos, fuerza mecánica para mantenerse intacto y posteriormente ser removido, proveen una completa oclusión en la herida, y actúan como una barrera contra las infecciones por bacterias; además, estos materiales pueden absorber el exudado y mantener una humedad adecuada para un cierre rápido de la herida. Asimismo, se ha observado que dos polímeros con la capacidad de formar hidrogeles: el quitosano (CH) y el poloxámero 407(P-407) han servido como auxiliares en la reparación de las heridas, y que la aplicación de irradiación Gamma a mezclas de hidrogeles produce un entrecruzamiento de los polímeros que potencializa su actividad terapéutica.

El presente trabajo busca desarrollar un hidrogel mediante un método novedoso para la obtención de apósitos utilizando polímeros de fácil adquisición, que consiste de una mezcla de CH y P-407 entrecruzados por radiación gamma con el objetivo de mejorar la reparación de heridas excisionales, como una alternativa viable para el tratamiento de heridas y llevar a cabo su caracterización mediante pruebas fisicoquímicas, pruebas antimicrobianas, y la evaluación *in vivo* con el posterior análisis histológico y pruebas de inmunofluorescencia.

III. ANTECEDENTES

1. Anatomía y fisiología de la Piel

La piel cubre la superficie externa del cuerpo, y es el órgano más grande en área y peso. Tiene un papel importante en muchas funciones:

- Termorregulación, regulación homeostática de la temperatura.
- Protección, al ser una barrera que cubre los tejidos internos de los vertebrados tiene la capacidad de proteger al cuerpo de factores potencialmente dañinos, por mencionar algunos ejemplos, invasión microbiana, daño térmico, químico, mecánico y osmótico. Adicionalmente, contribuye a la homeostasis de los fluidos inhibiendo la evaporación de agua, gracias a los lípidos presentes en la superficie de la piel, protegiendo al cuerpo de la deshidratación.
- Detección sensorial.
- Tiene propiedades que permiten la absorción, la permeabilidad selectiva de productos químicos y la excreción a través del sudor de pequeñas cantidades de sales, amonio y urea [4].

Los tejidos que componen a la piel son la epidermis, la dermis y la hipodermis [5], (figura 2).

Epidermis

La epidermis forma la capa superficial de la piel [5] y es una estructura compuesta por un epitelio estratificado escamoso queratinizado [4]. Contiene células epiteliales, también conocidas como queratinocitos, los cuales se encuentran sobre una lámina basal subyacente; células de Merkel que funcionan como mecanorreceptores; melanocitos que definen el color de la piel; y las células de Langerhans que son células presentadoras de antígeno del sistema inmune de la piel [6]. Es importante mencionar que la epidermis no contiene vasos sanguíneos, por ello, los nutrientes celulares provienen de un proceso de difusión desde la dermis subyacente [7].

Esta capa provee protección al cuerpo en distintas maneras: la queratina protege del calor, la abrasión y sustancias químicas, las uniones estrechas de los queratinocitos son una defensa contra la invasión de microorganismos tales como bacterias, virus, parásitos y otros organismos [8], representa una barrera impermeable que permite

controlar la pérdida de agua gracias a los lípidos, y protege contra los efectos nocivos de la luz UV por acción de la melanina [4]. Además, las terminaciones nerviosas aferentes para la sensación de tacto, presión, temperatura, así como el dolor, también llegan a la epidermis [6].

La epidermis está compuesta de cinco capas celulares distintas. Estas capas incluyen (de la más superficial a la profunda) el estrato córneo, el estrato lúcido, el estrato granuloso, el estrato espinoso y el estrato germinativo. Las células del estrato basal experimentan continuamente división celular para producir nuevos queratinocitos, estas células nuevas migran paulatinamente hacia la superficie para poblar las capas más externas de la epidermis [4]. A medida que migran hacia la superficie, se diferencian, maduran, sintetizan y depositan intracelularmente queratina y lípidos, adquiriendo una apariencia plana [8]. Subyacente y separada de la epidermis por una membrana basal, se encuentra la dermis [5].

Dermis

La dermis es un tejido conectivo denso compuesto principalmente de MEC rica en colágena y elastina que son sintetizadas por los fibroblastos, el principal componente celular de la dermis [6], Proporciona flexibilidad y fuerza a la piel; está irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos, y densamente innervada, tanto por el sistema nervioso aferente, así como el eferente motor. En la dermis se encuentran apéndices de origen epidérmico como el complejo pilosebáceo, el cual consta del folículo piloso, el músculo piloerector y la glándula sebácea; también se encuentran las glándulas sudoríparas, cuya función es regular el equilibrio de líquidos y electrolitos, y la temperatura. [9].

Los fibroblastos constituyen la mayoría de las células en la dermis junto con los mastocitos y los macrófagos. Los fibroblastos dérmicos ayudan a controlar la producción y mantenimiento de los componentes estructurales dominantes de la dermis [8], principalmente colágena, que se forma por agregación de polipéptidos individuales de colágena, conocidos como procolágena, que son sintetizados y exportados a la MEC. El proceso de agregación es facilitado por proteoglicanos, otro producto de los fibroblastos.

La mayoría de la colágena en la dermis es de tipo I y constituye hasta el 80% de la colágena de la piel. La colágena tipo III constituye alrededor del 15%, mientras que la

tipo V y VI constituyen el resto. La relación típica de colágena de tipo I con respecto a la de tipo III es 4:1. Esta relación se mantiene incluso en cicatrices después del proceso de reparación de heridas [8].

Hipodermis

La hipodermis es la capa debajo de la dermis formada por adipocitos, fibroblastos y macrófagos, la cual contiene una gran cantidad de tejido adiposo vascularizado que contribuye tanto a la termorregulación como a las propiedades mecánicas de la piel [5].

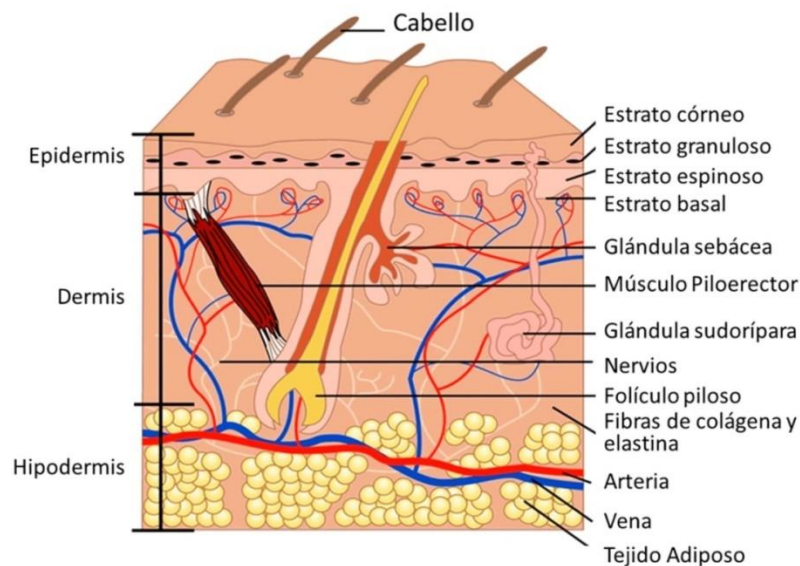


Figura 2. Representación gráfica de las partes de la piel de forma transversal. [10]

Como se mencionó, la piel es propensa a sufrir lesiones físicas y mecánicas. Si se presenta una lesión profunda, es decir, una lesión que afecte la dermis, dará inicio un proceso de reparación que tiene como resultado final una cicatriz.

2. Heridas

Una herida es la ruptura de la integridad epitelial de la piel; las heridas se clasifican como agudas o crónicas y luego se subdividen en subcategorías, tales como las úlceras por presión, úlceras venosas de la pierna, úlceras de pie diabético, heridas traumáticas y heridas quirúrgicas, [11], algunas enfermedades como la diabetes y la isquemia y condiciones tales como la desnutrición, envejecimiento, infección local y el daño tisular local debido a las quemaduras, demora la cicatrización de heridas.

3. Proceso de reparación de heridas

El proceso de reparación de heridas o cicatrización, es una serie dinámica de acontecimientos que implican la interacción coordinada de células de la sangre y de la piel, proteínas, proteasas, factores de crecimiento, y componentes de la matriz extracelular [12], cuyo objetivo inmediato es lograr la integridad del tejido [13]. El proceso de reparación de heridas puede dividirse en tres fases que se superponen en tiempo y espacio: (1) fase inflamatoria; (2) fase de proliferación; y (3) fase de remodelación [12], las cuales se describirán a continuación (la figura 3 muestra una imagen de las tres fases del proceso de cicatrización y los principales eventos que ocurren en cada una de ellas).

3.1. Fase inflamatoria

De acuerdo con Benavides, la fase inflamatoria inicia inmediatamente después de que ocurre una lesión en la piel y presenta dos eventos importantes, uno vascular donde el objetivo principal es la hemostasia y otro celular, en el que células, principalmente leucocitos, llegan al sitio de la herida [14].

3.1.1. Hemostasia

Se conoce como hemostasia a la prevención de una hemorragia espontánea y al control de una hemorragia de origen traumático. El mecanismo hemostático es un sistema primario de defensa del organismo, que tiene como principal función mantener la integridad vascular y al mismo tiempo evitar la pérdida de sangre al exterior; mediante la producción de la protrombina a trombina la cual convierte el fibrinógeno en

fibrina, formando el coágulo de sangre; y posteriormente, eliminar el exceso de fibrina e inhibir la actividad de los factores de coagulación activados [15].

El coágulo o matriz provisional, además de actuar como barrera contra microorganismos, funciona como reservorio de factores de crecimiento y citocinas, y como soporte para la migración y proliferación celular de queratinocitos, fibroblastos, y leucocitos [14].

La participación del sistema vascular en la hemostasia es mediante la vasoconstricción inmediata posterior a la lesión vascular y que permanece por 10 o 15 minutos. Este mecanismo tiene dos propósitos: evitar la pérdida de sangre a través de la herida y provocar variaciones en la velocidad y tipo de flujo sanguíneo. Esto se logra por medio de la liberación de sustancias con actividad vasoconstrictora como noradrenalina, adrenalina, y bradisinina [15].

Los principales elementos celulares que participan en la hemostasia son las plaquetas, las cuales intervienen en dos situaciones diferentes, la primera es que forman un trombo hemostático en el sitio de la lesión y la segunda es que proveen sustancias con actividad procoagulante para la formación de fibrina. Durante su activación, las plaquetas sufren una serie de cambios que llevan a la formación de un trombo plaquetario. Estos cambios comprenden la expresión de un mayor número de receptores de membrana, la adhesión al endotelio vascular, un cambio de forma (que consiste en una transformación esférica de la plaqueta con la aparición de pequeños pseudópodos), la síntesis de prostanglandinas y tromboxanos, la liberación del contenido de sus gránulos y por último, la agregación [15].

Cuando las plaquetas liberan el contenido de sus gránulos, secretan varias sustancias tales como fibronectina, fibrinógeno, histamina, serotonina, EGF y PDGF; por otro lado, la degranulación plaquetaria activa la cascada del complemento, específicamente C5, que es una proteína quimiotáctica potente de neutrófilos [12].

3.1.2. Inflamación

La inflamación tiene dos funciones esenciales cuyo objetivo principal es combatir la infección. La primera es suministrar moléculas y células efectoras, específicamente leucocitos, a los sitios de infección para la destrucción de microorganismos invasores, y la segunda es promover la reparación del tejido lesionado [16]; sin embargo, esta última

función es tema de controversia, ya que el mutante PU.1, el cual es incapaz de producir una respuesta inflamatoria porque carece de neutrófilos y macrófagos, repara incluso con mayor calidad sin formación de cicatriz [17].

Una vez que la hemostasia ha logrado su objetivo, se va presentar vasodilatación capilar y fuga de líquido plasmático rico en proteínas (conocido como un exudado) en el sitio de la lesión como resultado de la liberación secundaria local de histamina a partir de los gránulos de los mastocitos [12], la cual a su vez estimula de forma indirecta la producción de prostaglandinas [18]. Las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos, se activan para expresar moléculas de adhesión celular que promueven la unión de los leucocitos circulantes [16]. El aumento del flujo sanguíneo, la activación del endotelio y la permeabilidad vascular alterada permiten la migración de células inflamatorias al sitio de la herida [12].

La rápida respuesta inflamatoria comienza con la degranulación de las plaquetas que llegan a este sitio, así como la degranulación inducida por la lesión de los mastocitos residentes. Mediadores inflamatorios generados durante el proceso de coagulación, tales como fibrinopéptidos liberados del fibrinógeno y productos de degradación de fibrina, sirven para regular la expresión de importantes moléculas de adhesión intercelular; por otro lado, sustancias liberadas por los mastocitos, como el TNF- α , la histamina, proteasas, leucotrienos y citosinas representan fuentes de señales quimiotácticas [19]. Las células locales del sistema inmune, incluyendo a los macrófagos residentes, se activan en respuesta al daño, estas células, a su vez comienzan a producir mediadores importantes de la inflamación; como consecuencia y en respuesta a estas diversas señales, los niveles de sustancias quimioatrayentes para leucocitos se incrementan considerablemente, lo que provoca un mayor reclutamiento de estas células [20]. Macroscópicamente, la inflamación se manifiesta por eritema, calor, tumor y dolor [18].

Neutrófilos

Los polimorfonucleares son las primeras células en llegar al sitio de la herida. Son atraídos principalmente por TGF- β , PDGF, CXCL-8, C5a, los productos de degradación del fibrinógeno, la fibrina, el colágeno y la elastina [14]. Los neutrófilos son los

leucocitos más abundantes y dominantes en etapas tempranas de la cicatrización [20]. Se les considera como fagocitos de vida breve que circulan en la sangre [16].

Un par de horas después de la lesión, la mayor parte de los neutrófilos transmigran a través de la pared de las células endoteliales de los capilares sanguíneos, proceso que se conoce como extravasación, para llegar al sitio de la herida. Los neutrófilos reclutados comienzan el desbridamiento del tejido desvitalizado y la fagocitosis de agentes infecciosos [13]. Para realizar esta tarea, los fagosomas intracelulares que contienen a los microorganismos recién capturados, se fusionan con los gránulos, también llamados lisosomas, del neutrófilo. Éstos contienen diferentes sustancias antimicrobianas tales como enzimas hidrolíticas, oxidasas dependientes de NADPH [16], péptidos catiónicos, como las α -defensinas y eicosanoides, y proteasas como la catepsina G, elastasa y proteinasa 3 [13]. Los neutrófilos maduros no pueden reponer el contenido de sus gránulos, de modo que una vez que los usan, mueren por apoptosis y finalmente son fagocitados por los macrófagos [16].

Anteriormente, se creía que en ausencia de infección, los neutrófilos no eran necesarios para la reparación de una herida; sin embargo, diferentes estudios han demostrado que los neutrófilos sí tienen una función adicional además de la eliminación de microorganismos.

En un estudio realizado por Dovi et al. para investigar el papel de los neutrófilos en la reparación de las heridas, se observó que a pesar de que la reparación dérmica no se vio afectada por la eliminación de neutrófilos al utilizar antisuero de conejo, la reepitelización se aceleró significativamente. Los autores concluyen que los neutrófilos en el sitio de la herida inhiben directamente la migración de los queratinocitos y posiblemente su proliferación como consecuencia de la liberación de proteasas, las cuales pueden inducir un daño en el tejido. Por ejemplo, la elastasa y la proteinasa 3 son capaces de escindir la elastina y una variedad de proteínas de la MEC, incluyendo a la fibronectina [21].

Por otro lado, recientes estudios *in vitro* demostraron que los neutrófilos aislados de sitios de reparación pueden modular el fenotipo y el perfil de expresión de citocinas de los macrófagos [22]. Además, un informe reciente mostró que el cierre de heridas excisionales realizadas en ratones deficientes en CD18, se retrasó significativamente. Los autores especularon que la falta de neutrófilos apoptóticos en el sitio de la herida

priva a los macrófagos de su estímulo principal para secretar TGF- β_1 , un mediador clave implicado en la diferenciación de miofibroblastos [23].

Macrófagos

Los monocitos llegan poco después de los neutrófilos y los reemplazan. Son atraídos por fibronectina, C3a, C5a, trombina, TGF- β , PDGF, TGF- α , VEGF y MIP-1 α [18]. En los tejidos se transforman en macrófagos, cuya función es fagocitar neutrófilos apoptóticos, bacterias y otros microorganismos. La fagocitosis de los patógenos es facilitada por receptores de superficie del macrófago que se unen a ligandos específicos de la superficie microbiana. La combinación de opsonización para el complemento y la fagocitosis (destrucción del patógeno dentro del fagocito por medio de ROS, NO y péptidos antimicrobianos), por los macrófagos permite el reconocimiento y la destrucción de los microorganismos [16]. Predominan entre las 48 a 72 horas y pueden permanecer por días a semanas [18].

Los macrófagos participan en la última parte de la fase inflamatoria, regulando la llegada de otros monocitos y fibroblastos, y liberando PDGF, FGF, VEGF, TGF- α y β , factores que son importantes para la migración, proliferación celular y formación del tejido de granulación; iniciando de esta manera la transición a la fase de proliferación y remodelación [14]. Además, liberan las citocinas proinflamatorias, IL-1 β , IL-6 y TNF- α (ver Tabla 1) [16], por lo tanto, se dice que la producción de citocinas por los macrófagos perpetúa el proceso inflamatorio [18].

Las citocinas y factores de crecimiento son péptidos o glicoproteínas entre 5-30 kD, importantes para la señalización celular y están involucrados en diversas respuestas fisiológicas [24]. Se liberan transitoriamente, para modular el proceso de reparación mediante el control del crecimiento celular, la diferenciación, el metabolismo y la síntesis de proteínas [25]. La tabla 1 muestra un resumen de los factores de crecimiento y citocinas que son producidos por diferentes células durante el proceso de reparación de heridas y sus funciones más importantes.

Un estudio realizado en años anteriores, demostró que los macrófagos tienen un papel importante en el proceso de reparación de heridas. En él, la reducción de los niveles de macrófagos utilizando antisuero, tuvo como resultado una disminución del infiltrado de fibroblastos en la herida y una reducción de la fibrosis; así como niveles de

ANTECEDENTES

Proceso de reparación de heridas

fibrina elevados, y un retraso en la eliminación de fibrina, neutrófilos, eritrocitos y otros desechos [26]. Por otro lado, estudios realizados en ratones genéticamente modificados con niveles reducidos de macrófagos, muestran un retraso en el cierre de la herida [27] y en la reepitelización, defectos en la angiogénesis [28] con una reducción de la formación del tejido de granulación, alteraciones en la producción de citosinas y factores de crecimiento [29]., y pérdida de la diferenciación de fibroblastos y de la contracción de la herida [30]

Factor de crecimiento o citocina	Producida por	Función
TGF-β	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxis (neutrófilos, macrófagos y fibroblastos). Proliferación de fibroblastos Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Estimula la angiogénesis. Migración de queratinocitos. Formación del tejido de granulación. Depósito de colágena.
TGF-α	Macrófagos	Formación del tejido de granulación. Estimula la proliferación de células epiteliales y fibroblastos.
PDGF	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxis (neutrófilos, monocitos y fibroblastos) Proliferación de fibroblastos. Depósito de colágena. Induce el cambio de fenotipo a miofibroblastos.
FGF	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxis (células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos). Proliferación, migración y diferenciación de diversas células (fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales). Citoprotector. Estimula la angiogénesis. Depósito de componentes de MEC.
EGF	Plaquetas	Estimula la reepitelización.
VEGF	Neutrófilos, macrófagos, células endoteliales	Estimula la angiogénesis y linfangiogénesis.
TNF-α	Macrófagos, mastocitos, fibroblastos, queratinocitos, neutrófilos.	Quimiotaxis (Neutrófilos y macrófagos). Liberación de óxido nítrico. Induce cambios en el endotelio vascular (expresión de moléculas de adhesión celular)
IL-1β	Macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y NK.	Quimiotaxis. Estimula la producción de prostaglandinas y óxido nítrico. Expresión de moléculas de adhesión. Estimula la expresión de VEGF.
CXC-8	Células endoteliales, fibroblastos, monocitos, neutrófilos, linfocitos, células NK	Quimiotaxis (neutrófilos). Promueve la diapedésis de neutrófilos. Induce la liberación de histamina y leucotrienos. Estimula la angiogénesis.

Tabla 1. Principales factores de crecimiento y citocinas producidos durante el proceso de reparación de heridas de piel, las células que los producen y su función [13]; [16]; [31]; [32].

3.2. Fase de proliferación

La segunda fase del proceso de reparación de heridas es la de proliferación. Los principales eventos que se llevan a cabo en esta etapa son la fibroplasia, la reepitelización, la angiogénesis, [19] y la formación del tejido de granulación [12].

3.2.1. Fibroplasia

La fibroplasia describe un proceso que involucra la proliferación de los fibroblastos, su migración en la herida, y la producción de colágena nueva y otras proteínas de matriz que contribuyen a la formación de tejido de granulación [14]. Los fibroblastos en los bordes de la herida comienzan a proliferar, lo que provoca un incremento en la población de estas células, y aproximadamente cuatro días después de la lesión comienzan a migrar [19].

La migración de fibroblastos es estimulada principalmente por PDGF, TGF- β y la fibronectina; para que se lleve a cabo la migración celular, es necesaria la expresión de integrinas en la superficie celular que faciliten la interacción entre los fibroblastos y componentes de la MEC, principalmente fibrina, vitronectina, fibronectina y el ácido hialurónico [18]. La fibronectina es una glicoproteína y el principal componente de la matriz provisional después de la fibrina, que además promueve la actividad de los fibroblastos. La fibronectina permite la unión de los fibroblastos a la matriz extracelular y brinda una base adherente para la migración celular [19].

Durante la migración también es necesaria la expresión de enzimas que reconozcan y degraden los componentes de la MEC. Estas enzimas, conocidas como Metaloproteasas de Matriz (MMPs: MMP-1, -3 y -19), tienen adicionalmente otras funciones establecidas que incluyen la liberación de factores de crecimiento de la membrana celular o de la MEC, escisión de receptores de factores de crecimiento de la membrana celular, desprendimiento de moléculas de adhesión celular, disminución de la afinidad de las uniones colágena-integrina y la activación de otras MMPs [33].

Una de las funciones de los fibroblastos durante el proceso de reparación de heridas es el recambio de la matriz provisional compuesta principalmente de fibrina por una MEC permanente compuesta de colágena. La producción de colágena empieza aproximadamente 3 días después del daño y es estimulada por un gran número de factores de crecimiento, como PDGF, TGF, y FGF. La función de la colágena durante el

proceso de reparación de heridas, es incrementar la fuerza del tejido y facilitar el movimiento celular. En fases tempranas del proceso de reparación de heridas la proporción de colágena es diferente, donde la cantidad de colágena tipo 3 incrementa en un 30% [18].

3.2.2. Angiogénesis

La angiogénesis es el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes [34]. Este proceso se activa ante una lesión [18], y suministra nutrientes a la herida, además de contribuir a la formación del tejido de granulación. La angiogénesis se ha atribuido a muchas moléculas, incluyendo al FGF, VEGF, TGF- β , la angiogenina, la angiotropina, la angiopoyectina-1, TNF- α , y la trombospondina [12].

La angiogénesis comienza con la destrucción de la pared de los vasos preexistentes, la activación de la proliferación de células endoteliales y su migración de los vasos cercanos al sitio de la herida [34]. De acuerdo con Benavides, dos días después de que ocurre una lesión, las células endoteliales comienzan a migrar a lo largo de la matriz provisional de fibronectina, de manera similar a los fibroblastos. La migración de las células endoteliales es estimulada por VEGF, FGF, angiopoyectina y TGF- β ; y para que ésta ocurra, también es necesario que éstas expresen integrinas y MMPs.

Durante la migración de las células endoteliales, se van formando túbulos y eventualmente nuevos capilares [18]. Histológicamente se observa degradación de la membrana basal, proliferación celular, formación de estructuras vasculares, reconstrucción de la membrana basal y finalmente regresión e involución de la vasculatura [14].

3.2.3. Reepitelización

La reepitelización es el proceso por el cual se restaura la epidermis después de una lesión cutánea. El inicio de la reepitelización se produce horas después de la lesión [12]. Los cambios morfológicos que se observan durante la reepitelización son el desprendimiento de la escara y el restablecimiento de la epidermis sobre el tejido de granulación en formación [18]. Para la reepitelización es necesario que ocurra la migración, la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos adyacentes, así como

la restauración de la membrana basal conectada con la dermis subyacente en reparación [14].

Los queratinocitos que participan en el proceso de migración y la proliferación provienen de dos localidades distintas, la primera son células que se encuentran en los bordes de la herida y la segunda, células provenientes de la unidad pilo-sebácea [18]. Son estimulados para migrar, proliferar y diferenciarse por diversos factores que incluyen bajos niveles de calcio, altos niveles de magnesio, cambios de pH, e hipoxia; los factores de crecimiento que favorecen la reepitelización son EGF, FGF y TGF- β [14].

De acuerdo con Li. et. al., los elementos implicados en la migración de los queratinocitos son la MEC, receptores de integrinas, MMPs y factores de crecimiento. Los queratinocitos usan los receptores de integrinas de su membrana para interactuar con la matriz provisional, que al igual que con los fibroblastos, es necesaria para que migren las células. Durante la migración, ocurre una serie de eventos que incluyen: la elongación de los queratinocitos, el desarrollo de proyecciones similares a pseudópodos, y la pérdida de las uniones célula-célula y célula-matriz [19]. Se forma una estructura de queratinocitos migrantes similar a una lengüeta, donde los queratinocitos cercanos a ella aumentan su proliferación para asegurar la presencia de células que migren y cubran la herida [14].

Cuando termina la migración, posiblemente por inhibición de contacto, los queratinocitos se unen al substrato subyacente, reconstituyen la membrana basal, y después reanudan el proceso de diferenciación para generar una epidermis estratificada. Se puede observar que hay una monocapa de queratinocitos hacia el centro de la herida, mientras que hay multicapas de queratinocitos cerca de los bordes de la herida [19], estos queratinocitos comienzan a proliferar detrás de las células que migran activamente formando una estructura conocida como epitelio hiperproliferativo [35].

3.2.4. Tejido de Granulación

La fase proliferativa termina con la formación del tejido de granulación, cuyos componentes principales son: fibroblastos, colágena y vasos sanguíneos. Aproximadamente cuatro días después de la lesión, la matriz provisional de fibronectina

comienza a ser reemplazada. Este cambio morfológico se atribuye a la invasión de capilares que sirven de base para la aparición del tejido de granulación [18]. Los nuevos vasos sanguíneos proporcionan un fácil acceso a los macrófagos y fibroblastos, quienes continúan suministrando factores de crecimiento que estimulan aún más la angiogénesis y la fibroplasia [12].

3.3. Fase de remodelación

La remodelación tisular es la fase final del proceso de reparación de heridas y continúa durante 6-24 meses después de que se presentó la lesión inicial [36]. Esta última fase se caracteriza por la transición del tejido de granulación a la formación de una cicatriz. Las manifestaciones clínicas incluyen la contracción, disminución del enrojecimiento y grosor de la herida, y un aumento de la fuerza del tejido. Cerca de dos semanas después de la lesión, la herida empieza a contraerse, lo que resulta en una menor cantidad aparente de tejido cicatrizal [12].

3.3.1. Miofibroblastos

La contracción de la herida es realizada por fibroblastos activados que adquieren el fenotipo de células contráctiles, también conocidos como miofibroblastos. Estas células aparecen en el área de la herida a partir del cuarto día después de la lesión [18].

Los miofibroblastos son células mesenquimales con características de fibroblastos y células de músculo liso [37]. El sistema contráctil de los miofibroblastos está organizado en microfilamentos de actina que terminan en su superficie, en una asociación transmembranal con las fibras de fibronectina. Una vez desarrollado este sistema, los miofibroblastos pueden sostener una fuerza contráctil durante un largo período de tiempo. Este es generado por la tensión ejercida por las fibras en la matriz extracelular circundante, que produce una contracción local. Esta contracción se estabiliza por la deposición de matriz extracelular, principalmente, colágena de los tipos I, III, IV y V, glicoproteínas y proteoglicanos [38].

Los microfilamentos de los miofibroblastos contienen actina y miosina, así como proteínas asociadas típicas de las células del músculo liso. En particular, muestran la expresión de α -SMA, la isoforma de actina típica de las células situadas en la pared de los vasos, la cual funciona como biomarcador para fibroblastos activados [38]. La

expresión de α -SMA es controlada por el factor de crecimiento transformante β_1 (TGF- β_1) [39].

En un proceso normal de cicatrización de heridas de piel, la actividad contráctil de los miofibroblastos se termina cuando el tejido está completamente reepitelizado, en donde la expresión de α -SMA disminuye y las células entran en apoptosis; sin embargo, cuando existe una patología, la actividad de los miofibroblastos persiste a pesar de que el tejido ya está reparado, lo que conduce a su deformación y fibrosis, que es particularmente evidente en cicatrices hipertróficas [40].

3.3.2. Maduración de la cicatriz

La deposición de colágena por los fibroblastos continúa durante un período prolongado con un aumento neto que es alcanzado tres semanas después de la lesión del tejido. Cuando la herida se cierra, inicia la degradación de colágena tipo III por acción de las MMPs [19] y la síntesis de colágena tipo I aumenta [14].

Con el tiempo, la proporción de colágena tipo I se incrementa con respecto a la colágena tipo III, la cual disminuye de forma correspondiente al igual que la proporción de proteoglicanos y agua. También disminuye la cantidad de vasos sanguíneos en la herida y el número de fibroblastos, lo que resulta en una cicatriz menos roja y relativamente acelular. Otra característica asociada con cicatrices maduras es la falta de apéndices epidérmicos [18], por lo que el tejido resultante carece de folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas.

La cicatriz es el punto final fisiológico e inevitable del proceso de reparación de heridas en mamíferos. A pesar de que la cicatriz ofrece una restauración estable de la piel, la calidad del tejido nuevo es inferior con respecto a importantes aspectos estructurales, estéticos y funcionales del tejido original [13].

3.3.3. TGF- β y la resolución de la cicatriz

Existen tres isoformas de TGF- β : TGF- β_1 , 2, y 3. Los TGF- β s activos, ejercen sus funciones biológicas a través de la unión a un complejo de receptor heteromérico, el cual consiste de un receptor de tipo I y un receptor de tipo II [31]. Las tres isoformas de TGF- β presentan funciones que son distintas y necesarias para la reparación de las heridas, pero superpuestas.

ANTECEDENTES

Proceso de reparación de heridas

En un estudio realizado por Shah et. al. se evaluó la función de las diferentes isoformas de TGF- β , en heridas incisionales de ratas. Para esto, las heridas fueron tratadas con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β_1 y anti-TGF- β_2 , se observó una reducción significativa en la deposición de la matriz extracelular y una mejora de la arquitectura de la neodermis, lo que sugiere que el TGF- β_1 y β_2 endógenos inducen la cicatrización cutánea en animales adultos. Por otra parte, el tratamiento del mismo tipo de heridas con TGF- β_3 exógeno inhibió la formación de cicatrices con una mejor resolución de la herida, lo que indica que esta isoforma antagoniza el efecto de las otras [41].

Adicionalmente, se ha encontrado una sobreexpresión de TGF- β_1 en cicatrices hipertróficas, lo que sugiere una posible participación de este factor en su formación [42]; y una mayor expresión de TGF- β_3 en heridas fetales, las cuales se sabe desde 1970, reparan por un proceso regenerativo y no con la formación de una cicatriz [43].

ANTECEDENTES

Proceso de reparación de heridas

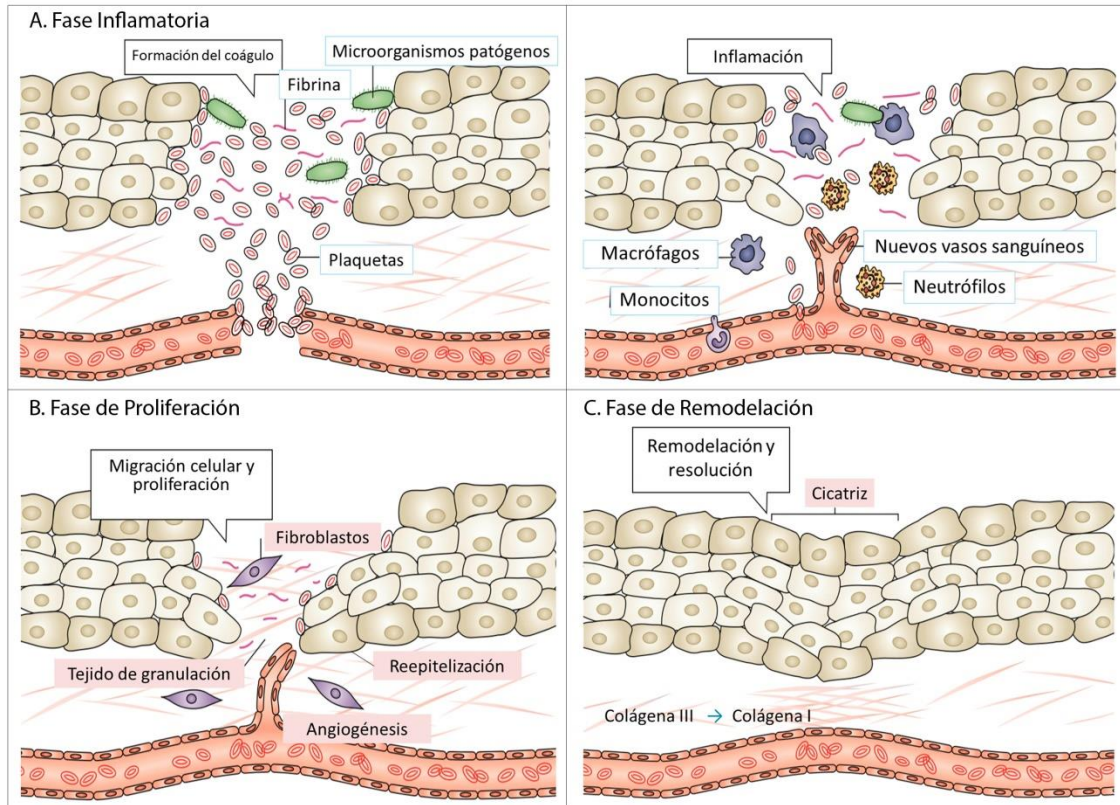


Figura 3. Representación gráfica de las fases del proceso de reparación de heridas de piel. FASE INFLAMATORIA. A (derecha) Formación del coágulo de fibrina que cubre la herida e inicio de la inflamación (A, izquierda). Los leucocitos son reclutados a la herida con el fin de eliminar los agentes patógenos y los desechos celulares. Nuevos vasos sanguíneos facilitan la migración de las células del sistema inmune y el transporte de oxígeno y nutrientes a la zona de la herida. B. FASE DE PROLIFERACIÓN. Las células epiteliales proliferan y migran con el fin de reepitelizar la herida. Los fibroblastos migran de los tejidos vecinos y sintetizan colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Los vasos sanguíneos recién formados, fibroblastos, miofibroblastos y fibras de colágeno forman el llamado tejido de granulación. C. FASE DE REMODELEACIÓN. La migración celular y la proliferación terminan cuando los bordes de la herida se juntan. MMPs son secretadas por las células que permanecen en el sitio de la herida para eliminar el tejido de granulación y promover la formación de tejido de cicatriz, donde hay un cambio del tipo de colágeno (tipo III por tipo I). La contracción del tejido conduce a la disminución de la cicatriz. [44].

4. Apósitos para heridas

Cuando las heridas son muy extensas o se relacionan a una condición patológica tal como la Diabetes mellitus o la insuficiencia venoso, el cierre de estas se torna muy complicado, por lo que se requiere de auxiliares o apósitos para una óptima resolución. La gran mayoría de estos apósitos suelen ser costos y requieren de otros procedimientos para lograr el cierre de estas heridas. Además no hay apósitos para lograr el cierre de estas heridas. Además no hay apósitos que promuevan una resolución de alta calidad que se refleje en una cicatriz prominente y más funcional.

Apósito es un término aplicado a una amplia variedad de materiales utilizados para la reparación de heridas o tejidos lesionados; es un complemento que se emplea en una herida con el fin de promover la cicatrización y prevenir la infección y el daño adicional. Los apósitos se pueden clasificar de diversas maneras (ver figura 4).

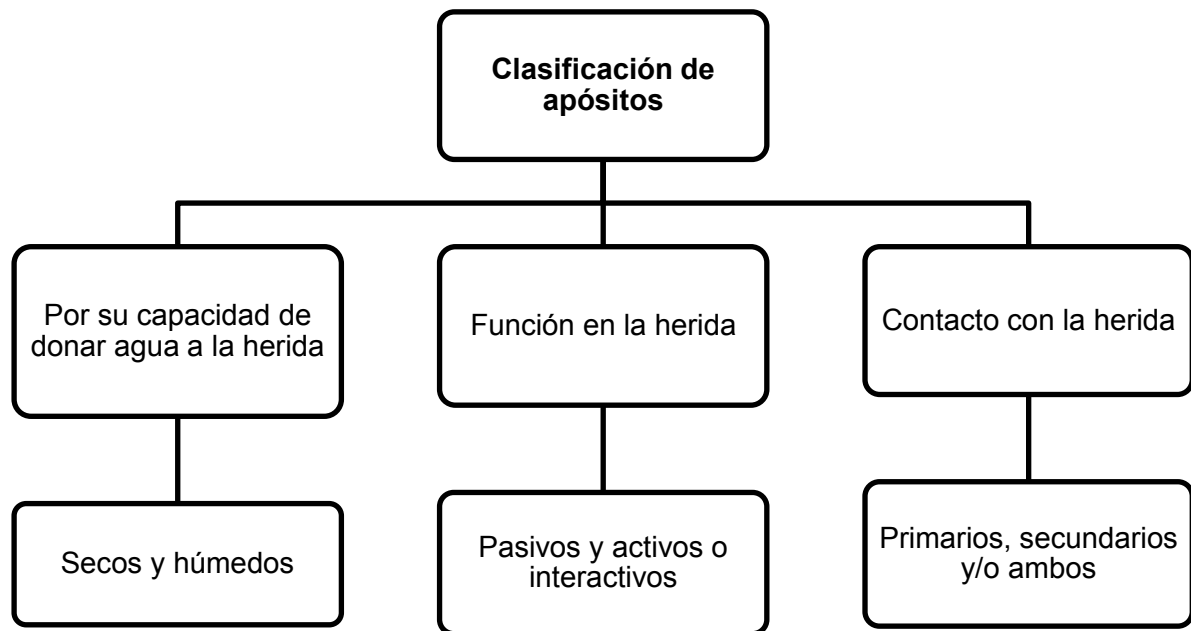


Figura 4. Clasificación de apósitos para heridas.

- **Secos y húmedos**, los primeros, se utilizan para cubrir las heridas, proporcionar soporte y limitar el paso de microorganismos, mientras que los húmedos ayudan en la cicatrización de heridas aumentando la tasa de

epitelización; estos apósitos mantienen a las células viables para que puedan liberar factores de crecimiento, modular o estimular su proliferación y migrar para optimizar la formación de nuevo tejido [1].

- **Pasivos y activos o interactivos.** Los apósitos pasivos simplemente proporcionan cobertura, mientras que los apósitos activos o interactivos son capaces de modificar la fisiología del entorno de la herida [1]. Los apósitos interactivos incluyen hidrocoloides, hidrogeles, alginatos, apósitos de espuma y apósitos antimicrobianos.
- **Primarios, secundarios y/o mixtos.** Un apósito primario está en contacto directo con la herida, puede proporcionar absorción de exudado y prevenir la desecación, infección y adherencia del apósito secundario en la herida. El apósito secundario se coloca sobre un apósito primario y brinda mayor protección, capacidad de absorción, compresión u oclusión. Los apósitos mixtos presentan características tanto de apósitos primarios como de secundarios [45].

ANTECEDENTES
Apósitos para heridas

Apósito	Descripción	Ejemplos
Gasa común	Para desbridar incisiones exudativas infectadas o necróticas, lo cual puede ser doloroso y a menudo contraproducente ya que causa la remoción del tejido de granulación y el neopitelio	Nexcare, Dibar, Gasana.
Gasa impregnada	Para reducir la adherencia a la incisión, la gasa se impregna con sustancias como el petróleo, parafina (vaselina), emulsión de petrolato, sales de zinc, o cloruro de sodio. Se utilizan en heridas con exudado abundante	Adaptic, NutraDress Mesalt
Películas (delgadas, transparentes, oclusivas o semioclusivas)	Indicados para heridas superficiales secas como un apósito primario, sin embargo se puede utilizar como un apósito secundario sobre apósitos primarios o vendajes de espuma en las heridas que exudan más. También pueden ayudar con la reducción de la fricción cuando se aplica a la piel intacta en las zonas vulnerables	C. View, Tegaderm®, Hydrofilm®, Opsite®
Algodón quirúrgico	Absorbente quirúrgico básico	Purified Cotton USP®
Gasa quirúrgica	Su función es proporcionar un material absorbente con suficiente resistencia a la tensión para un apósito quirúrgico.	Absorbent Gauze USP®
De Silicona	Son de fácil retirada, reducen el traumatismo y dolor en los cambios de apósito. Son de material hipoalergénico, con lo que hay menor probabilidad de efectos adversos.	Mepitel®, Cicacare®, Mepiform®, Mepilex®, Mepitac
Hidrogeles	Materiales poliméricos en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos. Indicado para heridas secas que requieren hidratación, necróticas y con exudado moderado.	Activheal®, Intrasite®, Actiform Cool®, Geliperm®, Vigilon®, y Flexderm®
Hidrocoloides	Son dispersiones de partículas alrededor de las cuales las moléculas de agua y iones solvatados forman una estructura como capa o cobertura. Están indicados para heridas con nivel de exudado bajo o moderado. Pueden promover el desbridamiento de heridas y la angiogénesis, reducir el dolor a través de mantener las terminaciones nerviosas húmedo y absorber el exceso de exudado.	Duoderm®, Comfeel®, Granuflex® y RepliCare®
Alginatos	Contienen calcio o ácido algínico. Están indicados en heridas de moderada a altamente exudativas. El componente de calcio dentro del apósito actúa como un hemostático y es por lo tanto útil en heridas sangrantes.	Sorbsan®, Algosteril®, Kaltostat®
Espumas	De poliuretano o silicona, les permite manejar grandes volúmenes de fluido de la herida. Indicadas en heridas de moderada a altamente exudativas. Se pueden utilizar en la parte superior de hidrogeles y cremas o como un apósito primario. Algunos han demostrado ser eficaces como agentes de relleno de la cavidad. Cuando se aplica a tales heridas, la espuma tiene la capacidad de absorber exudados, y mantiene una baja adherencia para facilitar su remoción sin dolor.	Allevyn®, Biatain®, Mepilex®, Tielle®

Tabla 2. Tipos de apósitos, su descripción y ejemplos [46] [45] [47].

ANTECEDENTES

Apósitos para heridas

Es importante, que un apósito no sólo realice la función que se indica en sus especificaciones, sino que también lo haga en un balance costo-efectivo. Un apósito o combinación de apósitos ideal, es uno que garantiza la curación óptima por: mantener una humedad y pH adecuados (para prevenir la desecación, permitir la migración celular, la granulación y reepitelización), eliminar el exceso de exudado de la herida (la humedad excesiva y las enzimas autolíticas pueden lesionar/macerar el tejido de reparación y proporcionar un cultivo perfecto para microorganismos), permitir el aislamiento térmico (reducir la pérdida de calor y mantener la temperatura a la que se producen las reacciones tisulares), e intercambio gaseoso (niveles adecuados de O₂ y CO₂ para la cicatrización), ajustable a la superficie de la herida, facilitar, cuando sea necesario el desbridamiento (el desbridamiento facilita la valoración de la herida, disminuye la probabilidad de infección y elimina el tejido necrótico que, de otra forma, retrasaría la formación de los tejidos de granulación y epitelización), minimizar la formación de cicatrices, impermeable a las bacterias extrañas, es decir, antimicrobiano, no tóxico /no alergénico, adhesivo pero no adherente para poder retirarlo sin causar trauma a la herida, es decir, que la separación sea sin dolor, suave al tacto y cómodo [11] [46] [48] [49] [47]. Estos apósitos disminuyen el dolor en el reposo, durante la deambulaci3n y durante los cambios de apósito. Al mismo tiempo, el ambiente húmedo permite una entrega rápida y eficiente de cualquier agente antimicrobiano añadido, evitando así que la herida se infecte. Por lo cual, los apósitos que crean y mantienen un ambiente húmedo son ahora considerados como los que proporcionan las condiciones óptimas para la curaci3n de heridas [1].

Todos los apósitos tienen sus propias ventajas y limitaciones, sin embargo los hidrogeles destacan entre todos, ya que presentan varias características que se necesitan en un apósito ideal para heridas, las cuales se abordarán en la siguiente secci3n.

5. Hidrogeles

Los hidrogeles están formados por polímeros reticulados tridimensionales hidrófilos y de origen natural o sintético [50] [51]. Se componen de una matriz de polímeros con aproximadamente 96% de contenido de agua (sistema coloidal). Esta clase de biomateriales (hidrogeles) combinan diversas ventajas para la reparación de heridas, tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, facilidad de aplicación, propiedades mecánicas ajustables, alto contenido de agua, adhesión controlada a tejidos, ambiente húmedo para la cicatrización, barrera a la penetración bacteriana, y una matriz para la administración de fármacos.

Estos hidrogeles pueden donar agua a la zona de la herida y proporcionar un ambiente húmedo, que ayuda en la rápida cicatrización de la herida, asimismo, debido a su alto contenido de agua, porosidad y consistencia blanda, simulan estrechamente el tejido vivo natural, más que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos. Adicionalmente se utilizan en la formación de los vehículos de liberación de fármacos, apósitos, lentes de contacto y como electrodos o sensores [52].

Los hidrogeles tienen la capacidad de absorber una fracción de exudado de la herida, transmiten vapor de humedad y oxígeno, pero su permeabilidad bacteriana y de líquido es dependiente del tipo de apósito secundario utilizado. Los hidrogeles se hinchan o contraen en soluciones acuosas debido a la asociación, disociación y la unión de varios iones a las cadenas de polímero. Estos sistemas pueden hincharse en agua hasta que alcanzan un estado de equilibrio. La absorción de agua por hidrogeles está asociada a la presencia de grupos químicos tales como -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH-, y -SO₃H la existencia de zonas capilares y las diferencias en la presión osmótica. Las fuerzas que hacen imposible la disolución de un hidrogel son: la presencia de enlaces covalentes, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas [1].

Estos materiales también pueden exhibir propiedades adhesivas debido a la incorporación de grupos funcionales dentro de sus estructuras, que pueden interactuar y enlazar con los tejidos circundantes (Fig.5); o formar redes interpenetrantes con los tejidos circundantes para anclar mecánicamente el material en su lugar [2].



Figura 5. Ejemplos de enlaces químicos / físicos formados entre hidrogel y los tejidos circundantes [2].

Los hidrogel son sintetizados por gelificación física o química (Fig.6), o por una combinación de ambos. La gelificación se produce cuando los polímeros solubles en agua se entrecruzan física o químicamente para formar una red tridimensional no soluble, en la cual el agua llena los espacios huecos entre las cadenas del polímero [2].

5.1. Hidrogel físicos

Los hidrogel son llamados “reversibles” o geles “físicos” cuando las redes de polímero se mantienen unidos por interacciones moleculares, y/o fuerzas secundarias como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, o fuerzas hidrofóbicas (Fig.6), las cuales juegan el papel principal en la formación de la red; estos hidrogel se puede formar en medios acuosos ya sea por interacciones no covalentes o por interacciones entre las cadenas de polímero, y por lo tanto no requieren el uso de agentes de reticulación, fuentes de radiación externa o aditivos. Debido a la naturaleza no covalente y reversible de las uniones de la red, los hidrogel físicos son generalmente débiles, a menudo reversibles y es posible disolverlos por cambios en las condiciones ambientales, tales como pH, fuerza iónica de la solución o temperatura [52] [2].

5.2. Hidrogel químicos

Por otra parte, los hidrogel son llamados “permanentes” o “químicos”, cuando las redes están reticuladas covalentemente (Fig.6). Los enlaces covalentes se forman ya sea por polimerización radical de monómeros o cadenas de polímero que producen radicales libres, que se recombinan, reticulan y forman una red, o

mediante reacciones de condensación/adición de macromoléculas reactivas, tales como amidación, esterificación, tioesterificación, la adición de Michael, la formación de base de Schiff, así como por reticulación enzimática. Los hidrogeles químicos son estables debido a las uniones permanentes en la red.

La ventaja de usar reticulación química para desarrollar hidrogeles es la capacidad de modificar fácilmente las propiedades mecánicas y adhesivas de los materiales mediante la alteración y el control de las estructuras poliméricas, los grupos funcionales en sus unidades de repetición, los tipos de entrecruzamiento y el proceso de reticulación [52] [2].

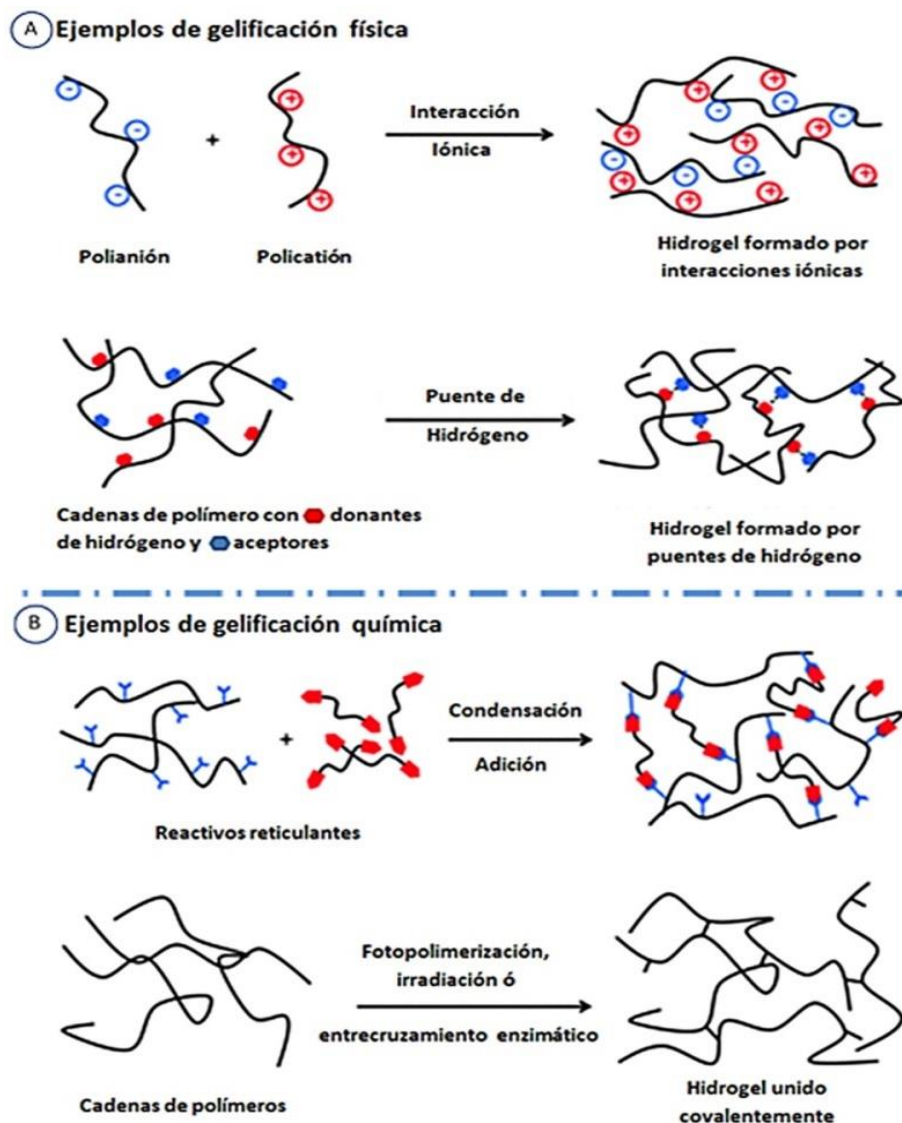


Figura 6. Representaciones de hidrogeles formados por: A. gelificación física y B. gelificación química [2].

5.3. Clasificación de los hidrogeles

Los hidrogeles se pueden clasificar como hidrogeles de homopolímeros, hidrogeles de copolímero, hidrogeles multipoliméricos, e hidrogeles poliméricos interpenetrantes. Los hidrogeles de homopolímeros son redes reticuladas de un polímero conformado por un solo tipo de unidad de monómero hidrófilo, mientras que los hidrogeles de copolímeros son producidos por la reticulación de cadenas poliméricas conformadas por unidades de comonómero, uno de los cuales debe ser hidrófilo. Los hidrogeles multipolímero son producidos por la reticulación de más de tres monómeros. Finalmente, los hidrogeles poliméricos interpenetrantes (entrecruzados) son producidos por el hinchamiento de una primera red de un monómero entrecruzado y la reacción de este último para formar una segunda estructura de red con otro monómero entrecruzado.

5.4. Desarrollo de los hidrogeles

Los hidrogeles se pueden hacer mediante radiación de alta energía, congelación-descongelación o métodos químicos como polimerización, reacciones de condensación, adición, reticulación enzimática y entrecruzamiento.

Varios polímeros naturales y sintéticos con buena biocompatibilidad se utilizan para desarrollar apósitos de hidrogel para heridas. Entre ellos se encuentran *polímeros naturales* tales como alginato, quitosano, gelatina y colágena y *polímeros sintéticos*, tales como poliuretano, poli (etilenglicol), policaprolactona, poli (vinilpirrolidona), poli (láctico-co-glicólico), alcohol polivinílico, poloxámeros, poliácridonitrilo, poli (amino ácido). A continuación se muestran ejemplos de polímeros hidrofílicos utilizados para sintetizar matrices de hidrogel.

Polímeros naturales y sus derivados	
Polímeros aniónicos:	Ácido hialurónico, ácido algínico, pectina, carragenina, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano
Polímeros catiónicos:	chitosano, polilisina
Polímeros anfipáticos:	Colágena, gelatina, carboximetil quitina y fibrina
Polímeros neutros:	dextrano, agarosa, pululano
Polímeros sintéticos	
Poliésteres:	PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, PHB, Poli(PF-co-EG), Poli (PEG / PBO tereftalato).
Otros polímeros:	PEG-bis- (PLA-acrilato), PEG-g-Poli(AAm-co-Vamine), Poli AAm, Poli (NIPAAm-co-AAc), Poli (NIPAAm-co-EMA), PVAc, PVA, PNVP, Poli(MMA-co-HEMA), Poli(AN co-alilo- sulfonato), Poli(biscarboxi-fenoxi-fosfaceno), Poli(GEMA-sulfato).
Combinaciones de polímeros naturales y sintéticos	
poli(PEG-co-péptidos), alginato-g-(PEO-PPO-PEO), poli(PLGA-co-serina), acrilato de colágena, acrilato de alginato, poli(HPMA-g-péptido), poli(HEMA/Matrigel®), HA-g-NIPAAm.	
Abreviaturas	
<p>PEG: polietilenglicol, PLA: ácido poliláctico, PLGA: ácido-poliláctico-co-glicólico, PCL: policaprolactona, PHB: polihidroxi butirato, PF: propilen fumarato, EG: etilen glicol</p> <p>PBO: poli óxido de butileno, AAm: acrilamida, NIPAAm: N-isopropil acrilamida, AAc: ácido acrílico, EMA: etil metacrilato, PVAc: polivinilacetato, PVA: polivinilalcohol, PNVP: poli-N-vinilpirrolidona, MMA: Metil metacrilato, HEMA: hidroxi-etil metacrilato, AN: acrilonitrilo, GEMA: glucosiletil metacrilato, PEO: poli óxido de etileno, PPO: poli óxido de propileno, HMPA: hidroxietil metacrilato, HA: ácido hialurónico.</p>	

Tabla 3. Polímeros hidrofílicos utilizados para sintetizar matrices de hidrogel [50].

Materiales a base de hidrogeles se están utilizando hoy en día en la clínica, y se continúa con su desarrollo para proporcionar materiales con nuevas propiedades y opciones de tratamiento para el manejo y la reparación de heridas [2].

5.5. Hidrogeles naturales

Para el cierre de heridas, los polisacáridos y proteínas son los polímeros naturales más comúnmente utilizados, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad (debido a la presencia de monómeros de glucosa dentro de sus estructuras

poliméricas) y similitud con la matriz extracelular. Algunos de ellos han mostrado propiedades antimicrobianas, que los hacen materiales ideales para el tratamiento de heridas [48] [2].

Los polímeros naturales, tales como polisacáridos, entre ellos la quitina, el quitosano, y el alginato; o proteínas como la colágena, elastina, fibrina, queratina, gelatina, celulosa, etc., se han utilizado para el tratamiento de las heridas, al mejorar o acelerar su reparación [1].

Sin embargo, los polímeros naturales se han considerado limitados en sus aplicaciones como materiales de apósitos a causa de sus bajas propiedades mecánicas y de su difícil extracción (procesamiento) así que como alternativa, se desarrollan polímeros sintéticos que pueden ser utilizados para aplicaciones de cicatrización de heridas. [48].

5.6. Hidrogeles sintéticos

Los polímeros sintéticos también se utilizan con éxito en aplicaciones biomédicas debido a su amplia gama de propiedades mecánicas, la idoneidad para formar fácilmente una variedad de diferentes formas y sus bajos costos de fabricación. [1].

Polímero sintético	Información y aplicaciones.
Polietilenglicol (PEG)	Es uno de los principales polímeros desarrollados para los adhesivos tisulares de hidrogel, además de que un hidrogel de PEG (DuraSeal™) es indicado como un complemento de la sutura de reparación dural en cirugías craneales, para asegurar el cierre hermético.
Poliuretano	Se usa como apósito para heridas debido a su capacidad antimicrobiana y a que provee un ambiente húmedo.
Polivinilpirrolidona (PVP)	De los más utilizados en la medicina debido a su solubilidad en agua y su extremadamente baja citotoxicidad.
Alcohol polivinílico (PVA)	Usado en aplicaciones biomédicas ya que es biocompatible en contacto con los fluidos corporales y tiene muy buenas propiedades mecánicas.
Óxido de polietileno (PEO)	Hidrófilo, biocompatible, no tóxico, no polar, no antigénico y no inmunogénico por ello es altamente deseable en la mayoría de aplicaciones biomédicas que requieren el contacto con fluidos fisiológicos.
Poloxámeros	Son utilizados como vehículos para diversas vías de administración, como agentes tensoactivos, emulsionantes, dispersantes, en distintas tecnologías de ADN, lesión cerebral, cardiovascular, lesiones por quemadura, tratamiento oftálmico y de heridas.

Tabla 4. Polímeros sintéticos más utilizados para la elaboración de hidrogeles para aplicaciones biomédicas [2] [1] [53] [54] [55] [56].

Dado que tanto los polímeros naturales como los sintéticos tienen sus propias ventajas y desventajas, una combinación de polímeros naturales y sintéticos puede dotar propiedades óptimas necesarias para la reparación de heridas.

5.7. Hidrogeles mezclados

Debido al aumento de la conciencia ambiental, la creciente salud pública y medio ambiente, los biopolímeros tales como polisacáridos, celulosa, almidón, quitina y quitosano mezclados con polímeros sintéticos son las mejores opciones para obtener un hidrogel con las propiedades físicas, mecánicas y biológicas deseadas. Algunas de las mezclas de polímeros exhiben propiedades superiores, diferentes, o inesperadas.

Se ha demostrado que la combinación de un polímero natural con un polímero sintético parece ser un método eficaz para la obtención de materiales, que tiene propiedades mecánicas y térmicas requeridas en comparación con los componentes puros. Asimismo, es un método simple por el cual se pueden obtener fácilmente formas adecuadas tales como películas, esponjas e hidrogeles para realizar una variedad de dispositivos biomédicos.

La combinación de polímeros naturales y sintéticos hoy en día se utiliza en la biomédica, bioingeniería y biotecnología debido a su gran potencial. La mezcla de polímeros es una de las formas más sencillas de obtener una variedad de propiedades físicas, mecánicas y biológicas diferentes en polímeros. Los métodos físicos, químicos y la radiación pueden ser aplicados para preparar mezclas de polímeros. Las propiedades de la mezcla dependen del grado de compatibilidad y miscibilidad de los polímeros a un nivel molecular [1].

Algunos ejemplos de mezclas de polímeros son:

Polivinil alcohol-polivinilpirrolidona-carbón, quitosano-polietilenglicol, aloe vera-polivinil alcohol-polivinilpirrolidona, quitosano-polivinil alcohol-alginato, polivinilpirrolidona-polietilenglicol, quitosano-polivinil alcohol, quitosano-polivinil

alcohol-polivinilpirrolidona, poloxámero-alguinato, colágena-polivinilpirrolidona entre otros.

5.8. Aplicaciones farmacéuticas

Los hidrogeles son ampliamente utilizados debido a sus propiedades únicas, tales como alto contenido de agua, suavidad, flexibilidad y biocompatibilidad. Actualmente, los hidrogeles se utilizan para la fabricación de lentes de contacto duros o blandos, productos de higiene en agricultura, industria pañalera, compresas femeninas, ropa deportiva, servilletas y sábanas de hospital, andamios biológicos o de regeneración, agentes de relleno de espacios o vehículos para suministro para sustancias bioactivas en ingeniería de tejidos, sistemas de suministro de fármacos; controlando la liberación del principio activo y su dosificación, y apósitos para heridas, absorbiendo exudados, manteniendo la humedad, ayudando al desbridamiento y acelerando la cicatrización [52].

6. Caracterización fisicoquímica

Se han desarrollado diversas técnicas químicas, físicas y mecánicas para evaluar las propiedades de los hidrogeles. Los distintos compuestos desarrollados en este trabajo se caracterizaron mediante nueve técnicas distintas, estas son: pruebas de pH y precipitación, microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido, determinación del tiempo de gelación, temperatura de gelación, viscosidad, absorción de agua (captación de humedad), grado de bioerosión, y pruebas antimicrobianas/antimicóticas.

6.1. Pruebas de pH y precipitación

De acuerdo a lo mencionado en la sección 4; los apósitos deben de proporcionar un microambiente adecuado desde la superficie a toda la herida, de forma que se produzca la cicatrización en las mejores condiciones posibles, en el menor tiempo y reduciendo al máximo la posibilidad de infección, por lo cual una de las principales características es el tener un pH óptimo; en este contexto se debe de tener en cuenta que los apósitos que mantienen un pH ácido o ligeramente ácido frenan el desarrollo de microorganismos patógenos [57], lo cual es muy deseable, sin embargo si el apósito tiene condiciones muy ácidas, puede producir o intensificar un daño en el tejido, su colocación sería dolorosa y poco cómoda, puesto que el pH de una herida en el periodo inflamatorio es de 6.22 y [58] [59]; por otra parte, si el apósito induce un pH alcalino, este no sería muy efectivo contra algunos microorganismos, sin embargo, un pH neutro podría evitar estas complicaciones. Finalmente hay que tener en cuenta que las variaciones del pH en la herida influyen en la actividad de las enzimas (como las proteasas), de modo que la actividad enzimática no sería la más adecuada, salvo que se tenga un pH estable [60], por lo cual el apósito debe de tener un pH adecuado para promover el proceso de cicatrización.

Todo lo anterior es relacionado al tema de heridas, no obstante, como se menciona en la sección 7; los hidrogeles están hechos a base de polímeros, los cuales son moléculas complejas que no siempre pueden dispersarse o ser solubles en agua o en otros medios. Algunos polímeros son ionizables (se pueden

encontrar en forma de aniones y cationes en continuo movimiento) en solución acuosa debido a que contienen al menos un grupo funcional ácido o básico. Estas moléculas pueden existir en forma neutra (sin carga) o ionizado (cargado) en función del pH de la solución. Estos compuestos son más solubles en su forma iónica y su solubilidad acuosa es dependiente del pH [61]. Sin embargo la solubilidad de los compuestos dependen de su constante de disociación pK_a , la cual nos indica que un ácido débil (con $pK_a \approx 3.6$) está casi completamente en forma no ionizada en condiciones ácidas por lo cual es insoluble, y solo sería soluble a pH's por encima del valor de su pK_a , contrariamente a las bases, las cuales son solubles a pH's por debajo de su pK_a [62]. Cuando el pH no es óptimo para alguno de los polímeros que componen al hidrogel, se podría constituir una sustancia insoluble, que se combinaría formando agregados, y posteriormente estos se separarían de la solución en forma de un sólido insoluble al que se le denomina precipitado, el cual puede presentar diferente coloración, y apariencia (gelatinoso, coagulado, en grumos o cristalino) [63], por ello hay que tener en cuenta diferentes aspectos de la naturaleza de los polímeros de interés, como sus constantes de disociación, acidez, basicidad, solubilidad, entre otras, para saber cuál es el medio adecuado para poder disolverlos/dispersarlos, ajustar el hidrogel a un pH deseado sin llegar a una precipitación y finalmente para conferirle cierta estabilidad y con ello conservar sus propiedades.

Por todas estas razones, es importante realizar pruebas de pH y precipitación a los hidrogeles desarrollados.

6.2. Microscopía electrónica de barrido

Un microscopio es un instrumento diseñado para hacer visibles objetos que el ojo no es capaz de distinguir. El SEM es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra [64].

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica

Con esta técnica, se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que se trabajan, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

En la mayoría de las aplicaciones, los datos se obtienen de un área seleccionada de la muestra, y se genera una imagen en dos dimensiones que muestra las variaciones espaciales en estas propiedades. Las áreas van desde aproximadamente 1cm a 5µm de ancho y se pueden obtener imágenes de un aumento de 20X hasta aproximadamente 1000, 000 X.

La técnica SEM también es capaz de realizar análisis semi-cuantitativos para establecer composiciones químicas, estructura y orientación cristalina [65].

El fundamento del SEM, esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones emitidos por un cátodo de tungsteno que pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor 10^{-7} Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensador, objetivo) desde unos 50,000-25,000nm hasta unos 10nm; es decir, su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente disminuye, e implica una menor cantidad de electrones primarios [64].

La utilización de electrones acelerados lleva a cantidades significativas de energía cinética, y esta energía se disipa en forma de una variedad de señales producidas por las interacciones electrón-muestra, ya que cuando los electrones inciden en la muestra sólida se desaceleran (frenan). Estas diferentes señales, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra [65].

La preparación de las muestras es relativamente sencilla, las principales características son: muestra sólida, conductora. En caso contrario, la muestra es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. La técnica de preparación de las muestras se denomina “sputtering” o pulverización catódica.

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica

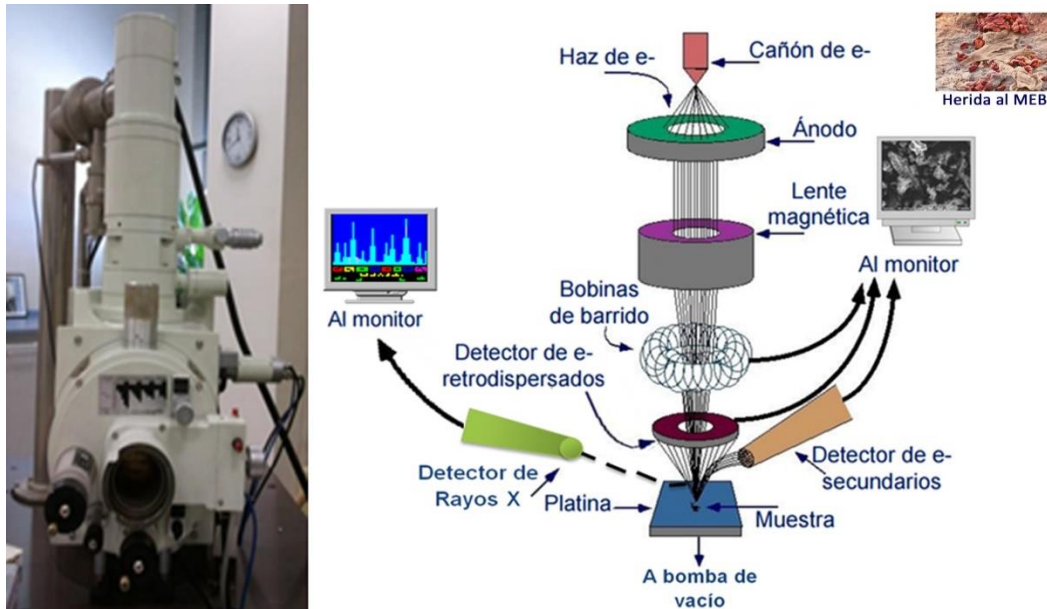


Figura 7. Microscopio electrónico de barrido y sus componentes [66].

El análisis SEM se considera "no destructivo"; es decir, los rayos X generados por las interacciones de electrones no conducen a la pérdida de la muestra, por lo que la mayoría de las veces, es posible analizar los mismos materiales repetidamente [65].

6.3. Calorimetría diferencial de barrido

Las técnicas termoanalíticas son ampliamente utilizadas en la caracterización de materiales, los instrumentos térmicos diferenciales registran la diferencia entre el cambio de entalpía que ocurre en una muestra y un material inerte de referencia cuando ambos se calientan, el análisis abarca los métodos de medida basados en el cambio, de una propiedad física o mecánica del material, con la temperatura [67] [68].

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry), es una técnica experimental dinámica que nos permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo, determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y otras transiciones, esto registrando la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica

temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (rampa de calor) [67] [69].

La técnica experimental de Calorimetría Diferencial de Barrido consiste en calentar una muestra (S) así como un compuesto de referencia (R) de tal manera que la temperatura es en todo momento igual en R y en S. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento, para ello, los soportes de muestra y de referencia están equipados individualmente con un calentador de resistencia (de platino) y un sensor de resistencia (de platino), que mide la temperatura de la base del soporte. Si se detecta cualquier diferencia, debida a un cambio de fase en la muestra, los calefactores individuales se corregirán, es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambos soportes, la diferencia de temperatura siempre debe ser menor a un valor umbral, que típicamente es de <0.01 K [69] [68] [70].

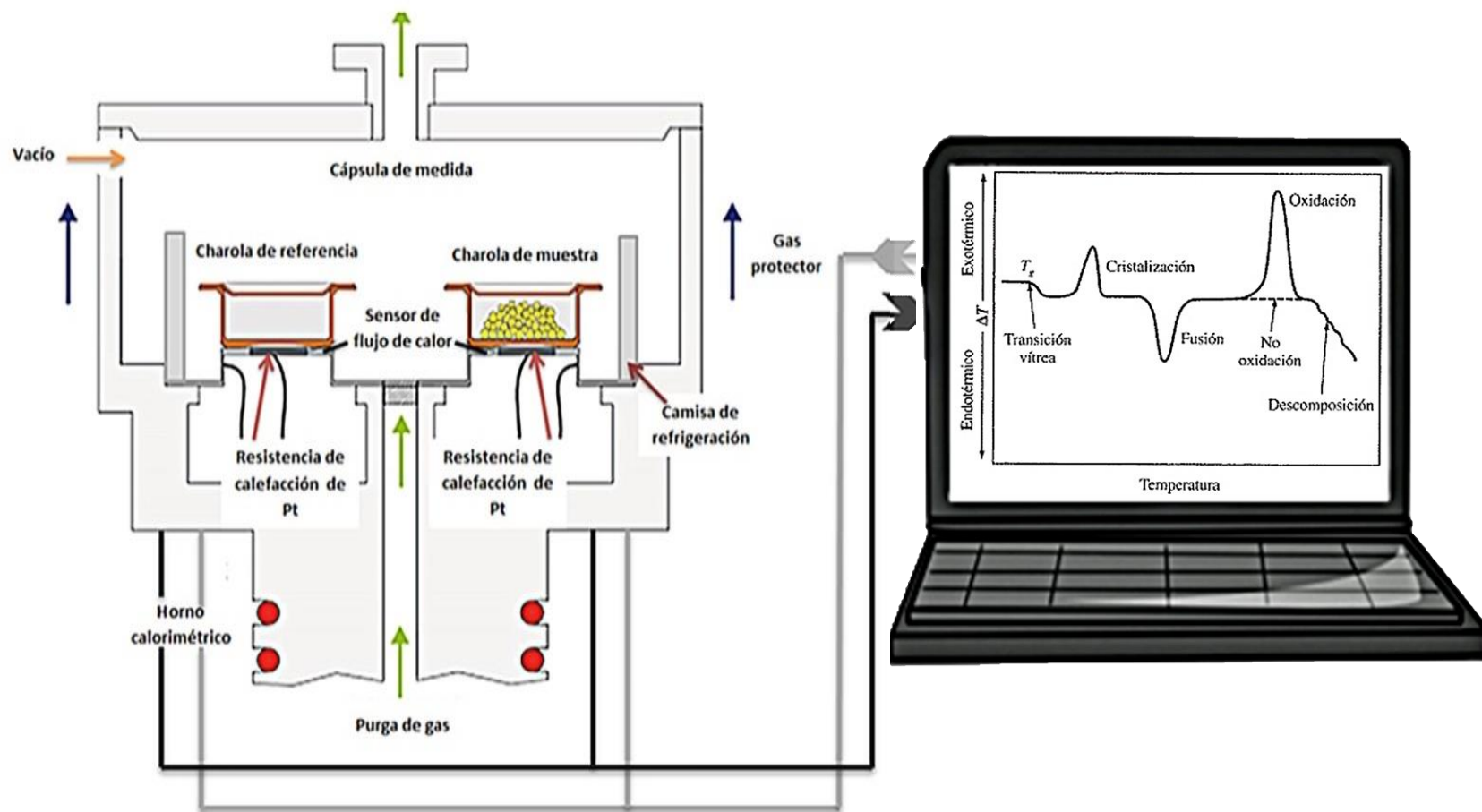


Figura 8. Diagrama de las partes de un instrumento de DSC y ejemplo de termograma obtenido.

6.4. Gelificación

Un sol es una dispersión de partículas coloidales sólidas en una fase líquida en donde las partículas son suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas por el movimiento browniano.

Un gel es un sólido consistente de dos fases en donde la fase sólida forma una red que atrapa e inmoviliza a la parte líquida [71] [72].

La gelificación es el proceso por el cual un sol pasa a ser un gel (Fig.9).

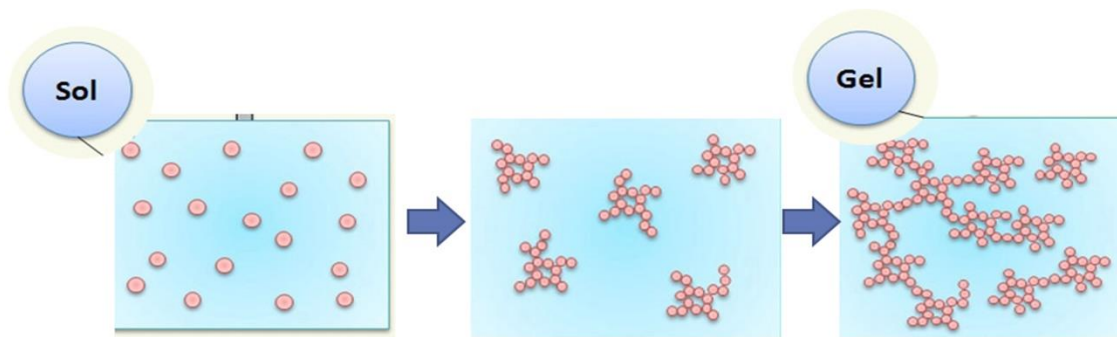


Figura 9. Proceso de gelificación.

La gelificación es de importancia decisiva en el procesamiento de materiales; sin embargo, su determinación no es un procedimiento simple.

Se han propuesto observaciones cualitativas para determinar este momento crítico por el instante en el que el material pierde su fluidez (método de inversión del tubo, o la detención de la barra magnética en agitación); estos métodos arbitrarios presentan las desventajas de ser cualitativos y a menudo no reproducibles. Por ello las mediciones reológicas son las que hoy en día se utilizan. El conocimiento de la evolución de las propiedades reológicas del sistema sol-gel es de gran importancia para la conformación de materiales en los procesos tecnológicos. La ligera deformación aplicada en pruebas reológicas puede ser considerada para inferir el mecanismo de gelificación; la reología es una poderosa herramienta analítica para investigar el cambio en la viscosidad y elasticidad en el umbral de gelificación, donde se construye una red tridimensional.

Algunos autores propusieron obtener el momento de gelificación por la divergencia de la velocidad de cizallamiento estacionario medido como una

función del tiempo. Sin embargo, las propiedades reológicas de equilibrio divergen cerca del punto de gel y las condiciones de estado estacionario no pueden ser alcanzadas en un tiempo finito. Por lo tanto la gelificación se define por el momento en el que la viscosidad (aparente) aumenta bruscamente. [73] [74].

6.4.1. Temperatura de gelación

La temperatura es otro parámetro que influye en la gelificación. La temperatura de gelificación es la cantidad de energía en forma de calor que se necesita para la formación de un gel (proceso de transición sol-gel). La temperatura de gelificación, ha sido identificada por varios autores como la temperatura a la que la muestra exhibe un cambio de un comportamiento predominantemente viscoso ($G'' > G'$) a uno predominantemente elástico ($G' > G''$) [74].

En varios estudios realizados a soluciones de polímeros mucoadhesivos, es evidente que la divergencia de G' y G'' es mayor al aumentar la temperatura, es decir, la energía cinética de las cadenas del polímero (cinética de reticulación), aumenta a medida que la temperatura lo hace, dando lugar a una disminución de la viscosidad y por lo tanto a una fuerza bioadhesiva más débil [74]. La mayoría de los polímeros naturales forman una fase de gel a temperaturas bajas. Sin embargo, las soluciones acuosas de algunos derivados de la celulosa exhiben termogelación inversa (gelificación a temperaturas elevadas).

En este contexto, cuando el gel/hidrogel se forma bajo condiciones fisiológicas (a una temperatura de 37°C) y mantiene su integridad durante un período de tiempo deseado, el proceso puede proporcionar varias ventajas sobre los geles/hidrogeles convencionales, ya que pueden adecuarse fácilmente en función de las necesidades terapéuticas y vías de administración (se pueden administrar en forma líquida y mostrar gelificación *in situ*, ayudar en la inmovilización de células en una matriz extracelular, como andamio para la regeneración de tejidos, liberación controlada de principios activos y biomacromoléculas lábiles, tales como proteínas y genes, inyectar para rellenar una cavidad, entre otras) [73] [74] [75] [76].

Por ello la determinación de la temperatura de gelación es de suma importancia.

6.4.2. Tiempo de gelación

El tiempo de gelificación es el período que tarda la formación de un gel (transición sol-gel). Al comienzo de la gelificación, la solución es de tipo líquido y el gel no se forma ($t < t_{gel}$). Con el tiempo, la solución se vuelve más viscosa y sólida, confirmando la formación del gel ($t > t_{gel}$). En el reómetro, el momento en que el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') se cruzan corresponde al punto de gel, t_{gel} , la cinética de gelificación también indica el tiempo en el que los módulos de almacenamiento y de pérdida del hidrogel se vuelven constantes.

El tiempo de gelificación es un parámetro importante para el cierre de heridas. Por ejemplo, si el hidrogel se utiliza como un agente hemostático, el tiempo de gelificación debe ser rápido (preferiblemente $t_{gel} < 5s$) con el fin de asegurar al instante la herida y controlar el sangrado. Sin embargo, la gelificación rápida puede conducir a hidrogeles más débiles con baja resistencia adhesiva debido a que no hay tiempo suficiente para que se forme una fuerte red, ni propagarse y reaccionar con el tejido. Por lo tanto, se requiere un equilibrio entre el tiempo de gelificación y las propiedades mecánicas y adhesivas para cada aplicación deseada [2].

Por lo general, la determinación de esta propiedad se realiza a una temperatura constante, puesto que el cambio de la temperatura conduce a un cambio del tiempo de gelificación [2] [74].

6.5. Reología (viscosidad)

La reología (del griego reos: fluir y logos: estudio) es por definición, la ciencia del estudio de la deformación y el flujo de la materia, describe la interrelación entre fuerzas, deformaciones y tiempo. La reología es entonces, la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos. Un fluido se define como una sustancia que se deforma continuamente

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica

bajo la aplicación de esfuerzos cortantes. Generalmente, para medir el comportamiento reológico se aplica tensión a un material durante cierto tiempo y la respuesta a la oposición de esta tensión es medida y viceversa.

La reología de fluidos es usada para describir la consistencia de diferentes fluidos, normalmente mediante dos componentes, la viscosidad y la elasticidad. Por viscosidad se entiende la resistencia a fluir o el “espesamiento” y por elasticidad la “pegajosidad” o “estructura” [77] [78] [79].

Para medir estas propiedades, la reología dinámica u oscilatoria es uno de los métodos comunes utilizados para investigar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, para ello se utiliza un viscosímetro, el cual aplica una fuerza controlada a un material y se mide la respuesta mecánica a la misma mediante el desplazamiento o la distancia recorrida por el objeto. La fuerza entonces representa el desplazamiento de acuerdo a la tensión aplicada y la oposición a esta de la materia, lo que da como resultado un gráfico con una curva de fuerza de desplazamiento [80].

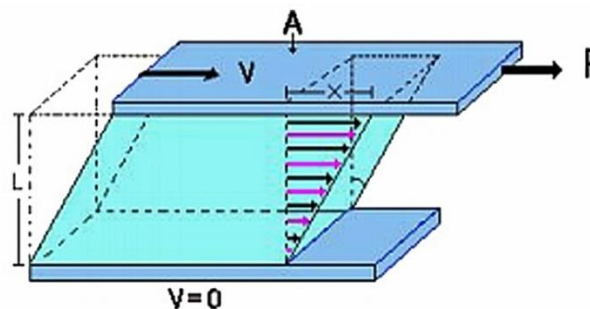


Figura 10. Diagrama de un fluido en flujo constante simple. Para conocer el comportamiento viscoso de un líquido es necesario determinar el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación. Estas cantidades dependen del área de contacto, de la fuerza (F) necesaria para mover la placa superior a una velocidad (V) constante v y de la separación (L) entre las placas a una presión, temperatura y volumen constante.

6.5.1. Clasificación de los fluidos

Existen tres tipos de fluidos:

- Newtonianos: hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación.
- No Newtonianos: no hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Se subdividen en: dependientes e independientes del tiempo.
- Viscoelásticos: se comportan como líquidos y sólidos, presentando propiedades de ambos.

La proporcionalidad entre el esfuerzo por unidad de área y la velocidad, se describe matemáticamente a partir de una ecuación (Ley de la viscosidad de Newton):

$$\tau = \mu \frac{du}{dt}$$

τ = esfuerzo cortante (mPa),

μ =viscosidad dinámica del fluido (mPa•s)

du/dt =velocidad de deformación o cizalla (s^{-1})=D

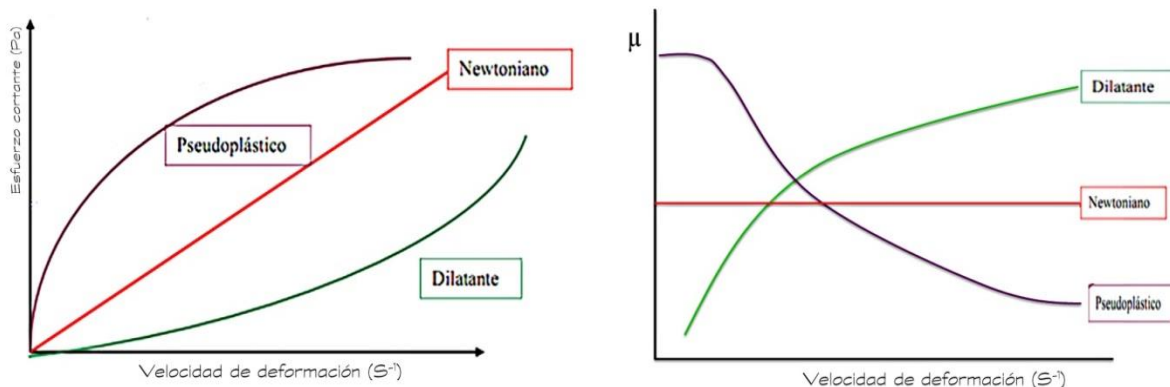
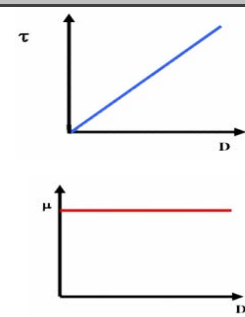

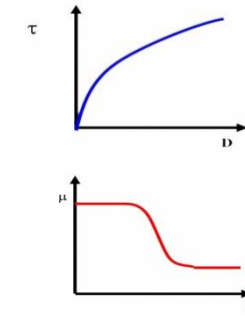

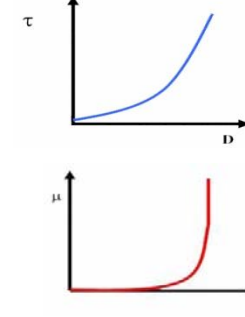
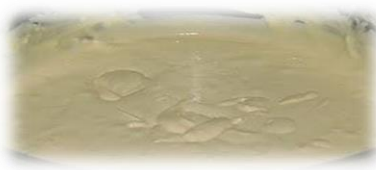


Figura 11. Curvas de fluidez y viscosidad para diferentes tipos de fluidos.

ANTECEDENTES
Caracterización fisicoquímica

Tipo de fluido, descripción y ejemplo	“Curvas de Fluidez¹” y “Curvas de Viscosidad²” <small>¹Se grafica el esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación (τ vs D). ²Se representa la viscosidad en función de la velocidad de deformación (μ vs D).</small>
Fluidos Newtonianos	
<p>Estos fluidos cumplen la ley de Newton, es decir, existe una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Esto es debido a que el término μ (viscosidad) es constante para este tipo de fluidos y no depende del esfuerzo cortante aplicado.</p>	
 <p style="margin-top: 10px;"><i>Ejemplos de estos fluidos son el agua y el aceite.</i></p>	
Fluidos no Newtonianos	
Independientes del tiempo de aplicación	
<p>Estos fluidos se pueden clasificar dependiendo de si tienen o no esfuerzo umbral, es decir, si necesitan un mínimo valor de esfuerzo cortante para que el fluido se ponga en movimiento.</p>	
<p>➤ Fluidos pseudoplásticos. Se caracterizan por una disminución de su viscosidad, con la velocidad de deformación, mientras que, su esfuerzo cortante aumenta con esta.</p>	
 <p style="margin-top: 10px;"><i>Ejemplo de estos fluidos es la Catsup.</i></p>	
<p>➤ Fluidos dilatantes. Son suspensiones en las que se produce un aumento de la viscosidad con la velocidad de deformación, es decir, un aumento del esfuerzo cortante con dicha velocidad.</p>	
 <p style="margin-top: 10px;"><i>Ejemplos de estos fluidos son la harina de maíz, la arena mojada, disoluciones de almidón concentradas, etc.</i></p>	

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica


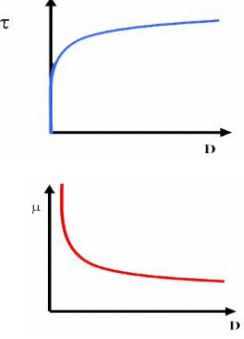


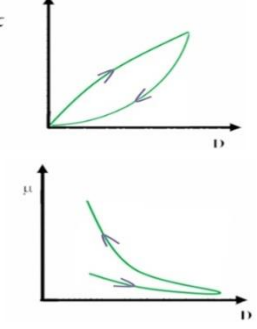
<p>➤ Fluidos con esfuerzo umbral: plásticos. Se comportan como un sólido hasta que sobrepasa un esfuerzo cortante mínimo (esfuerzo umbral) y a partir de dicho valor se comporta como un líquido.</p> 	<p><i>Ejemplos de estos fluidos son el chocolate, arcilla, pasta de dientes, mayonesa, emulsiones, espumas, etc.</i></p>	
<p>Dependientes del tiempo de aplicación</p> <p>Este tipo de fluidos se clasifican en dos tipos: los fluidos <i>tixotrópicos</i>, en los que su viscosidad disminuye al aumentar el tiempo de aplicación del esfuerzo cortante, recuperando su estado inicial después de un reposo prolongado, y los fluidos <i>reopéticos</i>, en los cuales su viscosidad aumenta con el tiempo de aplicación de la fuerza y vuelven a su estado anterior tras un tiempo de reposo.</p>		
<p>➤ Fluidos tixotrópicos (<i>Histéresis</i>) Se caracterizan por un cambio de su estructura interna al aplicar un esfuerzo. Esto produce la separación de las largas cadenas que forman sus moléculas.</p> 	<p><i>Ejemplos de estos fluidos son las pinturas, el yogurt, tintas de impresión, nylon, aceites del petróleo, etc.</i></p>	
<p>➤ Fluidos reopéticos Tienen un comportamiento contrario a los tixotrópicos, es decir, su viscosidad aumenta con el tiempo y con la velocidad de deformación aplicada y presentan una histéresis inversa a estos últimos.</p> 	<p><i>Ejemplos de este tipo de fluidos es el yeso, arcilla bentonítica, entre otros.</i></p>	
<p>Fluidos Viscoelásticos</p> <p>Se identifican por presentar a la vez tanto propiedades viscosas como elásticas. Esta mezcla de propiedades puede ser debida a la existencia en el líquido de moléculas muy largas y flexibles o también a la presencia de partículas líquidas o sólidos dispersos.</p> <p><i>El helado muestra propiedades sólidas y líquidas a la vez.</i></p> 		

Tabla 5. Clasificación de los diferentes tipos de fluidos, ejemplos y representación de sus curvas de fluidos y viscosidad [2] [77] [78] [79] [80] [81].

6.6. Captación de humedad.

Un hidrogel ideal para el cierre de heridas tiene que absorber exudados de la herida al tiempo que evita la deshidratación de la herida (Fig. 12), y mantener el lecho húmedo para una reparación más rápida [2].

El alto contenido de agua de los hidrogeles permite la transmisión del vapor y oxígeno a las heridas, lo cual es importante en el tratamiento de emergencia en quemaduras gracias a su efecto de enfriamiento e hidratación. La donación de humedad de los hidrogeles hacia las heridas ayuda al desbridamiento autolítico, al aumento de la producción de colagenasa y al contenido de humedad de las heridas necróticas. Asimismo, los hidrogeles permiten la absorción y retención del exudado contaminado a través de la expansión de las cadenas de polímero, lo que ayuda en el aislamiento de bacterias, detritus y moléculas de olor en el líquido [52].

Sin embargo, no todos los hidrogeles se comportan de una manera ideal, o cambian sus propiedades dependiendo de las condiciones a las que se encuentren (entre ellas el contenido de humedad), por ello, es necesario someterlos a diferentes pruebas, en este caso, para observar las propiedades descritas en los dos párrafos anteriores; durante períodos de tiempo fijos, y en condiciones de temperatura y humedad específicas.

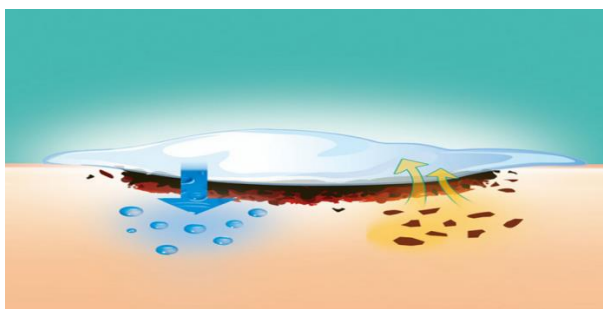


Figura 12. Representación de un hidrogel ideal que absorbe exudados y libera agua en la zona de la herida.

Con esta prueba fisicoquímica (captación de humedad), se determina la capacidad de los hidrogeles para absorber/eliminar agua en presencia de diferentes atmósferas con humedades relativas controladas.

6.7. Bioerosión/Hinchamiento

Los hidrogeles pueden absorber y retener grandes cantidades de agua (Fig.13) en función de su reticulación (entrecruzamiento), la densidad de carga de su red y la concentración de sus polímeros entrecruzados. La determinación de la cantidad de agua absorbida dentro del hidrogel se llama grado de hinchamiento y es una característica importante para su utilización *in vivo*, ya que los hidrogeles altamente hinchados se pueden romper y disolver antes de que se cure la herida o dañar los tejidos del cuerpo cercanos a la herida. El grado de hinchamiento también influye en la difusión de las moléculas o medicamentos desde el hidrogel [2].

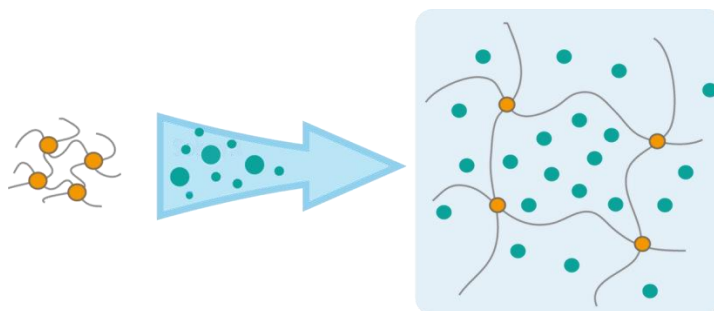


Figura 13. Hinchamiento de los hidrogeles.

Es importante saber y distinguir los diferentes procesos por los cuales puede pasar un hidrogel al absorber el exudado de las heridas, estos son:

- *Degradación*: proceso químico por el que los enlaces covalentes se escinden.
- *Erosión*: proceso que da lugar a cambios físicos en el tamaño, forma o masa de un material.
- *Biodegradación*: degradación como consecuencia de un agente biológico, tal como una enzima, célula, o microorganismo.
- *Bioerosión*: conversión de un material insoluble en agua en un material soluble en agua bajo condiciones fisiológicas, independientemente del mecanismo de conversión.
- *Erosión superficial*: Un proceso de erosión del polímero, donde la proporción de conversión a un material soluble en agua es superior a la tasa de infiltración de agua en el interior del dispositivo. Como

ANTECEDENTES

Caracterización fisicoquímica

consecuencia, el material se erosiona solo en la superficie del dispositivo, mientras que el núcleo permanece estructuralmente consistente.

- *Erosión mayor o a granel*: Un proceso de erosión del polímero, donde la tasa de penetración de agua en el interior del dispositivo supera la tasa de conversión en el material soluble en agua. Como consecuencia, la erosión del material es probable que ocurra en toda la masa del dispositivo [82].

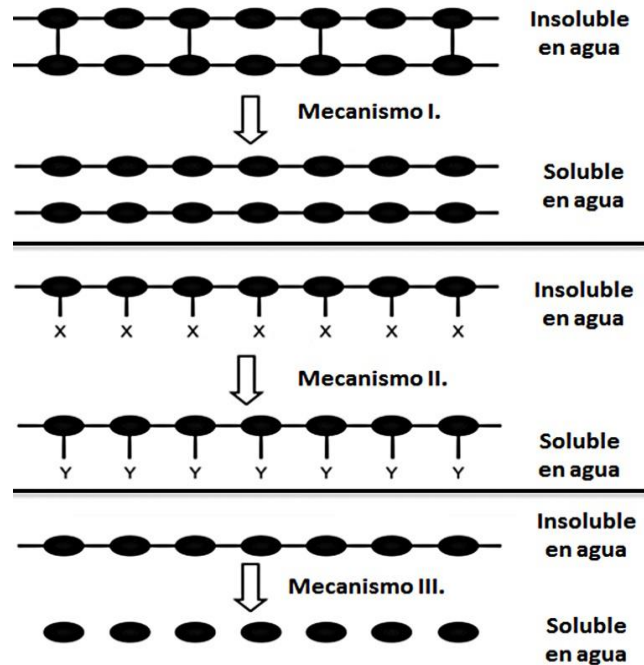


Figura 14. Mecanismos de degradación química [82]. *Mecanismo I*: Escisión de las reticulaciones entre cadenas de polímero soluble en agua. *Mecanismo II*: Escisión o transformación química de cadenas laterales hidrofóbicas (X) que conduce a la formación de grupos cargados o polares (Y) lo que conlleva a la solubilización de la cadena del polímero. *Mecanismo III*: Escisión de enlaces en el esqueleto primario del polímero (entre monómeros), seguido de la solubilización de los fragmentos de bajo peso molecular.

7. Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

Las heridas son susceptibles a la contaminación por bacterias y hongos; y la infección es la principal causa de su complicación, la cual puede llevar a resultados catastróficos tales como la muerte, si no se atienden adecuadamente, por esta razón, la actividad antibacteriana/antimicótica es una propiedad adicional que se busca en un apósito ideal.

Variados métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias/hongos ante agentes antimicrobianos. En varios laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias/hongos de rápido crecimiento y algunas bacterias/hongos patógenos. Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada (descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)), y con medidas de diámetro de zona correlacionados con la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

En las heridas, la infección extracelular es más frecuente que la intracelular y muchos patógenos dependen de la producción de enzimas extracelulares para invadir los tejidos profundos del huésped [83]. Ciertas características estructurales, de producción de enzimas y de productos metabólicos contribuyen tanto a la virulencia como a la patogenia de las bacterias capaces de producir infección. Las cápsulas (p. ej., *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) protegen a las bacterias frente la destrucción mediada por los fagocitos o por la activación del complemento. La presencia de finos apéndices superficiales (pili) que se proyectan en muchas bacterias (p. ej., *P. aeruginosa* y *E. coli*) favorece su adherencia a las células del huésped y éste es, en muchos casos, el primer paso del proceso de la infección. Los polisacáridos que conforman algunas paredes bacterianas (por ejemplo, *Staphylococcus* y *Streptococcus*) facilitan su adhesión a

los componentes de la matriz extracelular del tejido objetivo, como la fibronectina y el colágeno.

Las pruebas de susceptibilidad son también importantes en estudios epidemiológicos de resistencia y en estudios de nuevos agentes antimicrobianos [11] [46] [84] [85].

7.1. Microbiología de las heridas

La microbiología varía según el grado de contaminación de la herida, así en las operaciones limpias, son más frecuentes los gérmenes gram-positivos. *S. aureus* constituye el patógeno principal. En heridas próximas al periné hay mayor probabilidad de microorganismos gram-negativos, por los cambios en la colonización de la piel en esta zona.

En las heridas del colon, el contaminante principal es la *E. coli* y el *Bacteriodes fragilis*. El tracto genital femenino tiene un microorganismo diferente anaerobio, que es el *Bacteriodes species*.

En heridas infectadas es frecuente encontrar como microorganismos colonizadores a *E. coli*, *Klebsiella*, *B. fragilis*, *Clostridium* y estreptococos anaerobios. En los abscesos e infecciones intrahospitalarias la microflora es diferente; son gérmenes multirresistentes, como la *Pseudomona sp*, *Enterobacter sp* y el *Enterococo*.

En seguimientos realizados nacional e internacionalmente se ha visto un incremento en la incidencia de infecciones quirúrgicas causadas por patógenos resistentes a antibióticos convencionales, como *S. aureus* y hongos como *C. albicans*. De 1991-1995 la incidencia de infecciones quirúrgicas causadas por hongos aumentó de 0,1 a 0,3 x 1 000 infectados; este aumento se puede deber al incremento de enfermos graves, pacientes inmunocomprometidos o por el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro.

Los gérmenes más frecuentes encontrados en estudios realizados en Miniápolis (CDC (Centers for disease control)), fueron los siguientes:

- Gram positivos: *S. aureus*, *S. coagulasa* negativo, *Enterococos*.
- Gram negativos: *E. coli*, *P. aeruginosa*. [86]

8. Quitosano

8.1. Origen y obtención del quitosano

El quitosano (CH) es el derivado total o parcialmente N-desacetilado más importante de la quitina [87]. La quitina es el polisacárido natural de mayor importancia después de la celulosa, y es sintetizada por un gran número de organismos vivos. Está presente en forma de microfibras cristalinas que componen el exoesqueleto de artrópodos como langostas, cangrejos y camarones, o en la pared celular de hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, en levaduras y en algas como las diatomeas. También se puede encontrar en plantas y animales, y su función es reforzar y proporcionar resistencia [88].

Tanto la quitina o poli- β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, como el CH o poli- β -(1-4)-D-glucosamina [89], están formados por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces β -(1-4). En la figura 15, se puede observar que la diferencia en la estructura química de los polímeros, radica en el carbono número 2, donde la quitina posee un grupo acetoamida, mientras que en el quitosano ese grupo está desacetilado, dando como resultado un grupo amino [90].

El método de obtención del CH implica primero la extracción de la quitina de su fuente natural, la cual requiere un tratamiento previo en medio ácido para eliminar el carbonato de calcio (desmineralización), generalmente por medio de una reacción exotérmica con HCl o HNO₃ seguido de una desproteización (eliminación de las proteínas), comúnmente realizada con tratamientos alcalinos (principalmente con NaOH). Cuando es extraída, la quitina tiene una estructura cristalina altamente ordenada, translúcida, resistente, dura, y presenta baja solubilidad en agua y poca reactividad. La estructura de la quitina se modifica mediante la eliminación de los grupos acetilo, por medio de una hidrólisis química en solución alcalina concentrada a una temperatura alta [91]. Cuando el grado de acetilación es menor a 0.35, el compuesto obtenido recibe el nombre de Quitosano [87]

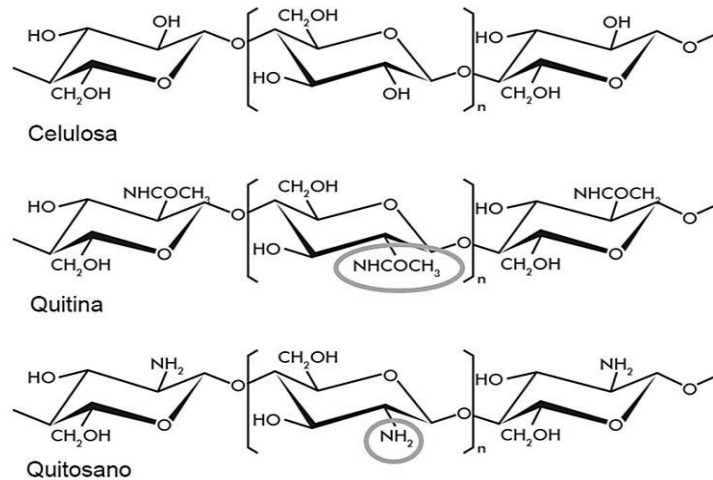


Figura 15. Estructura química de la celulosa, la quitina y el quitosano [92].

8.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas

Es importante considerar que las propiedades de la quitina y el quitosano, como el peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (DD), dependen principalmente de la fuente de obtención y de su método de producción [93], y que además el DD y el PM afectan directamente las propiedades químicas y biológicas del polímero. El quitosano comercialmente disponible de bajo peso molecular (CH-L) se caracteriza por tener un PM entre 20-190 kDa con un DD <75%, mientras que el quitosano de alto peso molecular (CH-H) presenta un peso entre 190-375 kDa y un DD >75% [94].

- Solubilidad

El CH es una base débil y es insoluble en agua, pero soluble en soluciones acuosas ácidas diluidas por debajo de su pKa (6.3) en donde los grupos NH_2 de las unidades de GlcN se encuentran en su forma protonada soluble (NH_3^+) [91], dando como resultado un polielectrolito catiónico.

Como es de esperarse, la solubilidad del CH exhibe una dependencia en el DD; esto debido a que la quitina se vuelve soluble en agua cuando el DD es aproximadamente 49%. La solubilidad del quitosano está relacionada con su estructura cristalina, así como en el aumento del contenido de GlcN [95].

- Viscosidad

Una de las propiedades más características de varios polímeros, incluyendo al quitosano, es su capacidad para formar soluciones viscosas; por lo tanto, pueden ser utilizados como estabilizantes, o agentes de suspensión. Generalmente, las soluciones de quitosano muestran un comportamiento pseudoplástico y propiedades viscoelásticas [96]. La viscosidad de las soluciones de quitosano aumenta con el incremento de la concentración, esto probablemente está atribuido a un creciente entrecruzamiento intermolecular a medida que aumenta la concentración de quitosano, que a su vez conduce a una mayor restricción en la libertad de movimiento de las cadenas individuales [97].

La viscosidad también aumenta con el peso molecular y el DD, ya que la densidad de carga a lo largo de la cadena aumenta de forma proporcional con el DD [98]; sin embargo, disminuye con la temperatura, esta disminución se atribuye a un aumento en el movimiento térmico del polímero con la temperatura [97].

- Biodegradación

En general, los polisacáridos son degradados por hidrólisis enzimática. Se ha reportado que la quitina y el quitosano son capaces de seguir este principio, y que la primera enzima responsable de este proceso es la lisozima; sin embargo, esta enzima solamente es capaz de hidrolizar a la quitina y a los derivados desacetilados que aún poseen cierta cantidad del grupo acetoamida en su estructura. Los segmentos GlcNAc, a los que la lisozima puede acceder, deben estar constituidos por más de tres secuencias de esta unidad y, por lo tanto, la lisozima no puede actuar sobre los segmentos GlcN, es por esto que la degradación es más lenta a medida que aumenta el DD.

Se cree que enzimas adicionales como la N-acetil- β D-glucosaminidasa (NAGasa), se encargan de hidrolizar residuos de GlcNAc desde la zona terminal no reductora de los oligosacáridos a las formas monoméricas, aunque la NAGasa por sí sola no puede iniciar la degradación [99]. La figura 16, muestra una representación esquemática del posible mecanismo de degradación del quitosano y la quitina.

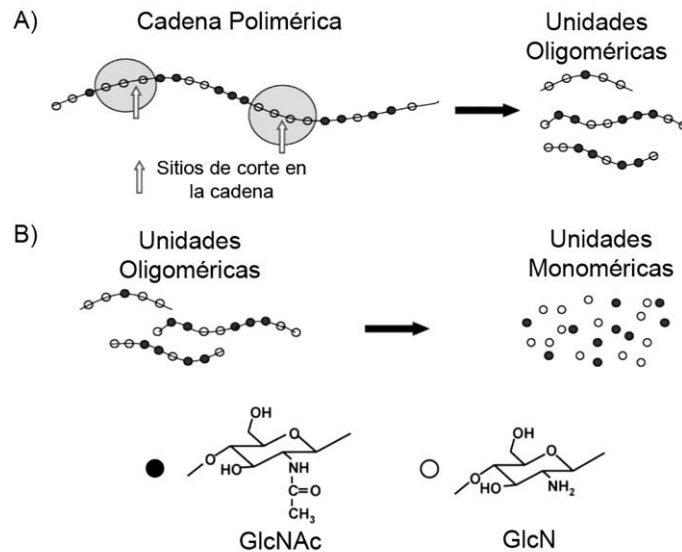


Figura 16. Diagrama esquemático que muestra el posible mecanismo de degradación del quitosano por (A) lisozima y (B) NAGasa en el cuerpo humano [99].

En un estudio realizado por Zhang, los resultados muestran que el quitosano con el mayor PM y DD presenta una tasa de degradación más lenta que en el quitosano con PM y DD bajos [100].

- **Biocompatibilidad**

El quitosano es un polímero bien tolerado por los tejidos vivos, incluyendo la piel, las membranas oculares, así como el epitelio nasal [96]. Pruebas clínicas realizadas con el fin de promover el uso de este biomaterial no reportaron alergias después de su implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano [101]; sin embargo, es importante mencionar que se ha observado que el CH puede inducir inflamación dependiendo de su DD. Esto debido a que una tasa de degradación muy rápida del polímero, puede causar la acumulación de aminosacáridos e inducir una respuesta inflamatoria; por esta razón, el CH con un DD bajo induce una respuesta inflamatoria aguda; mientras que CH con alto DD produce una respuesta mínima dado que la velocidad de degradación es menor [94].

- Toxicidad

La baja toxicidad del quitosano en comparación con otros polisacáridos naturales es otra de sus muchas características atractivas. Se ha demostrado, por estudios *in vivo*, la seguridad de este polímero en términos de inercia y baja toxicidad. La DL50 oral en ratones es de 16 g/día/kg de peso corporal, aunque se ha informado de que la pureza del CH influye en su perfil toxicológico. Además está contraindicada para personas con alergia a los mariscos [96].

- Actividad antimicrobiana

Datos recientes en la literatura presentan a este polisacárido como un agente bacteriostático, aunque el mecanismo exacto no se conoce y existen otros factores que pueden contribuir a la acción antibacteriana. Se han propuesto tres modelos, siendo el más aceptable la interacción entre las moléculas del quitosano cargadas positivamente y las membranas celulares microbianas cargadas negativamente. En este modelo, la interacción está mediada por las fuerzas electrostáticas entre los grupos NH_3^+ y los residuos negativos de la membrana (lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas [102] y ácidos lipoteicoicos y teicoicos de las bacterias Gram positivas [96]), las cuales producen cambios en la permeabilidad de la membrana, que inducen desequilibrios osmóticos y fuga de electrolitos intracelulares.

Dado que dicho mecanismo se basa en la interacción electrostática, se ha sugerido que cuanto mayor sea el número de aminas protonadas, mayor será la actividad antimicrobiana. También se ha observado que la cantidad de CH policatiónico disponible para unirse a una superficie bacteriana cargada se reduce a medida que aumenta la concentración de quitosano. Finalmente, el CH pierde su actividad antimicrobiana a un pH de 7.0, debido a la desprotonación de los grupos amina y la baja solubilidad en agua [96].

Otro mecanismo propuesto es la unión de quitosano con el DNA microbiano, lo que conduce a la inhibición del RNAm y la síntesis de proteínas, en el cual, se asume que las moléculas de CH son capaces de pasar a través de la pared celular bacteriana. En un estudio realizado por Liu, et. al., oligómeros de CH

obtenidos por irradiación Gamma se observaron en el interior de una célula de *E. coli* por microscopia confocal láser de barrido, asociando la actividad antibacteriana de estos oligómeros a una inhibición de la transcripción del DNA [103].

El tercer mecanismo es la quelación de metales y la unión a nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano. Se sabe que el quitosano tiene la capacidad de unirse a metales por quelación. En general, tal mecanismo es más eficiente a pH alto en donde los grupos amina no están protonados y el par de electrones en el nitrógeno de la amina están disponibles para la donación a los iones metálicos [91].

Adicionalmente, se ha reportado que el peso molecular del CH modifica la actividad antibacteriana, de manera que el CH-H es menos eficiente que el CH-L. En este sentido, la irradiación es un método ampliamente utilizado para lograr reducir el peso molecular de los polímeros, debido a que puede mejorar algunas de sus características, entre ellas, se encontró que el CH irradiado muestra una fuerte actividad antibacteriana contra *E. coli* y *B.subtilis*. [104]

- Efecto Hemostático

Al quitosano se le ha atribuido un efecto hemostático relacionado a su estructura. En un estudio, realizado por Rao y Sharma para conocer el potencial hemostático del CH, se encontró mediante pruebas de coagulación que este polímero disminuye en un 40% el tiempo de sangrado, el tiempo de retracción del coágulo y el tiempo de coagulación de sangre total. Así mismo, utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) observaron que las plaquetas expuestas a películas de quitosano, muestran adhesión al polímero a los 30 y 60s. De estos estudios se concluye que el CH puede unirse directamente a la membrana celular, posiblemente por interacciones iónicas, particularmente de las plaquetas y eritrocitos, provocado aglutinación celular y promoviendo la formación del tapón hemostático [105].

8.3. Aplicaciones farmacéuticas

El quitosano puede ser fácilmente transformado en hidrogeles, membranas, nanofibras, perlas, micro/nanopartículas, andamios de reepitelización y esponjas para diferentes tipos de aplicaciones biomédicas, tales como vehículos para entrega de fármacos y genes, apósitos para cicatrización de heridas e ingeniería tisular [90]. A continuación se muestran diferentes aplicaciones farmacéuticas que se han desarrollado a partir del quitosano y las ventajas que presentan.

Forma Farmacéutica	Uso/Ventaja
Tabletas	Aglutinante; disgregante; recubrimiento; lubricante; diluyente
Geles	Liberación sostenida de fármacos; mejorar la absorción
Películas y membranas	Liberación controlada de fármacos
Emulsiones	Agente estabilizante
Microesferas; microcápsulas	Mucoadhesivo; liberación sostenido de fármacos; aumento de la permeabilidad y biodisponibilidad
Nanopartículas	Mejora la disolución de fármacos poco solubles
Formulaciones oftálmicas	Mejora la tolerancia ocular; mucoadhesivo; propiedades de humectación y aumento de la permeabilidad; antibacteriano
Sistema de liberación transdérmica	Mejora la penetración a través del epitelio; liberación controlada de fármacos
Terapia del cáncer	Antitumoral; retención sistémica prolongada y acumulación en el tumor debido al efecto EPR
Administración de vacunas	Respuestas inmunes locales y sistémicas. incrementa el tiempo de retención en el sitio de inyección
Administración de péptidos	Mejora de la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas
Administración de factores de crecimiento	Liberación prolongada de las moléculas
Ingeniería de tejidos	Promueve el crecimiento del tejido y la diferenciación

Tabla 6. Aplicación del quitosano para el desarrollo de diferentes formas farmacéuticas y administración de fármacos [96].

8.3.1. Aplicaciones para el tratamiento de heridas

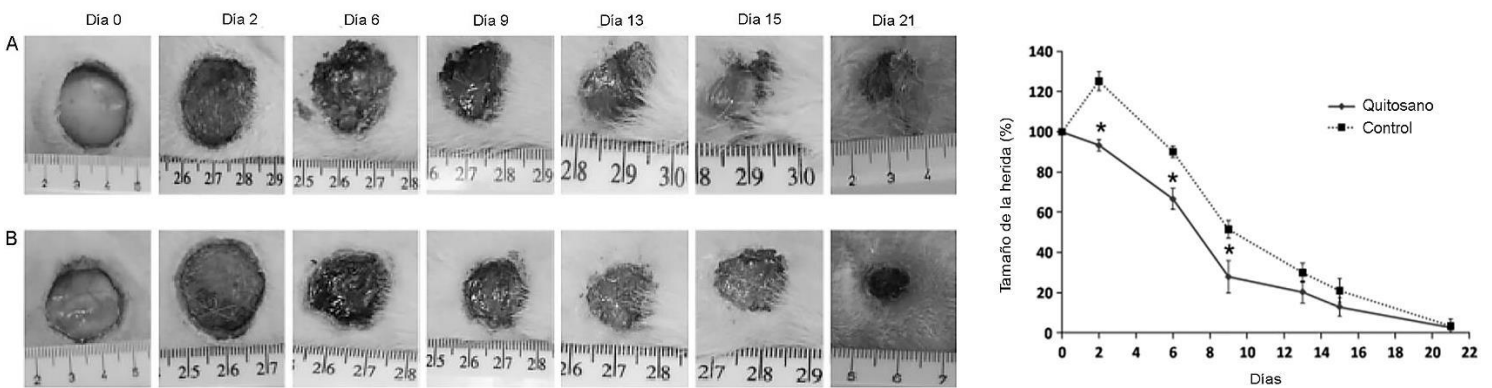
Diversos estudios han documentado el uso del quitosano para el tratamiento de heridas por los efectos benéficos que su aplicación genera en el sitio de lesión. Varios grupos de investigación han llegado a la conclusión de que el quitosano y sus derivados aceleran la cicatrización de heridas mediante la mejora de las funciones de las células que participan en el proceso de reparación, tales como los

ANTECEDENTES

Quitosano

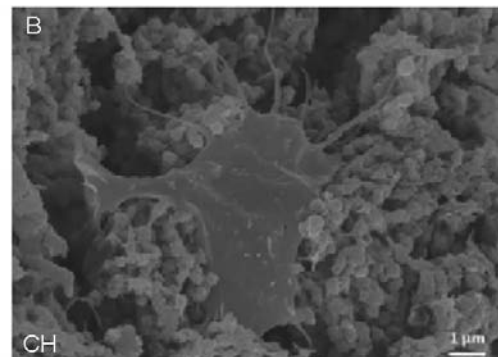
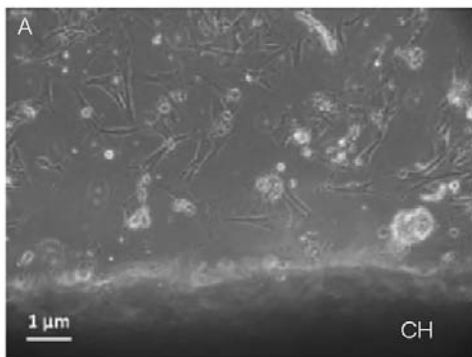
macrófagos, queratinocitos y fibroblastos, y por un aumento de la resistencia a la rotura del nuevo tejido [88].

En un estudio realizado por Ribeiro en heridas dérmicas de espesor total con previo tratamiento térmico utilizando agua a 95°C y el posterior desbridamiento del tejido en un modelo de rata, para evaluar la aplicabilidad de un hidrogel de CH al 4%, se encontró que este biomaterial puede ayudar al restablecimiento de la arquitectura de la piel. La cicatrización de las heridas se evaluó mediante el análisis macroscópico e histológico, en donde los resultados mostraron que el área de la herida disminuyó rápidamente en presencia del hidrogel en comparación con el control con una diferencia estadística significativa hasta el día 9 (Fig. 17- I y II).



I. Fotografías macroscópicas de las heridas al día 0, 2, 6, 9, 13, 15 y 21 del grupo tratado con CH (A) y el grupo control, PBS (B).

II. Efecto del CH y PBS en las heridas (cinética del cierre).



III. Fotografía de fibroblastos después de 24h en el hidrogel de quitosano

IV. Fotografía tomada con SEM de un fibroblasto adherido a la superficie del quitosano

Figura 17. Resultados obtenidos de un estudio realizado en quemaduras de piel de rata para conocer el efecto de un hidrogel de quitosano [106].

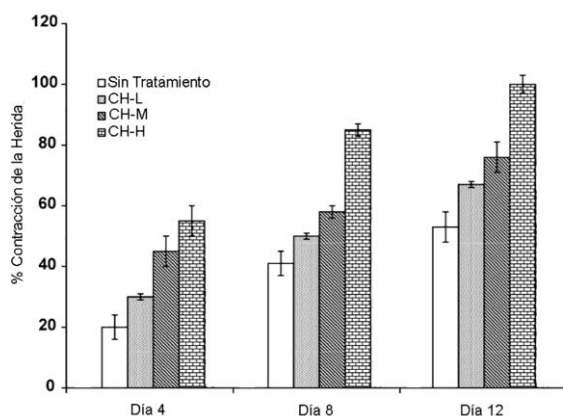
ANTECEDENTES

Quitosano

Además, el análisis histológico reveló ausencia de una reacción inflamatoria granulomatosa o anomalías patológicas en las lesiones tratadas con CH lo que demuestra la histocompatibilidad local y sistémica del biomaterial. Por último, se evaluó la citotoxicidad del hidrogel utilizando fibroblastos aislados de piel de rata. La figura 17 III y IV muestra fotografías tomadas utilizando microscopía de luz invertida y electrónica de barrido, en las cuales se observa que el CH es capaz de promover la adhesión de los fibroblastos después de 24 horas [106].

Es importante mencionar que los efectos del quitosano pueden verse afectados por el PM y el DD [94]. Alsarra estudio el efecto de hidrogeles preparados con diferentes quitosanos: alto peso molecular con un 92% DD, mediano peso molecular con 75% DD y bajo peso molecular con 63% DD en una concentración al 2% para todos los casos. Los hidrogeles se probaron en heridas de espesor total de aproximadamente 1 cm de largo en el área dorsal de ratas realizadas con previo tratamiento térmico utilizando agua hirviendo.

La velocidad del cierre de la herida se evaluó mediante la determinación de la zona no cerrada como una función del tiempo. Se encontró que las heridas tratadas con CH-H presentaron una velocidad de contracción mayor en comparación con los otros tratamientos (Fig.18-I), especialmente a los días 8 y 12. De forma similar, las heridas tratadas con este hidrogel mostraron más tejido epitelial y mejor reepitelización (Fig.18-II) [107].



I. Porcentaje de contracción de la herida para experimentos in vivo.

II. Tabla de porcentaje de reepitelización de la herida a los 4, 8 y 12 días.

Día de observación	Reepitelización de la herida±DE	
	Sin tratamiento	CH-H
4	27±6	52±5
8	56±7	85±4
12	72±6	97±3

Figura 18. Resultados de la aplicación de un hidrogel de quitosano de alto peso molecular y DD en quemaduras de piel realizadas en el área dorsal de ratas (Modificada de [107]).

ANTECEDENTES

Quitosano

Actualmente se han desarrollado varias formas de materiales de apósitos para heridas a base de derivados del quitosano [90], de los cuales se presentan a continuación algunos ejemplos, así como el resultado obtenido por su aplicación en modelos animales y estudios realizados *in vitro*.

Estudios <i>in vitro</i>		
Tratamiento	Células	Resultados
Solución de Quitosano	Queratinocitos	Inducción de apoptosis Liberación de citocinas proinflamatorias estimulada
Plantillas porosas de Quitosano	Queratinocitos	Estimula la proliferación celular Aumenta niveles de TNF- α e CXC-8
Medio de cultivo con Quitosano 85% DD	Macrófagos	Estimula la quimiotaxis y la producción de NO por los macrófagos
Estudios <i>in vivo</i>		
Tratamiento	Animal/ tipo de herida	Resultados
Membranas de Quitosano 87% DD	Rata/herida abierta	Las heridas cerraron rápidamente. El análisis histológico confirmó un incremento de la reepitelización y un depósito de colágena en la dermis organizado.
Complejo de Quitosano-Alginato 95%DD	Rata/herida incisional	Acelera la cicatrización En la fase de remodelación, hay organización de fibras de colágena madura
Quitosano en polvo >90% DD	Rata/Quemadura	Previene la extensión de la herida
Hidrogel de Quitosano de alto peso molecular 92%DD (2%p/v)	Rata/Quemadura	Mejora la reepitelización y acelera el cierre de la herida Formación temprana del tejido de granulación
Gel de Quitosano 87.5%DD (3.5%p/v) con sulfadiazina del plata al 1%	Rata/Quemadura	Mayor producción de fibroblastos Estimula la angiogénesis
Hidrogel de Quitosano 87%DD (4%p/v)	Rata/Quemadura	Promueve la adhesión de fibroblastos y acelera el cierre de heridas Ayuda al restablecimiento de la arquitectura del tejido
Hidrogel de Quitosano (0.75%p/v), PVA (7.5%) con sulfadiazina del plata al 1%	Rata/Quemadura	Excelente capacidad de reparación de quemaduras Propiedades del gel mejoradas Actividad antimicrobiana prolongada
Hidrogel de Quitosano >75%DD (0.75%p/v), PVA (5%) y minociclina (0.25)	Rata/Herida excisional	Acelera la reparación de las heridas Propiedades fisicoquímicas mejoradas

Tabla 7. Resumen de los efectos en el proceso de reparación de heridas de diferentes preparaciones de quitosano en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* [88] [108] [90] [109].

9. Poloxámeros

Los poloxámeros, también conocidos como Pluronic® o Lutrol®, son una familia de copolímeros no iónicos de tres bloques compuestos de una molécula central hidrofóbica de poli-(óxido de propileno) (POP), que está flanqueada en ambos extremos por cadenas hidrófilas de poli-(óxido de etileno) (POE) (Fig. 19); debido a la hidrofobicidad/hidrofilicidad de sus bloques, estos polímeros tienen naturaleza anfifílica [110] [56].

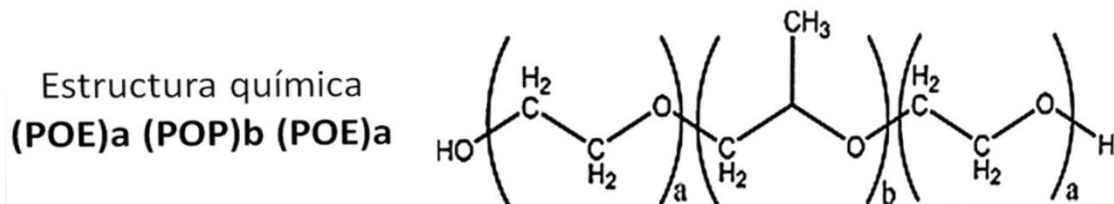


Figura 19. Estructura química de los copolímeros no iónicos de tres bloques “poloxámeros” [56].

Existen diferentes tipos de poloxámeros; todos tienen estructuras similares, pero con diferentes pesos moleculares y composiciones de los bloques de PPO y POE. Por ende, los poloxámeros se clasifican de acuerdo a su peso molecular promedio, y unidades de PPO y POE. Los grados disponibles más comunes son poloxámero (68, 88, 98, 108, 124, 188, 237, 338, 401, 402 y 407).

Tipo	PM promedio	Unidades POE	Unidades POP	Aplicaciones sugeridas
188	8400	2 x 52	30	Antitrombótico, actividades hemorreológicas, células de sellado de membrana, activación de fagocitos, producción de anión superóxido y degranulación de neutrófilos.
401	2000	2 x 5	67	Ingeniería de nanopartículas, inhibición de la resistencia a múltiples fármacos y actividades adyuvantes.
402	500	2 x 11	67	
407	12600	2 x 98	67	Tiempo de circulación de partículas largo, geles de liberación lenta, estimulación de los macrófagos, y de EGF (factor de crecimiento epidermal).

Tabla 8. Ejemplos de algunos tipos de poloxámero y sus aplicaciones sugeridas [110].

La principal razón de la utilidad de estas estructuras anfifílicas, es su capacidad de auto-ensamblaje para formar estructuras tipo micelar, ya que estas

tienden a evitar las interacciones desfavorables con el medio que las rodea, al tiempo que se maximizan interacciones más favorables de tal forma que se generan morfologías muy interesantes.

Estos polímeros se introdujeron por primera vez en la década de 1950 y desde entonces han encontrado una amplia gama de diversas aplicaciones en los campos farmacéutico y biomédico [110].

9.1. Poloxámero 407

Este copolímero es un polímero biocompatible con células y tejidos [49], [111], y es especialmente de interés ya que tiene una propiedad particular. El poloxámero 407, exhibe gelificación térmica reversible (termorreversibilidad inversa) en solución acuosa a concentraciones >20% p/v; esto quiere decir, que está en forma líquida, a baja temperatura y se convierte en gel a temperaturas más altas. A temperatura relativamente baja, las cadenas del polímero, están completamente extendidas interactuando con las moléculas de agua por lo que el bloque de POP está hidratado y el de POE es relativamente soluble en agua. Cuando la temperatura se eleva por encima de la temperatura de formación micelar crítica (CMT), se produce deshidratación y la interacción entre el bloque hidrófilo (PEO) e hidrofóbico (POP) del poloxámero se vuelve más fuerte lo que resulta en la disposición de estas partes en forma de red, provocando así, la formación del gel (Fig. 20), esto cuando la fracción de volumen de micelas es >0.53. [56], [112] [110], [113], [54], [53], [75] [114].

9.1.1. Eliminación del poloxámero 407.

Los datos toxicológicos disponibles DL50 para el poloxámero 407 se basan en la administración oral y dérmica, y esta es menor de 5 g kg⁻¹ peso corporal. La cinética del poloxámero radiomarcado después de la administración intravenosa y oral se ha determinado en ratas y perros. Estos estudios han indicado que la principal vía de excreción de polímero es renal y que la ruta de menor importancia es biliar [110], [115]. Rodgers *et al.*, han demostrado que después de la infusión intraduodenal de un análogo radiomarcado de los poloxámeros (poloxaleno 2930),

~ 20% de una dosis infundida se recuperó en la bilis, lo que indica que poloxalenes hidrófobos pueden ser adsorbidos y tal vez metabolizados por el hígado [116].

Gracias a su biocompatibilidad, baja toxicidad y a su capacidad de formar micelas; este copolímero se ha utilizado ampliamente en aplicaciones de entrega de fármacos y otras, que se verán en el siguiente apartado.

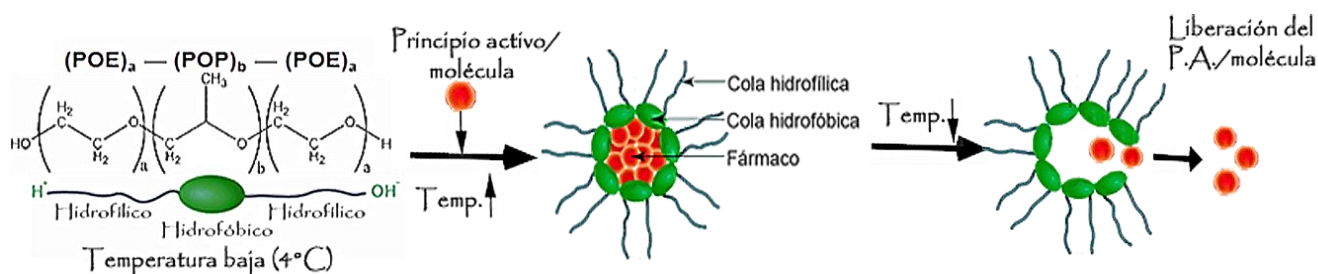


Figura 20. Formación de micelas poliméricas de P-407 para la incorporación de fármacos [117].

9.2. Aplicaciones

El Poloxámero 407 (P-407) tiene una gama amplia de aplicaciones; se utiliza como agente tensoactivo, solubilizante, dispersante y como vehículo de dentífricos fluorados. Este copolímero es adecuado para su uso en formulaciones para diferentes formas de dosificación (oral, tópica, intranasal, vaginal, rectal, ocular, y parenteral, gracias a su capacidad de gelificación *in situ*), liberación controlada de fármacos y proteínas, como promotor de absorción *in vivo* (siendo capaz de modificar la barrera de permeabilidad de la piel, sin dañar células viables), como vendaje para quemaduras, acelerador en la cicatrización de heridas, para tratamiento oftálmico, lesión cerebral, cardiovascular, entrega de genes y como andamios en ingeniería de tejidos.

9.2.1. Aplicaciones farmacéuticas

Área	Aplicación
Actividad biotecnológica	Para la evaluación de la susceptibilidad de biopelículas en tratamientos biocidas. Transfección de vectores adenovirales en células musculares lisas vasculares
Oclusión vascular temporal	Como un material embólico para oclusiones temporales. El gel demostró ser completamente soluble en agua, no demostró efectos adversos y se elimina por vía renal.
Materiales posquirúrgicos	Se utiliza como un material de barrera intraperitoneal para la prevención de formación de adherencias posquirúrgicas
Quemaduras	En vendajes para quemaduras, el P-407 mejora en el flujo sanguíneo capilar en la zona de estasis tras la lesión por quemadura. Geles hechos a base de P-407, con agentes bacteriostáticos o bactericidas, se han utilizado como una piel artificial en el tratamiento de quemaduras de tercer grado.
Óptica	Lentes de hidrogel a base de P-407.
Ingeniería genética	Para transfección y entrega de genes (por electroporación).
Prevención de necrosis de células del músculo esquelético adulto	Induce sellado de membranas dañadas como consecuencia de la lesión de reperfusión, electroporación, choque térmico y lesiones traumáticas.
Sistema de liberación de fármacos	Sistemas de gel de P-407 se han administrado por vía subcutánea para liberación controlada de péptidos y proteínas terapéuticas (insulina, interleucina-2, ureasa, hormona de crecimiento humano y algunos factores de crecimiento).
Heridas	Se ha sugerido que P-407 puede aumentar significativamente la tasa de cicatrización de la herida, posiblemente por la estimulación de la producción endógena de factor de crecimiento epidérmico.
Inmunología	Como vehículo para administración subcutánea de antígenos para aumentar la formación de anticuerpos.
Efectos inhibitorios sobre la resistencia a múltiples fármacos y modificador de la respuesta biológica	Micelas poliméricas de P-407: Permiten la incorporación de fármacos poco solubles en agua y los protegen de ser inactivados dentro del medio biológico. Tienen la capacidad de mejorar la citotoxicidad de agentes bioactivos anti-cáncer en los tejidos tumorales
Tratamiento de enfermedades cerebrales	Micelas poliméricas de P-407, pueden servir como acarreador de fármacos para el cerebro ya que es capaz de cruzar la BHE (barrera hematoencefálica).
Ingeniería de tejidos	Se han realizado andamios basados en P-407 para la regeneración de órganos, tejidos y crecimiento de líneas celulares, mostrando resultados prometedores y con baja respuesta inflamatoria.
Nuevo enfoque terapéutico para la distrofia muscular de Duchenne.	Es capaz de estabilizar las membranas distróficas del miocardio en modelos animales y pueden ofrecer un nuevo enfoque terapéutico para la enfermedad cardíaca en la DMD (distrofia muscular de Duchenne).

Tabla 9. Aplicaciones farmacéuticas del Poloxámero 407 [56], [115], [112] [110], [113], [54], [53], [75] [114].

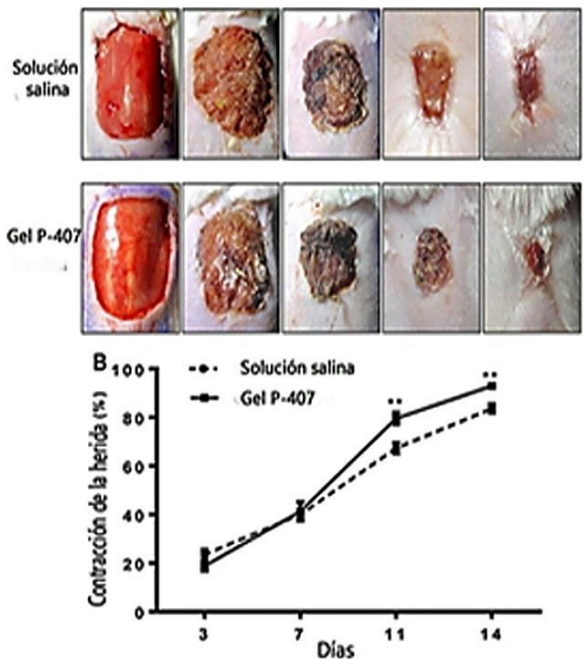
9.2.2. Aplicaciones para el tratamiento de heridas

Múltiples estudios han informado los efectos beneficiosos del copolímero Poloxámero 407 en la curación de heridas, entre los resultados encontrados, se ha visto que los geles hechos a base del P-407 aumentan notablemente la contracción y cierre de las heridas, aumenta la expresión de los factores de crecimiento VEGF, y TGF- β_1 . Hay más infiltración de leucocitos, ayuda a formar un buen tejido de granulación, aumenta la proliferación de fibroblastos, muestra mayor densidad de microvasos, y colágena en el área de la herida, además de que se cree que estimula el EGF, en comparación con diferentes controles entre ellos solución salina. Por lo tanto se ha demostrado que el P-407 posee una naturaleza inflamatoria leve, lo cual es de gran importancia en esta área [55] [118] [49] [119] [120].

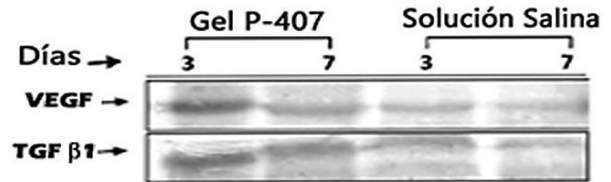
Kant evaluó los efectos de la aplicación tópica (una vez al día) durante 14 días de un gel hecho a base de P-407 (25%) en heridas cutáneas realizadas en ratas Wistar y se compararon contra un control cuya aplicación fue solución salina. Los resultados del estudio fueron favorables, encontrando que, la aplicación tópica del gel aumentó notablemente la contracción y cierre de la herida de una manera significativa, mostrando una diferencia significativa ($P < 0.01$) a los días 11 y 14 (Fig.21- I.), de la misma manera se observó mediante Western blot una mayor expresión de VEGF y TGF- β_1 (Fig.21-II.), con una diferencia significativa ($P < 0.05$), y al realizar la tinción Rojo Picrosirius, se observa más disposición de fibras de colágena a los días 3, 7, 11 y 14 (Fig.21-III.); todo esto en comparación con las heridas tratadas con el control [55].

ANTECEDENTES

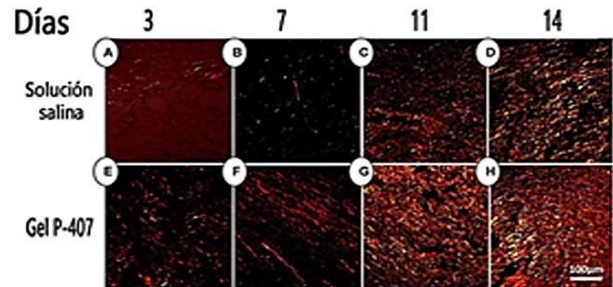
Poloxámero 407



I. Fotografías macroscópicas y gráfico del porcentaje de contracción de la herida a los días 3, 7, 11 y 14 de las heridas tratadas con el gel de P-407 y con el control de solución salina.



II. Western blots representativos para VEGF y TGF β1 en donde se muestra la expresión de las proteínas a los días 3, 7, con los diferentes tratamientos.



III. (A-H) Secciones histológicas de la herida cutánea teñidas con la tinción Picrosirius red muestran las fibras de colágeno bajo luz polarizada a los días 3, 7, 11 y 14 en ratas tratadas con el gel de P-407 y con solución. La formación de colágeno, así como la disposición fue mejor en las ratas tratadas con el gel, en comparación con los tratados con solución salina en los respectivos días. Fibras de colágeno gruesas son detectadas como anaranjadas-rojo, mientras que las fibras de colágeno delgadas aparecen de amarillo a verde.

Figura 21. Resultados mostrados en un estudio para la aplicación tópica de un gel de P-407 contra un grupo control de solución salina [55].

En otros estudios realizados por Lina Du, se observó que un gel preparado con P-407 no presenta ninguna toxicidad hacia fibroblastos en un cultivo celular, posteriormente, el gel fue aplicado en heridas de espesor total realizadas en la parte dorsal en ratas Sprague-Dawley (SD) machos, para observar sus efectos, y los resultados arrojados fueron: reducción del sangrado, rápida contracción durante los 8 días después de la herida ($P < 0.05$) (Fig.22-I), mayor tejido de granulación, más vasos sanguíneos (Fig.22-II) y una mayor reepitelización en comparación con el grupo control, al cual solo se le colocó una gasa estéril [120].

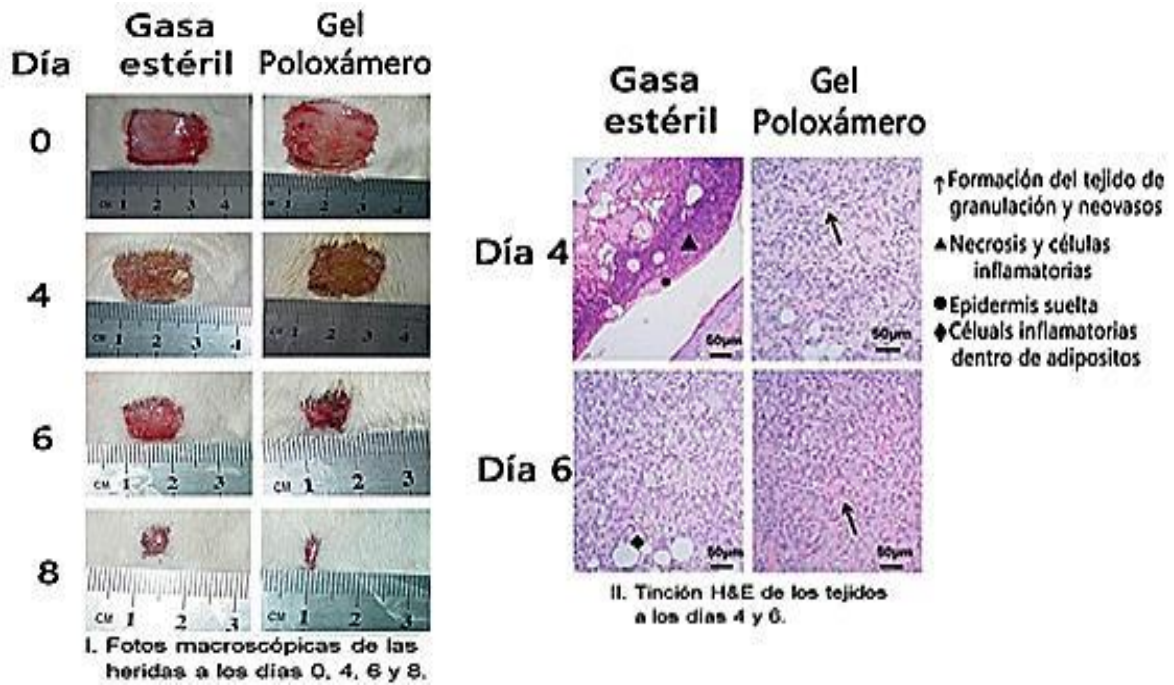


Figura 22. Se observa una mayor contracción del cierre de heridas y una mejor resolución de las mismas tanto macroscópica como microscópicamente en el grupo tratado con el poloxámero, al realizar la comparación con el grupo control [120].

10. Aplicación de irradiación Gamma en polímeros

En las últimas tres décadas ha crecido el uso de la irradiación gamma como una fuente de energía para aplicaciones de procesamiento químico. El hecho de que la radiación pueda iniciar reacciones químicas o destruir microorganismos ha permitido su uso a gran escala en diversos procesos industriales [121].

La irradiación gamma se usa para esterilizar diversos productos como alimentos deshidratados, materiales desechables de uso médico y quirúrgico, productos herbolarios, envases diversos, medicamentos y cosméticos, entre otros [122]; además la aplicación de la misma sobre polímeros puede ser empleada en diversos sectores industriales, tales como en el área biomédica, textil, eléctrica, aeroespacial, cementera, desarrollo de membranas, producción de revestimientos, productos de caucho, neumáticos, espumas, calzado, rollos de impresión, y en la industria farmacéutica [121]. En esta última, los hidrogeles obtenidos por los métodos de irradiación gamma han sido utilizados en diversas aplicaciones, principalmente como apósitos para heridas [123]. Esto se debe a que la irradiación presenta ciertas ventajas que se mencionan a continuación:

1. Esterilización y entrecruzamiento simultáneo (un solo procedimiento industrial simplifica el proceso y reduce los costos); sin la necesidad de añadir compuestos generadores de radicales libres (iniciadores) tales como peróxido de benzoilo, 2,2-azo-isobutironitrilo (AIBN), y peroxodisulfato de amonio, los cuales pueden ser perjudiciales [1].
2. Proceso más eficiente que el entrecruzamiento químico, el cual está limitado por la concentración y pureza de los iniciadores [121]; además la irradiación gamma presenta buena uniformidad de dosis [124].
3. Capacidad para producir hidrogeles con superficies suaves. Esta característica puede ser muy importante para la aplicación en heridas, debido a que la principal ventaja de los hidrogeles es el contacto suave con las terminaciones nerviosas, reduciendo el dolor, por lo que superficies más suaves logran un mejor efecto [125].

4. Permite el control de las propiedades físicas por la combinación de dosis con la composición polimérica; por ejemplo, la misma fórmula básica de los apósitos puede producir geles sólidos, elásticos y fluidos [125].
5. Método ecológico libre de contaminantes para fabricar biomateriales [126].
6. Fácil control del proceso [123].
7. Costo-efectivo, las técnicas de irradiación son eficientes en cuanto a energía y a que necesitan un espacio pequeño para su instalación [121].

10.1. Síntesis de nuevos polímeros por irradiación gamma

Los hidrogeles químicos se preparan comúnmente en dos formas diferentes: “polimerización tridimensional” (Fig.23), en la que un monómero hidrófilo se polimeriza en presencia de un agente de reticulación polifuncional, o por “entrecruzamiento directo” de polímeros solubles en agua (Fig. 24).

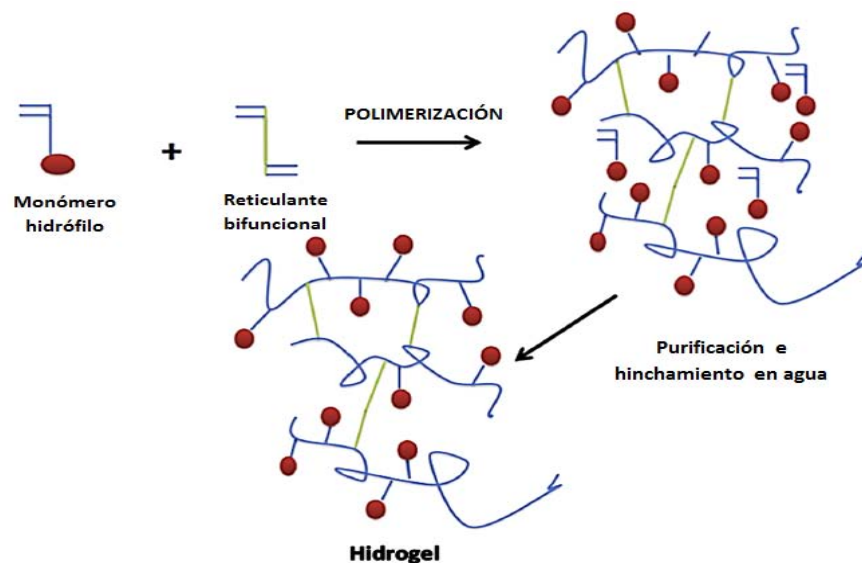


Figura 23. Síntesis de hidrogeles mediante polimerización tridimensional [52].

ANTECEDENTES

Aplicación de irradiación gamma en polímeros

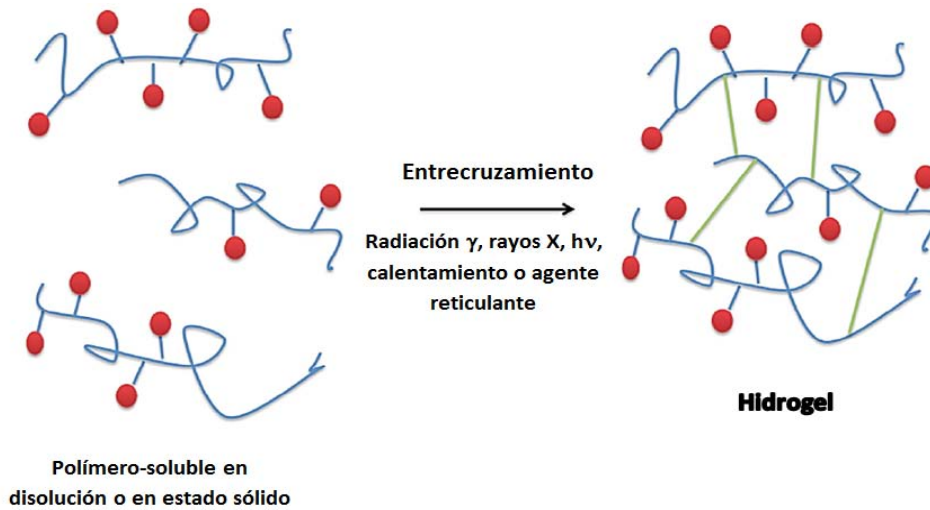


Figura 24. Síntesis de hidrogeles mediante entrecruzamiento de polímeros solubles en agua [52].

Durante el proceso de irradiación, la energía de la fuente de radiación - rayos gamma, haz de electrones o de rayos X - se transfiere al material procesado, lo que resulta en una variedad de reacciones químicas que alteran la estructura molecular del material. Radicales e iones libres se producen cuando el polímero se expone a la radiación ionizante. Estas especies activas son responsables de iniciar reacciones químicas, lo que lleva a modificaciones como entrecruzamiento (formación de la estructura de red), degradación (escisión de la cadena y reducción de peso molecular), injerto (polimerización de un monómero e injerto en la cadena del polímero base), curado (polimerización simultánea y entrecruzamiento) y evolución de gas [127].

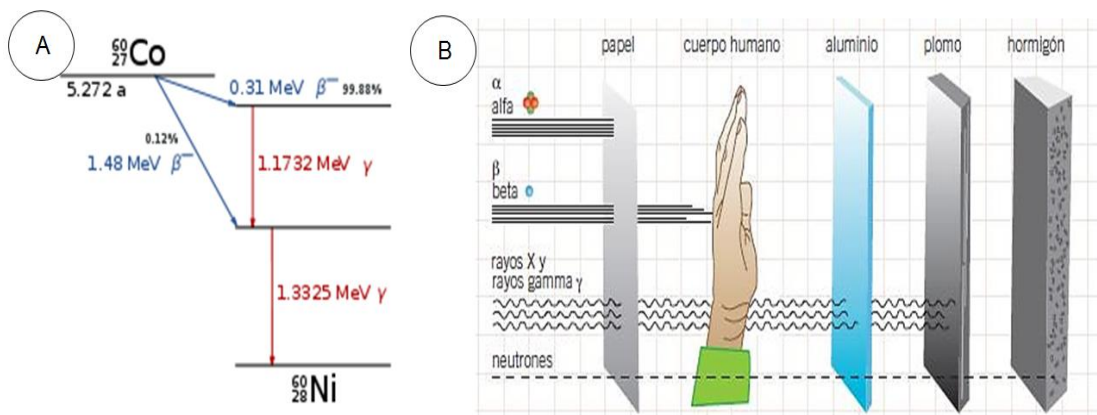


Figura 25. A) Decaimiento del Cobalto 60 y B) el alcance de los rayos gamma.

ANTECEDENTES

Aplicación de irradiación gamma en polímeros

Los polímeros generalmente sufren cambios estructurales durante la irradiación. Dependiendo de sus estructuras químicas, algunos polímeros se entrecruzan mientras que otros se degradan [127]. Alexander y Charlesby descubrieron que varios polímeros solubles en agua se entrecruzan cuando se irradian en soluciones acuosas a concentraciones por encima de 0,5 %p/v. Las principales reacciones que se producen en la irradiación de un polímero en solución son la excitación y la disociación tanto del polímero (P) como del disolvente (S) por la acción directa de la radiación [128].

- Mecanismo de entrecruzamiento

Una vez que las moléculas se vuelven electrónicamente excitadas o ionizadas ocurre una disociación en la cadena principal de P por los radicales del disolvente que conduce a la liberación de “macrorradicales” de la cadena principal (Fig.26). La formación de enlaces cruzados, por lo tanto, se atribuye a la combinación de estos macrorradicales que forman la red; sin embargo, es probable que otras reacciones ocurran, o que estos radicales libres se desactiven por reacciones con radicales libres de bajo peso molecular resultantes de la descomposición del disolvente [128]

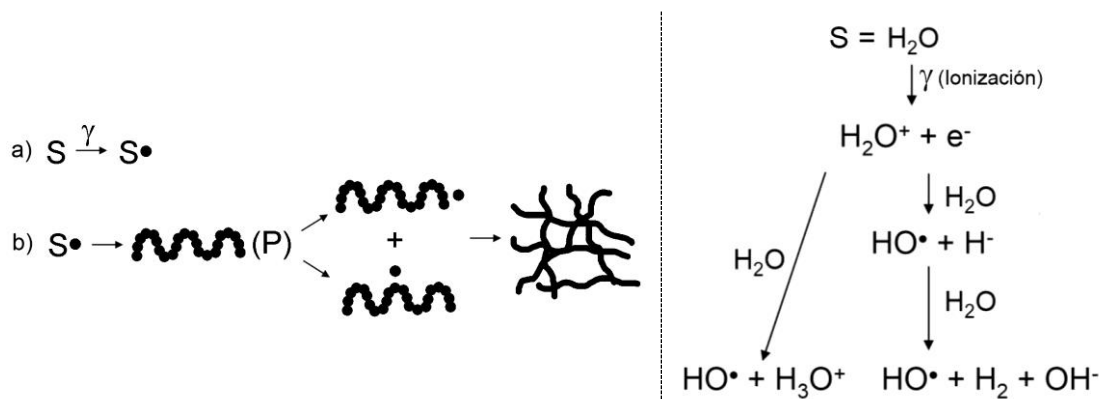


Figura 26. Mecanismo de entrecruzamiento de polímeros en solución acuosa. S, disolvente; P, polímero; γ R, irradiación gamma; e^- , electrón [128].

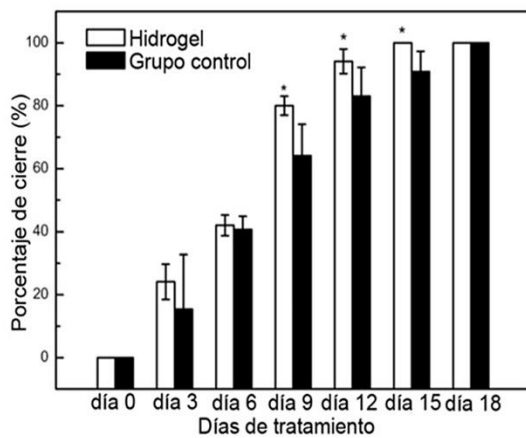
El entrecruzamiento por radiación tiene efectos sobre tres características principales, las cuales dependen de la naturaleza del polímero: el comportamiento

mecánico y resistencia térmica, estabilidad química, y propiedades de reparación [129].

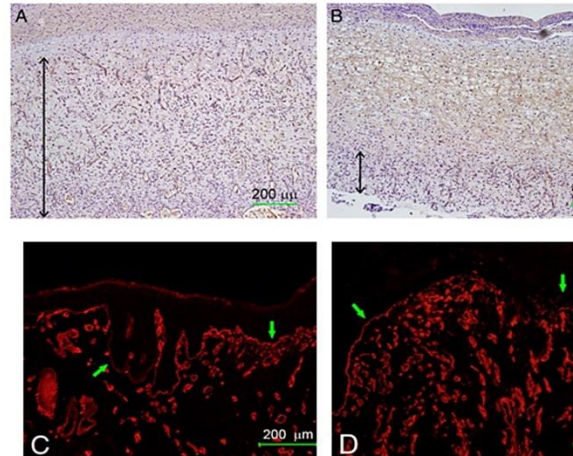
10.2. Aplicaciones de la irradiación gamma en la obtención de nuevos polímeros para su aplicación en la cicatrización de heridas

En dos estudios realizados por Huang y Khodja, se obtuvieron dos hidrogeles mediante irradiación gamma, el primero, una mezcla de CM-CH y gelatina, y el segundo una mezcla de CH y PVA, y se evaluaron como posibles apósitos para el tratamiento de heridas.

En el primero caso, los hidrogeles se aplicaron en un modelo de rata mediante heridas cutáneas de espesor completo con una diámetro de 3.0 cm. En comparación con el grupo control (película de poliuretano), el grupo tratado con el hidrogel mostró significativamente un mayor porcentaje de cierre en los días 9, 12 y 15; con la formación de un tejido de granulación significativamente más grueso en los días 3 y 6. La figura 27-II. A y B muestra que al día 3, las heridas tratadas con el hidrogel mostraron una amplia distribución de vasos sanguíneos en el tejido de granulación desde la capa superficial hasta la capa basal, mientras que en el grupo control el tejido de granulación es visible únicamente en la base de la herida. Además, en el grupo al que se le aplicó el hidrogel se detectó la existencia de una membrana basal continua en toda el área de la herida, mientras que se observó una membrana basal incompleta en el grupo control. Los resultados aparentemente revelaron que los hidrogeles irradiados de quitosano/gelatina pueden inducir la formación de tejido de granulación y acelerar la cicatrización de heridas con una reepitelización temprana [126].



I. Cinética de cierre de las heridas de los diferentes tratamientos.



II. (A) y (B) Formación de tejido de granulación evaluado por inmunohistoquímica de VEGF al día3; (C) y (D) evaluación de la formación de la membrana basal en el día 15 mediante inmunofluorescencia de colágena IV.

Figura 27. Evaluación de los hidrogeles irradiados de quitosano/gelatina en un modelo de rata mediante heridas cutáneas de espesor total [126].

Por otro lado, el segundo hidrogel desarrollado a base de PVA con 0.25% de quitosano se evaluó en un modelo de quemadura de segundo grado en rata. Las heridas tratadas con este hidrogel cicatrizaron más rápidamente que aquellos tratados con una gasa de parafina y gasa de algodón (control); así mismo, el análisis histológico, mostró que el nuevo tejido de granulación y la reepitelización progresaron mejor con el hidrogel [130].

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Obtención, caracterización y evaluación in vivo de un nuevo hidrogel a base de Poloxámero 407-Quitosano mediante el entrecruzamiento por irradiación gamma para acelerar el proceso de reparación de las heridas y como posible vehículo para la administración de fármacos que mejoren la cicatrización.

Objetivos Particulares

1. Obtener una serie de hidrogeles a base de Poloxámero 407-Quitosano y llevar a cabo su caracterización fisicoquímica mediante:
 - Pruebas de pH y precipitación.
 - Microscopía electrónica de barrido.
 - Calorimetría diferencial de barrido.
 - Determinación del tiempo y temperatura de gelación.
 - Viscosidad.
 - Prueba de absorción de agua.
 - Bioerosión
 - Pruebas antimicrobianas y antimicóticas
2. Evaluar la actividad biológica de los materiales desarrollados en un modelo de herida excisional de espesor total en ratones de la cepa CD1 mediante:
 - Medición del porcentaje del cierre de heridas.
 - Evaluación de la reparación de las heridas excisionales de espesor total tratadas con los distintos hidrogeles mediante las tinciones histológicas H&E, tricrómica de Masson y Herovici.
 - Análisis del infiltrado de neutrófilos y macrófagos.
 - Observación de la activación de los fibroblastos.
 - Evaluación de la expresión de TGF- β_3 .

V. HIPÓTESIS

El entrecruzamiento de Poloxámero 407- Quitosano mediante radiación gamma, formará un gel con propiedades fisicoquímicas y biológicas que lo harán apropiado para el tratamiento de heridas de piel, al acelerar la cicatrización con una mejor resolución de la herida.

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL
Lista de equipos, materiales y reactivos empleados.

VI. METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

11. Lista de equipos, materiales y reactivos empleados.

11.1. Equipos de laboratorio

Equipo de agua destilada (Millipore, Elix5, Serie FNN03127)
Equipo de agua desionizada (Millipore, MilliQ-Synthesis, Serie F8PN30474 F)
Liofilizadora de mesa (Labconco®FreeZone 6 Liter Bench Top E.U.A.)
Microscopio Electrónico de Barrido
Calorímetro Diferencial de Barrido (Q100 TA Instruments)
Microscopio Zeiss (AXIO Imager. Z1)
Baño de agua (Fisher Scientific, Modelo 134)
Viscosímetro Brookfield CAP 2000, aguja para viscosímetro del número 3 (Massachusetts, E.U.A.)
Potenciometro pHi 510 Beckman Coulter E.U.A.)
Fotodocumentador Bio-Rad Universal Hood II
Balanza Granataria (Multi-function balance GX series)
Baño de agua con agitación BS-06
Transelektro LGI-01 con 3247.01 Ci y razón de dosis de 0.249 kGy/h
Horno de Secado (RedLINE)
Microtomo Leica RM2125RT
Autoclave (385 ML Serie 1002916)

11.2. Materiales de laboratorio

Coplin de vidrio
Histosettes
Navajas para histología
Pinzas de disección
Tijeras de disección
Sacabocados (BIOPSY PUNCH de 5mm, desechable de plástico MX33.35 Miltex)
Tubos BD vacutainer sin anticoagulante, con o sin gel separador y activador de coagulación con silicón.

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL
Lista de equipos, materiales y reactivos empleados.

Jeringas de 1, 3, 5 y 10mL

Termómetro

11.3. Reactivos

Glicerina pura (Farmacia Paris)

Quitosano de bajo peso molecular (Aldrich Chemistry, PCode: 1001524723, Lote: #SLBG1673V)

Lutrol® F-127 (Poloxámero 407, Sigma Life Science, PCode: 101148499, Lote: #BCBH0774V)

Estándar Brookfield para calibración del viscosímetro, fluido 30000, viscosidad 28800, Lote: 081000

Estándares para potenciómetro de pH=4,7 y 10.

Trietanolamina (SIGMA, Lote: 076K1239)

m-Xileno anhídrido (Sigma-Aldrich)

Alcohol absoluto (Sigma-Aldrich)

Alcohol 96% (HYCEL)

Alcohol 70% (HYCEL)

CitriSolv®

Paraplast®

SafeFix®

Hematoxilina de Harris (HYCEL)

Eosina (HYCEL)

Carbonato de Litio (Reactivo Meyer, Lote: M1008912)

Fijador de Bouin

Hematoxilina de Hierro de Wiegert

Fucsina ácida

Ácido Fosfotungstico/Fosfomolibdico

Azul de anilina

Azul celestino

Hematoxilina de Ragoud

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL
Lista de equipos, materiales y reactivos empleados.

Amarillo de metanilo

Solución picropolicrómica

Ácido Acético Glacial (Fermont, 99.8%)

Entellan®

Albúmina Bovina fracción V (MP-151429)

Tritón® X-100 (Sigma T8787-100ML)

ImmEdge Pen®

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche)

VECTASHIELD®

Crystal Mount (Sigma-Aldrich)

11.4. Material biológico

Ratones de la cepa CD1, machos, de 2 meses y medio de edad.

Suero sanguíneo humano

11.5. Anticuerpos

Anti-Elastasa (ab21595)

Anti-F4/80 (ab6640)

Anti-TGFβ₃ (ab15537)

Anti-αSMA (ab7817)

Anti-Conejo TexasRed (TI-1000)

Anti-Rata FITC (SC-2011)

Alexa Fluor® 488

11.6. Fármacos

Ketamina (ANESKET®, PiSA, Lote: A122151)

Xilacina (PROCIN®, PiSA, Lote: A063085)

Isoflorano (Sofloran® Lote: C101901)

Clorhidrato de tramadol (Tramadol, AMSA, Lote: A093269)

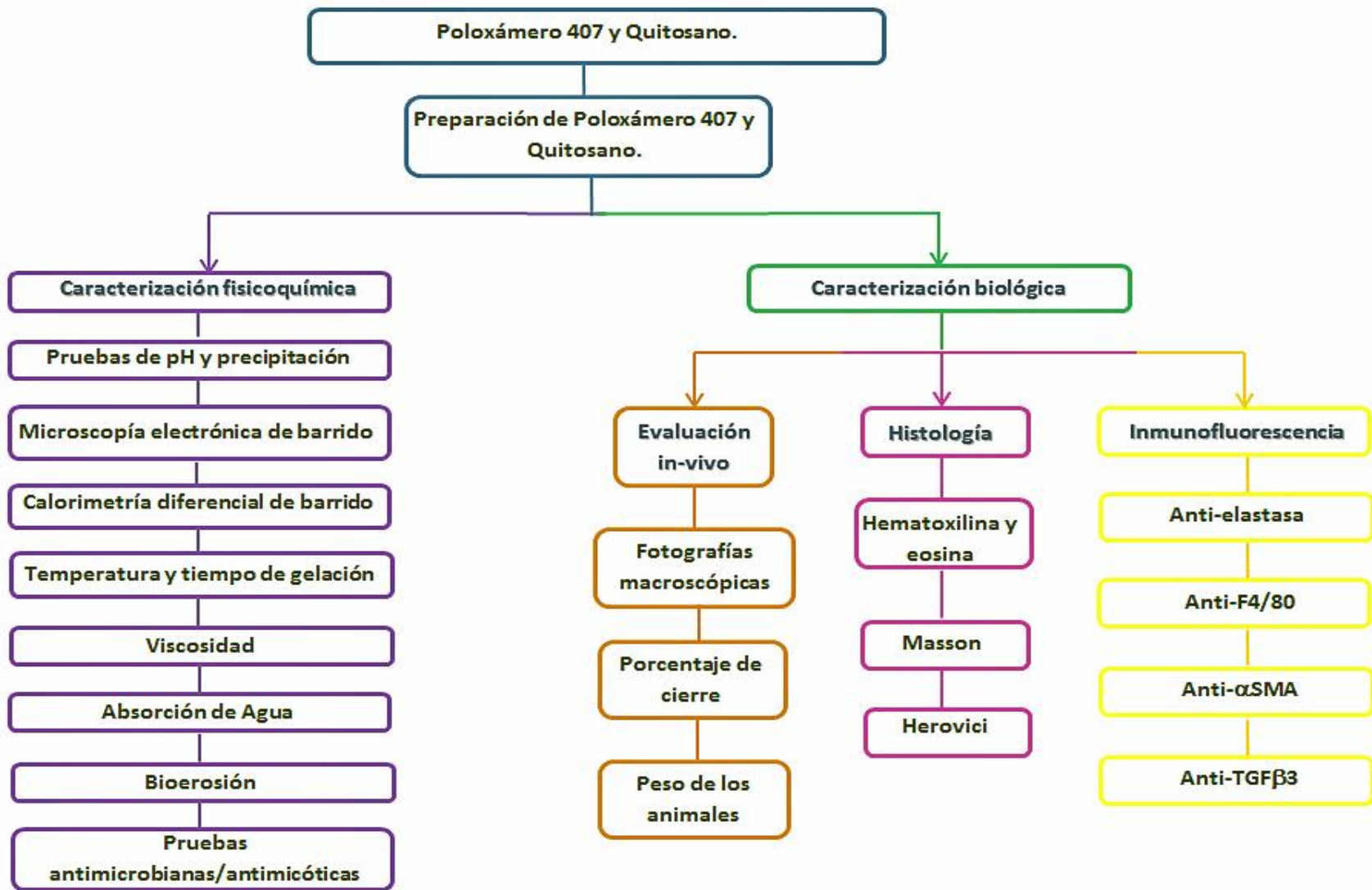


Figura 28. Diagrama de la metodología.

12. Preparación de las muestras

12.1. Hidrogel de poloxámero 407 (25%p/v; P-407):

Se pesaron 25g de P-407 en una balanza granataria, y se fue añadiendo lentamente al agua con agitación vigorosa en un matraz aforado de 100mL, y posteriormente se llevó a la cámara fría para tener una temperatura de 4°C, se dejó agitar durante 3-5 horas y una vez que se observaba homogénea la solución, se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

12.2. Solución de quitosano (0.75% p/v; CH):

Esta solución se preparó en ácido acético 0.5% p/v, por lo cual el primer paso fue elaborar la solución de ácido acético con agua desionizada. El siguiente paso fue disolver 0.75g de quitosano en aproximadamente 50mL de la solución de ácido acético en un matraz aforado de 100mL, se agitó vigorosamente y, se dejó disolver por un tiempo de 12-24 horas a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea, se llevó a la marca de aforo con solución de ácido acético y por último se pasó por papel filtro para tratar de eliminar las impurezas.

12.3. Hidrogel de poloxámero 407+quitosano (mezcla física; CH+P)

Se pesaron 0.75g de quitosano y se disolvieron en ácido acético al 0.5%p/v en un matraz de 100mL, se dejó disolver por 12-24 horas con agitación vigorosa a temperatura ambiente y, se filtró la solución. Posteriormente se pesó 25g de P-407 y se añadieron lentamente a la solución de quitosano en el matraz aforado, se colocó en la cámara a 4°C y se dejó en agitación por 3-5 horas. Finalmente, cuando se observó una solución homogénea, se llevó a la marca de aforo con solución de ácido acético 0.5% p/v.

12.4. Hidrogel de poloxámero 407- quitosano (mezcla irradiada; CH-P 4)

Este hidrogel se obtuvo al someter la mezcla física (descrita anteriormente) a irradiación gamma, con una dosis absorbida de 25KGy, utilizando como fuente ⁶⁰Co, esto se llevó a cabo con el equipo Transelektro LGI-01 con 3247.01 Ci y

razón de dosis de 0.249 kGy/h, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

12.5. Hidrogel de poloxámero 407–quitosano irradiado a pH =7 (mezcla irradiada a pH de 7; CH-P 7)

Con el objetivo de tener un hidrogel con pH neutro que no fuera irritante en su aplicación en las heridas, a partir del gel de CH-P 4 cuyo pH era de 4.66 se neutralizó utilizando trietanolamina grado reactivo analítico, se agregó gota por gota y se monitoreó el pH usando un potenciómetro previamente calibrado.

13. Pruebas de pH y precipitación

Se utilizaron 10mL de cada uno de las muestras preparadas: P-407, CH, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7. Las muestras se colocaron en un vaso de precipitados y se mantuvieron en agitación constante; con ayuda de una jeringa de 1mL, se les fue añadiendo trietanolamina gota por gota, y en todo momento se fue monitoreando el pH con el potenciómetro. La prueba se realizó a una temperatura de 4°C, excepto con la solución de quitosano, esto con la finalidad de tener los compuestos en forma líquida y tratar de ajustarlos a un pH=7. Se analizó de forma macroscópica la aparición de algún precipitado.

14. Liofilización de las muestras.

Se colocaron 5mL de cada uno de los compuestos (P-407, CH, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7) en viales de vidrio y se congelaron a -20°C durante 3hrs, después se pusieron en un vaso de congelación rápida y se conectaron a la liofilizadora LABCONCO freezone 6, esta se programó para llevar a cabo la liofilización a una temperatura de -50°C y a un vacío de 175×10^{-3} mBar. El proceso de liofilización duró 24 horas.

15. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La caracterización morfológica de los materiales (P-407, CH, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7), se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido, esto con el

fin de conocer las estructuras de cada material y realizar un comparativo entre los componentes solos, mezclados, al someterlos a irradiación y al ajustar el pH.

Se utilizó un microscopio Leica Stereoscan 440 (Leica Microsystems), las muestras que se utilizaron para poder ser caracterizadas por esta técnica, fueron las liofilizadas, esto para que tuvieran una consistencia de polvo poroso y obtener imágenes con mayor resolución, también cabe mencionar que no tuvieron recubrimiento de oro. Se observaron en aumentos de 500X y 1000X en alto y bajo vacío.

16. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se empleó el método de calorimetría diferencial de barrido para determinar las posibles interacciones químicas en los componentes de los hidrogeles, antes y después del tratamiento de irradiación gamma (P-407, CH, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7). Se utilizó un calorímetro Q100, el cual fue calibrado con una muestra de Indio (3mg) y se realizó una línea base con porta muestras de aluminio no herméticas vacías. Se colocaron 3mg de muestra liofilizada, y se empleó un rango de análisis de 0 a 200°C con un flujo de calentamiento de 10°C/min, usando nitrógeno para purgar la cámara de análisis. El análisis se realizó por triplicado.

17. Tiempo y temperatura de gelación

La determinación del tiempo y temperatura de la transición sol-gel de cada uno de los hidrogeles (P-407, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7) se llevó a cabo utilizando el método de cizalla oscilatoria en el Viscosímetro Brookfield CAP 200, previamente calibrado con el fluido 30000 para la utilización de la aguja del número 3. Las muestras (100µL de cada hidrogel), se colocaron en el plato del equipo, de forma líquida y se ajustaron las variables.

El tiempo y temperatura de transición sólido-gel, para los experimentos de viscosidad se determinó en la región lineal de las muestras analizadas, región en donde la viscosidad es directamente proporcional a la temperatura. [2] [74]. Se utilizó una rampa de temperatura de 7-30°C con una velocidad de cambio de 10-11segundos por cada aumento de unidad de temperatura (por cada grado

Celsius), y a una velocidad constante de 50 rpm. Estas determinaciones se realizaron por triplicado y utilizando el software *Capcalc V.1.02. Brookfield Engineering Laboratory*.

Finalmente, los resultados obtenidos se sometieron a una prueba de Análisis de varianza de un factor en Excel, con el fin de determinar las posibles diferencias significativas de tiempo y temperatura de gelación, entre los hidrogeles analizados (Ver anexo III).

18. Determinación de los perfiles de viscosidad

Se utilizó un viscosímetro Brookfield CAP 2000, empleando la aguja número 3, a una temperatura constante de 37°C; para el uso de esta aguja, el equipo fue calibrado con el fluido 30000, de viscosidad conocida.

El comportamiento mecánico de los fluidos (P-407, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7), en este caso la viscosidad y el tipo de relajación, se obtuvieron por medio de la oposición de los diferentes hidrogeles a la fuerza de corte o cizalla. Para ello, se colocaron 100µL de cada uno de los hidrogeles en el plato del viscosímetro, se configuraron las variables deseadas: rango de velocidad, de 120 a 600rpm y en orden inverso, en intervalos de 20rpm, esperando 11 segundos entre cada cambio de velocidad y 3 segundos para el registro de la viscosidad.

Esta determinación se realizó utilizando el software *Capcalc V.1.02. Brookfield Engineering Laboratory*. El análisis se realizó por triplicado.

19. Prueba de captación de humedad.

Se prepararon distintas soluciones de glicerol (grado analítico) y se emplearon para proporcionar distintas humedades relativas en las cuales estuvieron en contacto los hidrogeles, como una aproximación del comportamiento de las soluciones de interés en contacto con una herida [131].

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Pruebas fisicoquímicas

Glicerol % (p/v)	% HR
92	20
89	30
84	40
79	50
72	60
64	70
51	80
33	90

Tabla 10. Concentración del glicerol y el porcentaje de humedad relativa que cada solución proporciona.

Se colocaron 5mL de cada uno de los hidrogeles: P-407, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7 en forma líquida, en dispositivos de plástico circulares de peso conocido, de 3.1 cm de diámetro por 1.4 cm de altura y se dejaron gelificar por 12 horas a temperatura ambiente (23-25°C). Pasadas las doce horas, se registraron los pesos iniciales de los hidrogeles en una balanza granataria (Multi-function balance GX series), se colocaron en una cámara cilíndrica de vidrio, con dimensiones de 4.8 cm de diámetro y 5 cm de altura, a cada una de estas cámaras previamente se les colocó 20mL de las distintas soluciones de glicerol, y se cerraron herméticamente para establecer las distintas humedades relativas. Posteriormente estas cámaras con las soluciones de glicerol y los dispositivos de plástico se colocaron en un horno a una temperatura de 37 °C por 6 horas (los hidrogeles se encontraban en el dispositivo de plástico, por lo cual los hidrogeles no estaban en contacto directo con las soluciones, si no el dispositivo que los contenía, pero las soluciones de glicerol generaron la humedad relativa deseada en toda la cámara, y por lo tanto el ambiente dentro de la misma). Transcurrido este periodo, se registraron nuevamente los pesos de los dispositivos con los hidrogeles, y por diferencia de pesos se determinaron los porcentajes de agua absorbidos o eliminados por cada uno de los hidrogeles preparados [132]. Esta prueba se realizó por triplicado.

20. Prueba de bioerosión/hinchamiento

Los perfiles de bioerosión y/o hinchamiento de los hidrogeles (P-407, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7), se determinaron mediante un método gravimétrico. Esta prueba

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Pruebas fisicoquímicas

se llevó poniendo en contacto un pool de suero sanguíneo de varias personas (ver sección “obtención del suero sanguíneo”). Se emplearon tubos de vidrio de 1.7cm de diámetro y 11.5cm de altura previamente pesados. El primer paso fue colocar 1mL de cada uno de los hidrogeles en diferentes tubos (10 por cada corrida), a 4°C; el siguiente paso fue dejarlos equilibrar a temperatura ambiente (23-25°C) por 12 horas. Después, los tubos con los hidrogeles se pesaron en una balanza granataria y se les adicionó 1mL del pool de suero sanguíneo. Luego los tubos se colocan en un baño de agua (marca BS-06) previamente equilibrado a 37°C y con agitación constante de 50rpm. Posteriormente, el sobrenadante fue removido decantando los tubos durante un minuto a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 y 24 horas de haberse puesto en el baño. Finalmente, los tubos se pesaron y por diferencias de pesos se determinó la bioerosión o el hinchamiento de los geles. Esta prueba se hizo por triplicado.

20.1. Obtención del suero sanguíneo:

El suero sanguíneo fue recolectado de diferentes personas y también adquirido de la sección del banco de sangre y del laboratorio clínico del Instituto Nacional de Rehabilitación.

20.1.1. Criterios de inclusión.

Se obtuvo suero sanguíneo de personas mayores de 18 años, sin ninguna patología específica, o en estado de ayuno, y con su consentimiento.

Muestra de suero sanguíneo con características sui generis: fluido, de color amarillo claro característico.

20.1.2. Criterios de exclusión

Personas menores de edad, con alguna patología grave o que no presentaran su consentimiento.

20.1.3. Criterios de eliminación.

Muestra de suero sanguíneo de color y aspecto diferentes (color café, espeso y/o con restos de sangre sin coagular).

20.1.4. Tamaño de la muestra.

Se obtuvo suero sanguíneo de 15 personas, para obtener un volumen de suero final de 150mL, aproximadamente 10mL por persona.

21. Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

Esta prueba se realizó para determinar la capacidad antimicrobiana y antimicótica *in vitro* de los diferentes compuestos desarrollados (CH, P-407, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7). La técnica utilizada fue la de difusión por disco, y se realizó en el laboratorio de Infectología del piso 7 del CENIAQ,

Para esta prueba de susceptibilidad se utilizó una bacteria gram positiva (*S. aureus* ATCC29213), dos gram negativas (*E. coli* ATCC25922 y *P. aeruginosa*; aislado clínico) y un hongo (*C. albicans*; aislado clínico).

La técnica para realizar esta prueba fue la siguiente: discos de papel filtro (de 6mm de diámetro) previamente esterilizados se embebieron con 25µL de cada uno de los compuestos (los compuestos se aplicaron en los discos en forma de sol y posteriormente se dejaron gelificar por 5 minutos), entre ellos un control negativo de agua destilada estéril, después se preparó una suspensión del inóculo mediante el método de la turbidez; para ello, se tomó una porción de bacterias o del hongo de la cepa correspondiente de un cultivo de 24 horas, y se suspendió en un tubo con solución salina hasta llegar a la concentración deseada, la suspensión se estandarizó a 0.5 en escala de McFarland (correspondiente a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL). Después, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión, se removió el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo y se inocularon en las diferentes placas con agar Müller Hinton mediante el método de siembra masiva. Luego se procedió a colocar los discos en cada una de las placas, se identificaron adecuadamente, se colocaron a una distancia razonable y se presionaron para asegurar el contacto completo con la superficie del agar y que no se cayeran durante la incubación, que fue el siguiente paso. La incubación se hizo a una temperatura de 37°C en una incubadora (BINDER) por 24 horas. Para concluir, las placas se examinaron detenidamente, se observaron a contra luz, y en caso de presentarse halos de inhibición, estos se midieron redondeando al milímetro más cercano con una regla, vernier o un calibrador.

22. Evaluación *in vivo*

22.1. Animales

Ratones de la cepa CD1 machos (n=27) fueron adquiridos del Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, espacio y ventilación adecuados. El permiso para el uso de animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto antes de la experimentación. Todos los animales recibieron atención de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

22.2. Creación de las heridas.

Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal (ip), con ketamina/xilacina a una dosis de 100/10 mg/kg para lograr una anestesia profunda. Paso seguido, la piel dorsal de los animales se afeitó con una máquina de corte y se aplicó jabón quirúrgico para retirar los residuos de pelo con una navaja, inmediatamente, con ayuda de un biopsiador/sacabocado de 5mm de diámetro, se realizó una lesión de tipo excisional de espesor total en la región occipital, a una profundidad considerable, sin llegar a lastimar músculo y a 5.5 cm de distancia desde la nariz del animal. A cada animal se le realizaron dos lesiones de manera horizontal con una separación de 7mm (Fig. 29); cada una de las heridas se trató con los distintos compuestos de interés (100µL aproximadamente), entre ellos hubo un control, al cual se le aplicó solución salina fisiológica. Después de la recuperación de la anestesia, los ratones se alojaron individualmente en jaulas debidamente marcadas y desinfectadas. Asimismo se administró como analgésico clorhidrato de tramadol por vía oral en una dosis de 4mg/kg en el agua, por tres días.

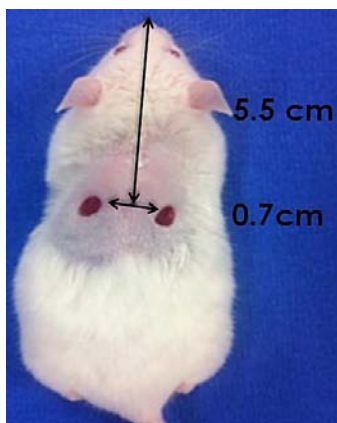


Figura 29. Heridas excisionales en los ratones de la cepa CD1.

22.3. Aplicación del tratamiento

Se aplicaron 100µL del tratamiento (solución de quitosano, P-407, CH+P407, CH-P 4 y CH-P 7) diariamente hasta por un tiempo de 11 días. Los ratones se dividieron en tres grupos de evaluación, cada uno con 9 animales, a los cuales se les dio punto final (cámara de CO₂) de 3 en 3, a los 3, 7 y 11 días. Para la posterior toma de muestra de la herida correspondiente a la evaluación histológica y caracterización biológica.

Grupo	Tratamiento en Herida		Tiempo de evaluación (días)		
	Izquierda	Derecha	3 (n=3)	7 (n=3)	11(n=3)
1	Solución salina (control)	Hidrogel de P-407	X	X	X
2	CH	CH+P	X	X	X
3	CH-P 4	CH-P 7	X	X	X

Tabla 11. Tratamientos aplicados y días de evaluación.

22.4. Criterios de inclusión.

Se seleccionaron ratones machos de la cepa CD1 de 2.5 meses de edad y de 35-40g de peso.

22.5. Criterios de eliminación.

Aquellos animales que no presentaron una lesión de tipo excisional de espesor total, o que la excisión haya sido muy profunda o con complicaciones, que hayan

desarrollado infección en la zona de lesión o algún otro proceso inflamatorio no relacionado con la misma.

22.6. Criterios de exclusión

Ratones que presentaron algún tipo de lesión en la piel y/o síntomas de infección.

22.7. Tamaño de la muestra.

Se manejó un total de 27 animales. Se evaluaron tres tiempos posteriores a la lesión en el día 3,7 y 11, cada grupo por triplicado.

22.8. Descripción de las variables de estudio.

- Variable independiente: Lesión excisional de espesor total
- Variable dependiente: Porcentaje de cierre de la herida.

23. Documentación de las heridas y su porcentaje de cierre.

La observación de la evolución de las heridas se realizó diariamente y se documentó de una manera cualitativa mediante fotografías; para poder llevar a cabo un análisis cuantitativo, se marcó diariamente con un plumón de punto fino, el perímetro de las heridas en un dispositivo de plástico, para posteriormente con ayuda de un software determinar el área.

Para poder llevar a cabo estos análisis fue necesario anestésiar temporalmente (por 3 minutos) a los ratones con isoflurano vía nasal.

23.1. Medición de las áreas de las heridas.

El área de las heridas se midió en el equipo fotodocumentador GelDoc XR Biorad, mediante el software Quantity One.

Los resultados obtenidos de las áreas, se trataron para obtener el porcentaje de cierre de las heridas utilizando la fórmula reportada:

$$\text{Porcentaje de cierre de la herida}(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

Dónde: A_0 =área al día 0; A_t =área al día del tratamiento

Posteriormente los datos se sometieron a un análisis estadístico con el programa GraphPadPrism 6 mediante una prueba no paramétrica (KW, $\alpha=0.05$), con el fin de ver si hay diferencias significativas en cuanto al cierre de la herida entre los distintos tratamientos aplicados.

24. Registro del peso de los animales.

Una variable importante es el peso de los animales, puesto que este es un indicativo de la salud y estabilidad de los mismos, un cambio drástico en el peso de los animales puede indicar que éstos están en malas condiciones o que presentan una complicación, por lo tanto se llevó a cabo el registro del peso diariamente con la ayuda de una balanza granataria e igualmente los animales estaban anestesiados temporalmente con isofluorano.

25. Técnicas histológicas

25.1. Fijación, inclusión y corte de los tejidos

Para poder examinar de forma precisa la piel es importante preservar, en la medida de lo posible, el estado original del tejido. Esto se logra mediante una técnica conocida como fijación, que es un proceso que permite mantener la integridad de las proteínas y otras estructuras presentes en las muestras, inhibiendo el proceso de degradación innato mediante criopreservación o tratamiento con fijadores químicos, y embebiendo las muestras en bloques de parafina que proporcionen un soporte para realizar el corte de los tejidos [133].

A los días 3, 7 y 11 de tratamiento se dio punto final a 3 ratones para obtener los tejidos de las zonas lesionadas, los cuales se fijaron en SafeFix® por 24 horas y se cortaron de forma transversal a la mitad de la herida. Después se procedió a deshidratarlos utilizando soluciones acuosas graduales de etanol (50, 80, 96 y 100%) durante 30 minutos cada uno y agitación constante. La deshidratación es simplemente la eliminación de agua en el tejido posterior a la fijación y es necesario realizarla para preparar al tejido que se introducirá en medios no acuosos como la parafina. Para ello, se utilizan alcoholes, ya que son

miscibles con los fijadores acuosos y además el alcohol puede penetrar en el tejido rápidamente y sustituir al agua. Dado que la mayoría de los alcoholes no son miscibles con la parafina es necesario añadir un paso conocido como aclaramiento, en donde se utilizan agentes que son solubles en alcohol, para removerlos de forma efectiva, y en parafina [134]. Por esta razón, los tejidos se colocaron en una mezcla de etanol-Citrisolv® (disolvente a base de limoneno sustituto de xileno para uso en histología) 50:50 por 15 minutos, y por último, en Citrisolv® a 60°C por 10 minutos.

Los tejidos deshidratados se embebieron en parafina (Paraplast®) a 60°C, y una hora después la parafina se sustituyó por una nueva, se sacaron del horno y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la inclusión de los tejidos en histosettes correctamente identificados

Los tejidos ya incluidos en los bloques se dejaron enfriar. En seguida, se realizaron cortes entre 4-5 µm en el micrótopo Leica RM2125RT y se montaron en portaobjetos para el posterior análisis histológico.

25.2. Tinción de H&E para el análisis histomorfológico de las heridas

La tinción es una técnica utilizada en microscopía con el objetivo de mejorar el contraste en la imagen observada a través del microscopio mediante el uso de colorantes específicos para identificar diferentes estructuras celulares tales como DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos.

La tinción de H&E se realizó de la siguiente manera: primero los portaobjetos con los tejidos se introdujeron en un coplin a 60°C durante media hora e inmediatamente se desparafinaron utilizando xileno a 60°C por 10 minutos. Después se rehidrataron utilizando soluciones graduales de etanol (100, 96, 80 y 50%) y por último, agua destilada (Elix5). Los tejidos se colocaron en Hematoxilina de Harris al 30% durante 6 minutos y en seguida se les agregaron gotas de carbonato de litio saturado para virar el color a morado. Se realizó un lavado utilizando agua destilada y posteriormente se colocaron en Eosina ácida por 25 minutos. A continuación, los tejidos se deshidrataron utilizando soluciones de

etanol al 50, 70, 96, 100% y xileno, para finalmente hacer el montaje utilizando Entellan® (medio de montaje permanente libre de agua para microscopía).

La hematoxilina tiene un color azul-púrpura y tiñe los ácidos nucleicos mediante una reacción compleja. Se cree que este colorante, o más correctamente, la forma oxidada (reacción con óxido de mercurio), hemateína, se une con un mordiente (catión metálico que confiere una carga positiva neta al complejo colorante-mordiente, típicamente Al^{3+}) para teñir al DNA mediante la coordinación con los grupos fosfato cargados negativamente. La tinción de los núcleos es en principio de color rojo, pero se convierte en el conocido azul-púrpura cuando los tejidos se lavan con una solución alcalina como carbonato de litio saturado [135]. Por su parte, la eosina es rosa y tiñe proteínas de forma no específicamente al unirse a los grupos cargados positivamente en las proteínas, tales como grupos amino de los residuos de lisina [136]. En un tejido típico, los núcleos se tiñen azul, mientras que el citoplasma y la matriz extracelular tienen diversos grados de tinción de color rosa [137].

Los tejidos se observaron al microscopio y se sacaron fotografías con los objetivos 1x, 5x y 20x. Esta técnica permite evaluar el progreso de cada etapa del proceso de reparación de las heridas mediante el análisis del infiltrado celular, la reepitelización y la formación del tejido de granulación.

25.3. Tinción Tricrómica de Masson para observar la matriz de colágena

Esta tinción, al ser un método tricrómico, tiene la ventaja de permitir la demostración diferencial del tejido conectivo. En general, en estas técnicas los colorantes y los reactivos se aplican en forma secuencial y resaltan principalmente las estructuras tisulares teñidas por los colorantes: el núcleo, el citoplasma y las fibras de matriz extracelular [138], permitiendo la tinción selectiva de músculo, fibras de colágena, fibrina, y los eritrocitos [135].

El procedimiento realizado fue el siguiente: Los cortes de los tejidos se calentaron a 60°C por 30 minutos y se desparafinaron con xileno dos veces durante 5 y 2 minutos. Inmediatamente los tejidos se rehidrataron utilizando soluciones graduales de etanol y por último, agua destilada. Posteriormente se

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas histológicas

dejaron en el Fijador de Bouin a temperatura ambiente por 24 horas. Los tejidos se tiñeron colocándolos en los siguientes colorantes en el orden indicado a diferentes tiempos y realizando lavados de agua destilada (Elix5) entre cada uno de ellos: hematoxilina de Hierro de Weigert (10 minutos), fucsina ácida (15 minutos), ácido Fosfotúngstico/Fosfomolibdico (10 minutos) y azul de anilina (8 minutos), y después se lavaron con ácido acético al 1% por 4 minutos. Finalmente se realizó la deshidratación de los mismos utilizando soluciones de etanol y xileno, y el montaje con Entellan®.

El fijador de Bouin es un mordiente que intensifica la aceptación de los colorantes posteriores. La hematoxilina de hierro de Weigert (cloruro férrico como agente oxidante/mordiente) se utiliza para teñir los núcleos de la célula de color azul-negro. La fucsina ácida tiñe todos los componentes acidófilos de color rojo, incluyendo la colágena. La regla general en una tinción tricrómica es que una molécula pequeña de colorante puede penetrar y teñir cualquier tejido, pero cada vez que una molécula de colorante más grande puede penetrar en el mismo elemento, la molécula más pequeña será reemplazado por el de mayor tamaño. Cuando los tejidos se exponen al ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico, el color rojo se difunde desde las fibras de colágena y posteriormente se sustituye por el color azul. Las fibras de colágena forman una red menos densa y que es aparentemente muy porosa, por esta razón, las moléculas de colorante grandes del azul de anilina penetran únicamente en las fibras de colágena, dejando a la fibrina, al músculo y a los eritrocitos sin teñir de azul [135].

Las fibras de colágenateñidas de azul de la matriz en reparación de los tejidos, así como la fibrina teñida de rojo, se observaron en el microscopio de campo claro y se sacaron fotografías a 1x, 5x y 20x. Esto permite evaluar la evolución de la matriz extracelular a lo largo del tiempo, de una matriz provisional de fibrina a una matriz de colágena permanente, y comparar entre los tratamientos aplicados.

25.4. Tinción de Herovici para distinguir el tipo de colágena de la matriz

Para esta tinción se calentaron las laminillas a 60°C por 30 minutos y se desparafinaron con xileno durante 10 minutos a 60°C. En seguida, los tejidos se rehidrataron utilizando soluciones graduales de etanol por 5 minutos cada una y, por último, agua destilada. Posteriormente se tiñeron colocándolos en los siguientes colorantes en el orden indicado a diferentes tiempos y realizando lavados de agua destilada (Elix5) entre cada uno de ellos: Azul celestino (3 minutos), hematoxilina de Ragoud (5 minutos), y amarillo de metanilo (45 minutos). El siguiente paso fue realizar lavados con ácido acético al 0.5% y se colocaron en carbonato de litio saturado por 5 minutos. Inmediatamente los tejidos se tiñeron con la solución picropolicrómica durante 4 minutos y se lavaron con ácido acético al 1%. Para terminar, se realizó la deshidratación de los mismos utilizando soluciones de etanol y xileno, y se montaron con Entellan®.

La combinación en la tinción de Herovici del azul de metilo o azul de anilina y la fucsina ácida en una proporción apropiada permite diferenciar el tipo de colágena presente, en donde la colágena madura densa se tiñe de color rojo, mientras que la colágena recién formada es azul [139].

Para esta tinción picropolicrómica, se aplican varios colorantes: azul de celestino, amarillo de metanilo, y la solución picropolicrómica (fucsina ácida y azul de metilo). Al combinar el azul de celestino con la hematoxilina de alumbre (utiliza como mordiente aluminio) y el sulfato férrico de amonio se obtiene una tinción nuclear ácido resistente, gracias a que el azul celestino es resistente a los efectos del ácido, y la sal férrica en la solución fortalece la unión entre el núcleo y la hematoxilina para proporcionar una tinción nuclear fuerte [135].

La tinción del tejido conjuntivo se realiza a través del amarillo de metanilo y, dado que es un colorante ácido en combinación con el ácido acético diluido, permite la fijación del colorante a las proteínas presentes en el tejido por el pH ácido. Esto además incrementa la afinidad del colorante adherido al tejido por los grupos amino del colorante. En este sentido, el citoplasma se tiñe de color amarillo verdoso, mientras que la queratina; el músculo y los glóbulos rojos se tiñen de color amarillo brillante [140].

La colágena se tiñe fuertemente con colorantes ácidos, debido a la afinidad que tienen los grupos catiónicos de la proteína por los grupos aniónicos reactivos de los colorantes ácidos. La colágena es selectiva a soluciones de colorantes ácidos de gran tamaño molecular; por ejemplo, la fucsina ácida y el azul de metilo, que tienden a unirse por medio de atracciones electrostáticas o por fuerzas de Van der Waals. El azul de metilo tiñe la colágena tipo III (fibras proteicas delgadas recién sintetizadas), así como otros tipos de colágena, glucoproteínas, proteoglicanos y la reticulina [141]; mientras que la colágena tipo I o colágena «madura», una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular, se tiñe de color rojo por la fucsina ácida y da como resultado una combinación del azul de metilo, ácido pícrico y fucsina ácida que proporcionan el color de acuerdo con la densidad de la colágena presente.

La matriz de fibrina se observó de color café rojizo, las fibras de colágena ligeramente empaquetadas se tiñeron de azul claro (colágena tipo III), mientras que las fibras de colágena empaquetadas de rosa magenta (colágena tipo I). Utilizando los objetivos 1x y 5x se obtuvieron fotografías de cada herida y se realizó el análisis de las mismas sabiendo que con el tiempo la proporción de colágena empaquetada se incrementa con respecto a la colágena laxa.

25.5. Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de neutrófilos

La inmunofluorescencia es una técnica que permite analizar la presencia de proteínas en tejidos mediante la interacción específica entre la proteína en estudio y su anticuerpo correspondiente [133].

Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la elastasa de neutrófilos para evaluar el infiltrado inflamatorio en las heridas. Esta proteasa se almacena en los gránulos azurófilos en su forma activa hasta que los gránulos se fusionan con el fagolisosoma o liberan su contenido al medio extracelular por exocitosis en respuesta a estímulos específicos. Contribuye principalmente a la eliminación intracelular y extracelular de microorganismos al degradar factores de virulencia [142].

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas histológicas

La técnica para realizar esta inmunofluorescencia fue la siguiente: Inicialmente, los tejidos se desparafinaron con xileno 10 minutos, y después se rehidrataron con soluciones graduales de etanol durante 5 minutos cada uno (100, 96, 80, 70, 50%) y agua Milli-Q®. Posteriormente se hizo el bloqueo con albúmina al 1% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente, porque a pesar de que los anticuerpos muestran afinidad preferencial para epítomos específicos, éstos pueden unirse parcial o débilmente a sitios no específicos en las proteínas (también llamados sitios reactivos) que son similares a los sitios de unión del antígeno blanco. En este contexto, uniones no específicas pueden enmascarar la detección del antígeno en estudio.

Después se colocó el anticuerpo primario Anti-Elastasa (ab21595) a una concentración 1:200 en albúmina al 1%, y se dejó durante 24 horas a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3% y se procedió a colocar el anticuerpo secundario TexasRed (TI-1000) a una concentración 1:1000 en albúmina al 1%, el cual se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3% y se montaron utilizando Vectashield® con DAPI (ver anexo V). Este medio de montaje es acuoso, está hecho a base de glicerina y no solidifica sino que permanece como un líquido viscoso en la laminilla. Los portaobjetos se sellaron de forma permanente aplicando esmalte de uñas en todo el perímetro del cubreobjetos. Las laminillas montadas se almacenaron a 4 °C hasta su observación en el microscopio.

Se tomaron fotografías de las zonas de las heridas que recibieron los diferentes tratamientos con los objetivos 10x y 20x utilizando el filtro de rodamina (ver anexo V) para observar la marca, las cuales se procesaron utilizando el programa Fiji Is just ImageJ [143] para cuantificar las células marcadas.

25.6. Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de macrófagos

Primeramente, los tejidos se desparafinaron en xileno 10 minutos y a continuación se hidrataron con soluciones de etanol graduales y agua Milli-Q® durante 5 minutos cada uno. Utilizando una solución de albúmina al 1% en PBS se hizo el

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas histológicas

bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. El siguiente paso fue colocar el anticuerpo primario Anti-F4/80 (ab6640) a una concentración 1:100 en albúmina al 1%, y se dejó durante 24 horas a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3% e inmediatamente se colocó el anticuerpo secundario FITC (sc-2011, ver anexo V) a una concentración 1:10 en albúmina al 1%. El anticuerpo secundario se dejó incubar por 2 horas a 37°C y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3%. Por último, los tejidos se montaron empleando Vectashield® con DAPI.

El anticuerpo primario obtenido de rata, reconoce el antígeno de ratón F4/80, una glicoproteína de 160kD que se localiza en macrófagos murinos [144]. La molécula F4/80 (EMR1) se expresa en el desarrollo y durante toda la vida adulta, constitutivamente y durante procesos inflamatorios, infecciosos, inmunológicos y enfermedades, en una gran variedad de poblaciones de macrófagos, incluyendo a las células de Kupffer, macrófagos residentes de médula ósea, macrófagos timocorticoidales, macrófagos de la pulpa roja del bazo, macrófagos de los nódulos linfoides medulares y células microgliales. Niveles bajos de F4/80 se han encontrado en monocitos en edad adulta; mientras que los macrófagos de la zona marginal y macrófagos metalofílicos de la zona marginal del bazo parecen ser F4/80 negativos. Por otro lado, Las células de Langerhans, las cuales son células dendríticas inmaduras presentes en la epidermis, y algunas células dendríticas mieloides CD8 negativas son F4/80 positivas [145]. El marcador es altamente expresado en la membrana plasmática y potencialmente revela interacciones con las células vecinas en los tejidos [146].

Los tejido se observaron al microscopio con el objetivo de 20x utilizando el filtro para FITC, y se tomaron fotografías de las zonas que presentaron marca, las cuales se procesaron utilizando el programa Fiji Is just ImageJ para cuantificar las células positivas.

25.7. Inmunofluorescencia para analizar la expresión de α -SMA por fibroblastos activados

Los tejidos se desparafinaron (Xileno) e hidrataron (soluciones acuosas de etanol graduales y agua Milli-Q®) para posteriormente realizar el bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente (solución de albúmina al 1% en PBS- Tritón® 0.3%). Inmediatamente se colocó el anticuerpo primario Anti- α SMA (ab7817) a una concentración 1:20 con albúmina al 1% en PBS-Tritón® 0.3%, y se dejó durante 24 horas a 4°C en una cámara húmeda. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3% y se aplicó el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 a una concentración 1:1000 en albúmina al 1% en PBS-Tritón® 0.3%. El anticuerpo secundario se dejó incubar por 2 horas a 37°C y en seguida se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3%, para finalmente realizar el montaje de los tejidos utilizando Vectashield® con DAPI.

Se utilizó un anticuerpo de ratón dirigido a α -SMA porque se sabe que los microfilamentos de los fibroblastos activados muestran la expresión de esta molécula, que es la isoforma de actina típica de las células situadas en la pared de los vasos [38]. Para evaluar su expresión por los fibroblastos especializados, se tomaron fotografías de las zonas que presentaban la marca fluorescente por medio del filtro FITC con el objetivo de 10x y 20x. Las imágenes se analizaron cualitativamente y mediante el programa Fiji Is just ImageJ para cuantificar el área marcada para α -SMA.

25.8. Inmunofluorescencia para analizar la expresión de TGF- β_3

La expresión de TGF- β_3 se observó por medio de un anticuerpo de conejo policlonal dirigido contra TGF- β_3 , y esta inmunofluorescencia se realizó para evaluar la resolución de la cicatriz, ya que como se describió previamente, esta isoforma inhibe la formación de cicatrices con una mejor resolución de las heridas.

El procedimiento seguido fue: primero, los tejidos se desparafinaron 10 minutos en xileno, y a continuación, se realizó la hidratación de los mismos utilizando soluciones graduales de etanol y agua Milli-Q®. Después se realizó el

METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas histológicas

bloqueo con albúmina al 1% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente, para posteriormente colocar el anticuerpo primario Anti-TGF β_3 (ab15537) a una concentración 1:50 en albúmina al 1%, el cual se dejó durante 24 horas a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón® 0.3% y se procedió a colocar el anticuerpo secundario TexasRed (TI-1000) a una concentración 1:1000 en albúmina al 1%, el cual se dejó por 2 horas a 37°C. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una disolución de PBS-Tritón 0.3% y se montaron los tejidos aplicando Vectashield® con DAPI.

Se tomaron fotografías de las zonas de las heridas que mostraban fluorescencia con el filtro de rodamina utilizando los objetivos 10x y 20x, y se procesaron utilizando el programa Fiji Is just ImageJ para cuantificar la expresión de TGF- β_3 .

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

26. Descripción de las muestras

Todas las muestras (soluciones e hidrogeles tanto la mezcla como los irradiados) se lograron obtener satisfactoriamente. La siguiente tabla muestra la descripción física de las mismas.

Características Muestra	Coloración	Aroma	Consistencia	Otras
Hidrogel "P-407"	transparente	inodoro	ligeramente pegajosa	Termorreversible inverso
Solución "CH"	transparente con un ligero color amarillo	ligero aroma a ácido acético	líquida	-
Hidrogel "CH+P"	transparente	ligeramente a ácido acético	fresco al tacto y ligeramente pegajoso	Termorreversible inverso
Hidrogel "CH-P 4"	transparente, con un tono amarillo claro	característico (ligeramente ácido, etanólico y afrutado)	fresco al tacto y ligeramente pegajoso	Termorreversible inverso
Hidrogel "CH-P 7"	traslúcido, con un tono amarillo claro	característico (ligeramente ácido y etanólico)	fresco al tacto y ligeramente pegajoso	Termorreversible inverso

Tabla 12. Descripción y características de las muestras obtenidas.



Figura 30. Imagen de los materiales desarrollados, A) P-407, B) CH, C) CH+P, D) CH-P 4, E) CH-P 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de las muestras

Durante la preparación de las muestras, se observó que los polímeros (P-407 y CH) se incorporan/dispersan lentamente en el agua/solución acuosa ácido acético, por lo cual su preparación es un tanto tardada, asimismo, la filtración de las soluciones de CH requieren de un tiempo prolongado, debido a su viscosidad.

Las muestras resultantes, fueron transparente, a excepción del CH-P 7, que es ligeramente translúcido. Se observó que el P-407 no confiere ninguna coloración a las muestras desarrolladas, no así el quitosano, el cual confiere una coloración amarillo pálido; sin embargo, el proceso de irradiación intensifica ese color amarillo como consecuencia principalmente de la oxidación, y creación de dobles enlaces (secuencias poliénicas) formados a través de las reacciones de especies activas tales como radicales libres, [147] [127]. En el caso del hidrogel CH-P 7, la trietanolamina le confiere opacidad. Los aromas característicos se deben al ácido acético utilizado, sin embargo, en el CH-P 7 la trietanolamina neutraliza casi totalmente este aroma.

Los hidrogeles obtenidos (P-407, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7), a temperatura de refrigeración (4°C), se encuentran en forma de sistema coloidal donde la fase continua es líquida y la dispersa es sólida, comportándose como un líquido viscoso móvil que se transforma en un gel transparente semi-sólido al aumentar la temperatura. Es decir, estos hidrogeles al tener una concentración de P-407 mayor a 20%p/v, presentan el fenómeno de termorreversibilidad inversa, en el cual al ir aumentando la temperatura, se origina la formación de micelas como resultado de la deshidratación del bloque de PPO, hasta un punto definido, en donde, las micelas entran en contacto y pierden movilidad.

Los resultados muestran que los hidrogeles sometidos a irradiación lograron conservar esta propiedad, lo cual es muy útil para su utilización en heridas, puesto que esta característica permite realizar la gelificación *in situ*, es decir, se pueden aplicar en el área de la herida de forma líquida para alcanzar una mejor penetración en los tejidos, y posteriormente estos compuestos se irían gelificando, de forma tal que a la temperatura corporal (37°C) se encontrarían en forma de hidrogel, característica que les confiere el uso de depósitos para liberación prolongada.

27. Pruebas de pH y precipitación

Con el objetivo de llevar los materiales a un pH neutro para poder evitar o disminuir daños en los tejidos debido a un pH ácido, llevar a cabo una colocación sin dolor en el sitio de la herida, y poder utilizarlos como vehículos de fármacos y proteínas que solo son estables a un pH neutro, se realizó un ajuste de pH a 7 y se observó el comportamiento y apariencia de cada uno de estos.

El pH de los compuestos fue ácido, con valores de 4, 4.68 y 4.66 para CH, CH+P y CH-P, respectivamente, a excepción del hidrogel de P-407, el cual se encontraba a un valor cercano al neutro (6.33). Al añadir la trietanolamina gota a gota para tratar de ajustar los materiales a un pH de 7, en algunos compuestos, los resultados no fueron favorables, puesto que estos no son estables a un pH neutro y muestran un fenómeno de precipitación (Fig. 31); la solución de CH comenzó a formar precipitados puntuales desde un pH=5.63 y la mezcla física (no irradiada) a un pH=6.50, solo que en este último caso, el precipitado observado fue masivo. No obstante, al hidrogel de P-407 sí fue posible llevarlo a un pH de 7 sin observar la presencia de algún precipitado. De la misma manera, el hidrogel irradiado también se llevó a un pH neutro sin ninguna complicación.

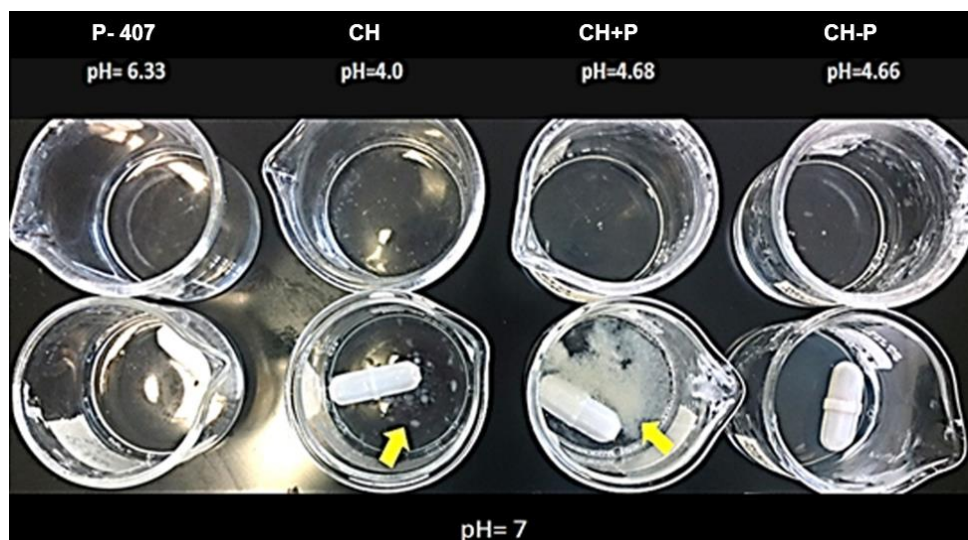


Figura 31. En la parte superior de la imagen se muestran los materiales desarrollados a su pH original, y en la parte inferior se muestran ajustados a un pH de 7. Se observa como la solución de quitosano y la mezcla física presenta precipitados.

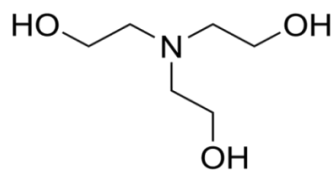


Figura 32. Estructura de la trietanolamina, amina terciaria con tres grupos hidroxilos; base débil, $pK_a=7.86$, soluble en agua, miscible en disolventes orgánicos y con un ligero aroma amoniacal.

El fenómeno de precipitación mostrado en las mezclas con CH, refleja que este polímero no es soluble a un pH mayor de 6 ($pK_a \approx 6.5$), esto ocurre debido a que el compuesto es una base débil y posee grupos amino primarios. A pH bajo, los grupos amino se protonan convirtiendo el quitosano en un polielectrolito catiónico soluble en agua, por otro lado, cuando el polímero pierde su carga precipita, esto ocurre a un pH de 6 y 6.5. Al agregar la trietanolamina (Fig. 32) ocurre una interacción entre este compuesto y el ácido acético, ya que al mezclarlos, estos forman una sal soluble en agua llamada: “acetato de trietanolamina” [148], esto provoca un aumento del pH de la solución y consecuentemente la precipitación del polímero (al aumentar el pH con la trietanolamina, disminuye la concentración de $[H^+]$ disponibles, por lo cual, los grupos amino del quitosano pasan de su forma protonada y soluble (NH_3^+) a su forma insoluble (NH_2) provocando la precipitación).

En la mezcla física, la precipitación se debe, posiblemente, además de lo mencionado, a la competencia que se presenta entre las cadenas de POE del P-407 por las moléculas de agua, lo cual acrecienta el fenómeno de precipitación del CH.

Por su parte, la mezcla irradiada, al ajustarla a $pH=7$, no formó precipitados. La radiación produce iones libres y radicales, los cuales son responsables de iniciar reacciones químicas que llevan a modificaciones moleculares como reticulación (formación de la estructura de red), degradación (escisión de la cadena y reducción de peso molecular), injerto (polimerización de un monómero e injerto en la cadena del polímero base), curado (polimerización simultánea y reticulación) y evolución de gas [127]. Todas las modificaciones mencionadas, en menor o mayor proporción, se presentan en el hidrogel al ser irradiado. Por lo tanto, una degradación del CH llevaría a la formación de oligómeros (monómeros de glucosamina) [149], los cuales son solubles en agua, asimismo, estos podrían

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

producir redes e injertos con las cadenas del P-407, y al agregar trietanolamina (que también es soluble), no se llevaría a cabo un fenómeno de precipitación, permitiendo ajustar el pH.

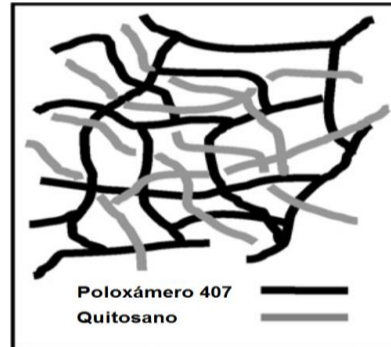


Figura 33. Representación esquemática de la posible red conformada por el P-407 y el Quitosano. (Modificado de [49]).

28. Microscopía electrónica de barrido

Con el motivo de analizar el posible cambio en la morfología debido a la irradiación gamma, se registraron las siguientes micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido para las muestras de CH, P-407, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7.

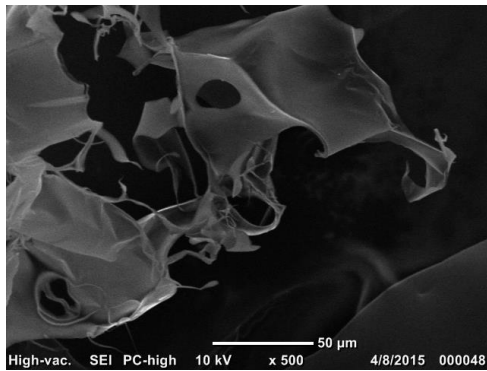


Figura 34. SEM. CH a 500X, barra = 50µm

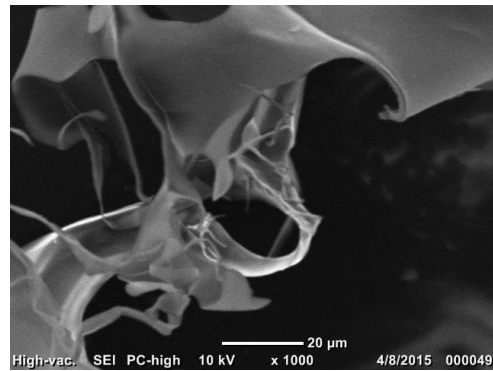


Figura 35. SEM. CH a 1000X, barra = 20µm

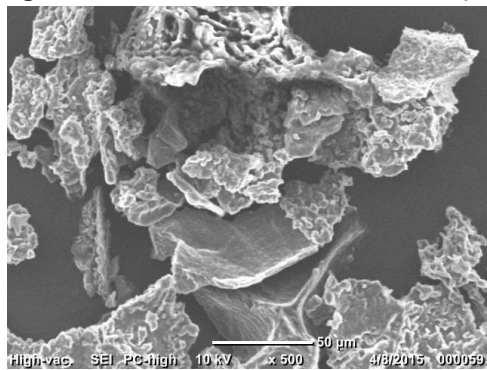


Figura 36. SEM. P-407 a 500X, barra = 50µm

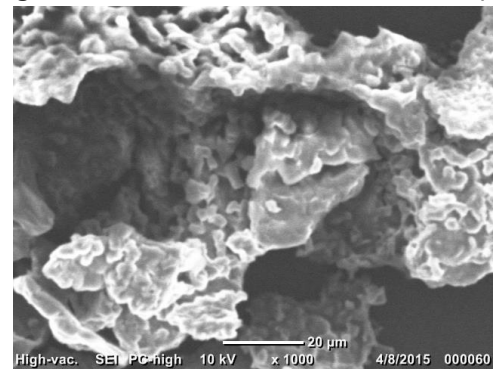


Figura 37. SEM. P-407 a 1000X, barra = 20µm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

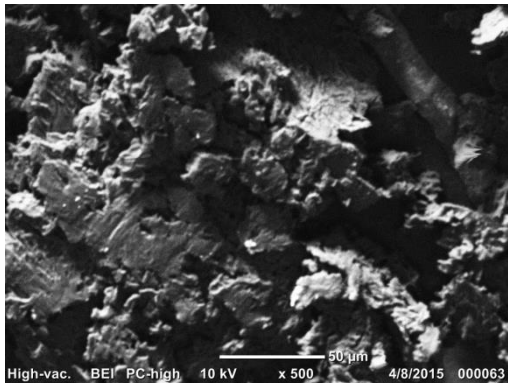


Figura 38. SEM. CH+P a 500X, barra = 50μm

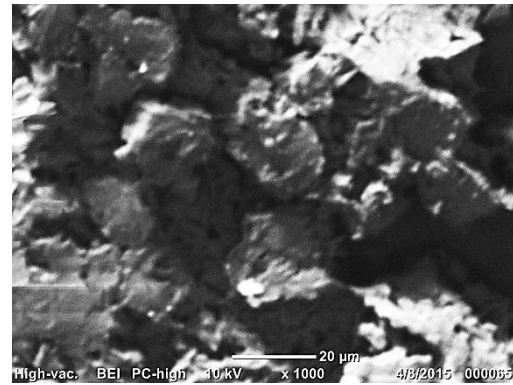


Figura 39. SEM. CH+P a 1000X, barra = 20μm

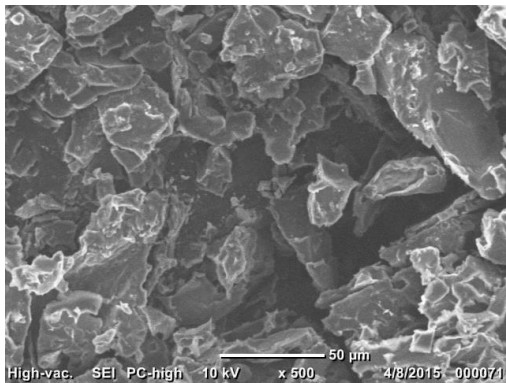


Figura 40. SEM. CH-P 4 a 500X, barra = 50μm

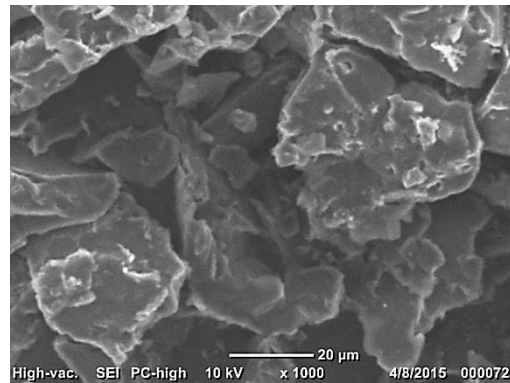


Figura 41. SEM. CH-P 4 a 1000X, barra = 20μm

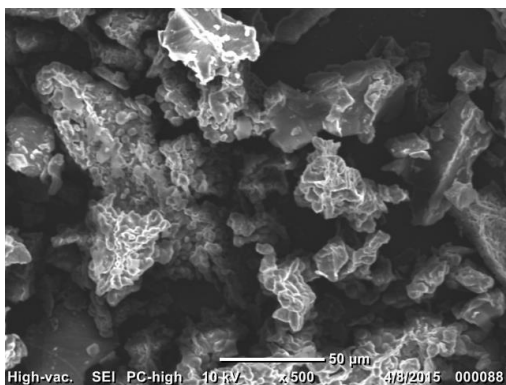


Figura 42. SEM. CH-P 7 a 500X, barra = 50μm

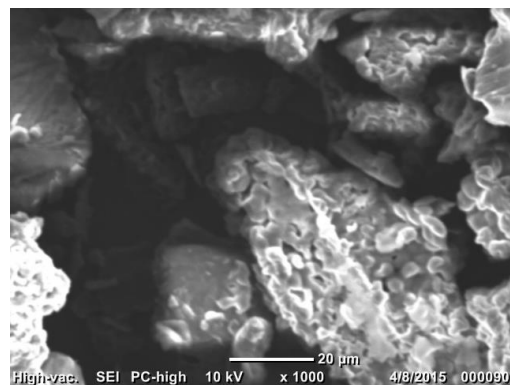


Figura 43. SEM. CH-P 7 a 1000X, barra = 20μm

Las imágenes obtenidas en esta prueba, revelaron distintos tipos de estructuras, primeramente, la solución de quitosano muestra una estructura laminar (Fig. 34 y 35), mientras que el hidrogel de P-407 presenta una agrupación

amorfa, (Fig. 36 y 37), la constitución de la mezcla, a pesar de que únicamente están unidas de una manera física su morfología es distinta a la observada para cada uno de los compuestos por separado. (Fig. 38 y 39).

Por otra parte, los hidrogeles irradiados muestran arreglos amorfos (sin ninguna geometría específica), pero que si difieren de los arreglos mostrados por la mezcla física y por cada uno de los compuestos por separado, por lo cual se puede rectificar que si hay un cambio en estos materiales debido a la irradiación, sin embargo, muestran una gran similitud con la morfología revelada por el poloxámero solo, lo cual era de esperarse puesto que es el material que se encuentra en una mayor proporción.

Microestructuras tales como el tamaño, la forma y distribución de las partículas tienen influencia en el proceso de cicatrización de heridas, puesto que esto impacta en las características de hinchamiento del hidrogel, el intercambio de gases (altos niveles de CO₂ aumentan la acidez y bajas concentraciones de O₂, disminuyen la regeneración de las células y ayuda a la proliferación de bacterias anaerobias [150]), penetración de bacterias, adhesión, capacidad hemostática, y liberación de fármacos en caso de contener alguno.

29. Calorimetría diferencial de barrido

Las posibles modificaciones de la interacción entre los materiales, por efecto de la irradiación se pueden conocer mediante esta prueba. Los resultados obtenidos mediante esta técnica para observar la estabilidad térmica de nuestras muestras, se exponen en los siguientes termogramas.

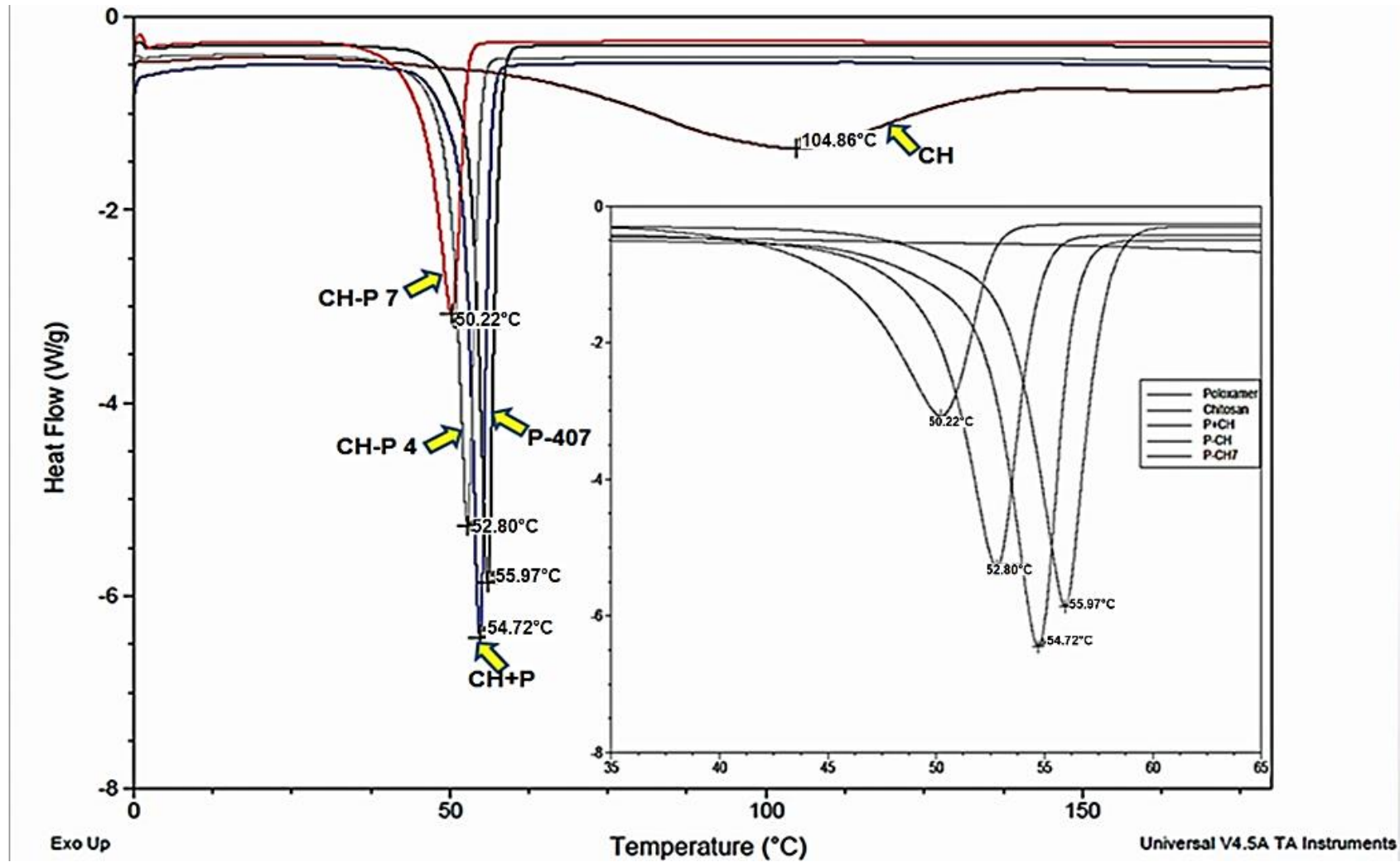


Figura 44. Termograma obtenido por DSC para las diferentes muestras, a la izquierda se aprecia completa, y a la derecha hay un acercamiento (ampliación en la siguiente hoja).

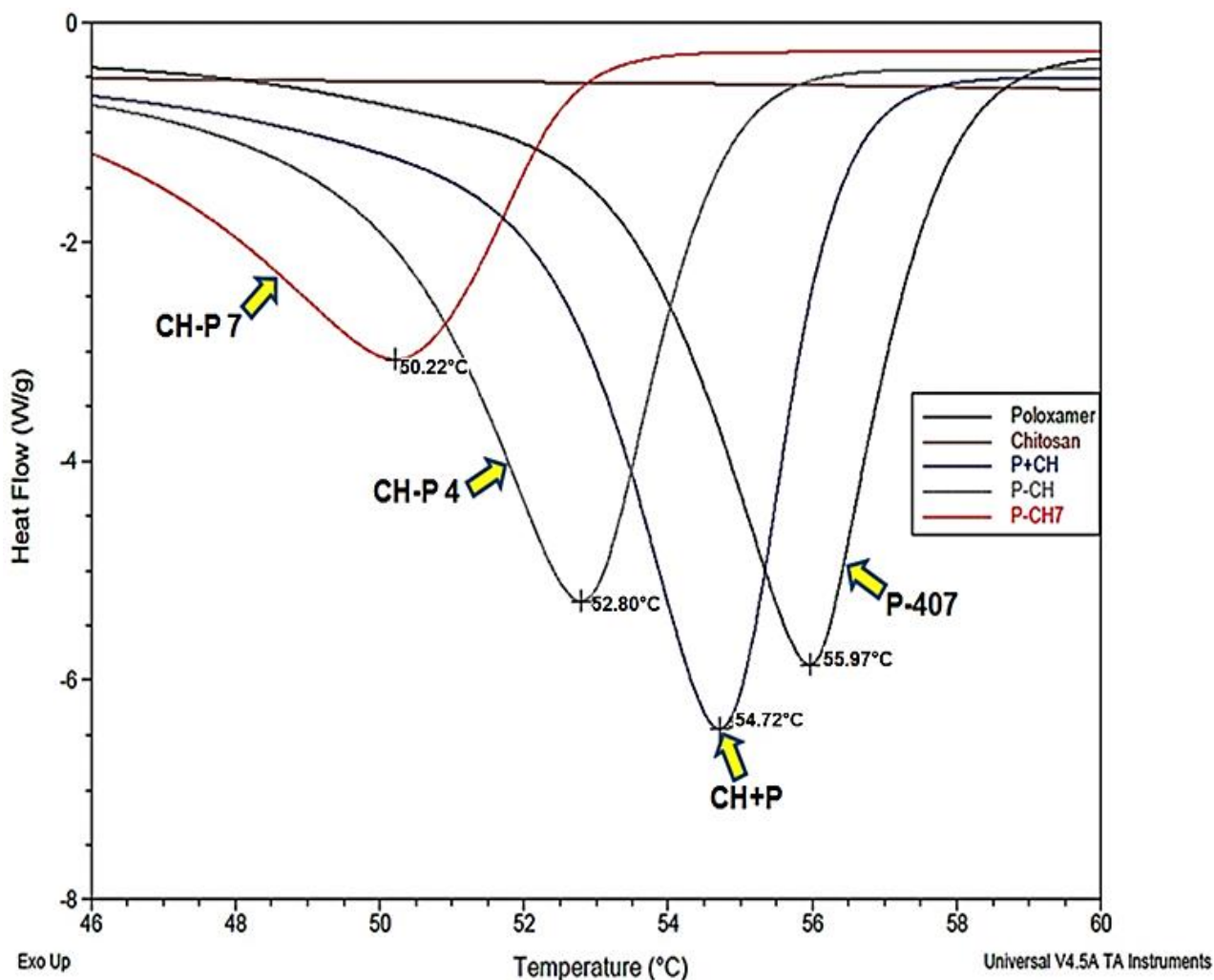


Figura 45. Acercamiento del termograma obtenido por DSC para los hidrogeles.

En estos gráficos, se observa que todas las muestras tienen picos endotérmicos, por lo cual al suministrarles energía en forma de calor los materiales la absorben, y esto, se ve reflejado en los valores de las entalpías (tabla 13). Como una medida de la cantidad de energía que un sistema absorbe o emite. En una reacción endotérmica, el cambio de entalpía es positivo para el sistema, porque este gana energía en forma de calor.

Asimismo, esta prueba permite obtener los valores del punto de fusión (cambio de estado de agregación sólido a líquido) de las muestras, proceso que también es endotérmico, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Punto de fusión (°C)	Entalpía(J/g)
CH	104.86	207.5
P-407	55.97	116.7
CH+P	54.72	122.9
CH-P 4	52.80	114.6
CH-P 7	50.22	93.93

Tabla 13. Entalpía y puntos de fusión obtenidos mediante DSC, de las distintas muestras. El punto de fusión teórico del quitosano es de 280°C y el del poloxámero 407 150°C.

El punto de fusión es una propiedad intensiva y es característica de cada elemento o compuesto, por lo cual se utiliza como una herramienta para la caracterización. Se puede observar que la Tf fue mayor para el CH y el P-407, mientras que la mezcla física y los compuestos irradiados muestran valores ligeramente por debajo de la Tf del P-407. En las muestras, el punto de fusión de los hidrogeles varía muy poco; sin embargo, esa variación es suficiente para saber que estos experimentaron cambios al mezclar los polímeros, al aplicar la irradiación y al agregar la trietanolamina, y que ninguno de estos es igual.

Estos dos parámetros obtenidos mediante DSC, indican que la irradiación sí tiene influencia y cambia el número de interacciones químicas de los materiales de cada una de las muestras. Debido a la dosis de irradiación a la cual se sometieron los materiales (25KGy), se puede decir que ocurrió un entrecruzamiento [151] [126] [152]. Además, los resultados sugieren que se llevó a cabo una probable escisión de las cadenas poliméricas, al ser sometidas a la irradiación. Posiblemente, lo que ocurre en estos materiales al momento de la irradiación, es que en un primer plano ocurra la escisión de las cadenas y seguidamente se estén entrecruzando, lo cual explicaría la disminución de su Tf, tal como se observó en los resultados.

30. Temperatura y tiempo de gelificación

Con objetivo de determinar el tiempo y temperatura de la transición sol-gel de cada uno de los hidrogeles, se llevó a cabo el método de cizalla oscilatoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

En la tabla 14 se muestran los valores de la temperatura y del tiempo a los cuales se lleva a cabo la transición sol-gel de cada una de las muestras, es decir, a los cuales las soluciones se van volviendo más viscosas y semisólidas hasta formar el hidrogel, el cual estaría conformado por una fase sólida en forma de red constituida por las cadenas del/los polímeros y que inmoviliza a una fase líquida, ya sea el agua o la solución de ácido acético.

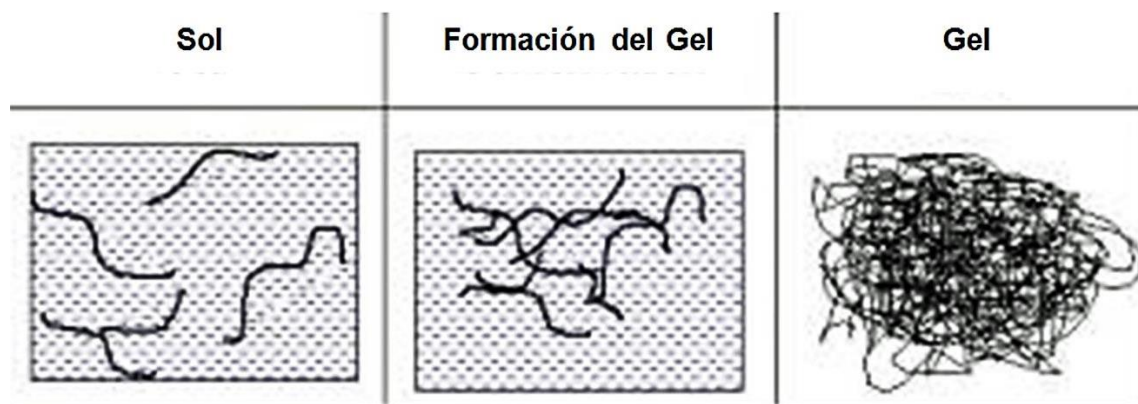


Figura 46. Representación gráfica en donde una solución coloidal de baja viscosidad pasa a ser un gel “fenómeno de transición sol-gel”.

Tiempo y temperatura de gelación				
Muestra	Temperatura (°C)	DE	Tiempo (segundos)	DE
P-407	12.75	0.00	92.62	9.87
CH+P	9.47	0.28	65.90	1.62
CH-P 4	13.50	0.26	118.71	11.72
CH-P 7	12.02	0.55	93.13	6.79

Tabla 14. Valores obtenidos para la temperatura y el tiempo de gelación de las distintas muestras.

Los resultados obtenidos expresan que los hidrogeles se constituyen a una temperatura mucho menor a la corporal y en un intervalo de tiempo corto, tomando en cuenta su aplicación farmacéutica. Los valores de formación de los hidrogeles no rebasan los 14°C, ni los 2 minutos de tiempo (Fig. 47), por lo cual la formación de los geles no es complicada y es muy rápida.

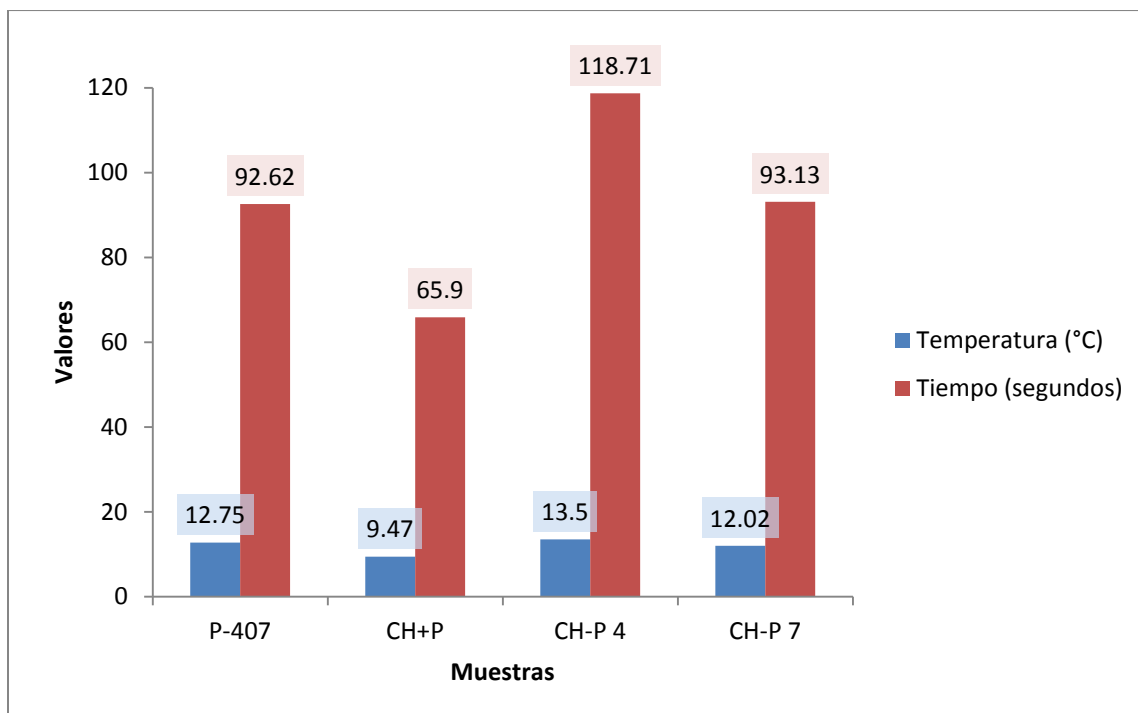


Figura 47. Gráfico en donde se representan los valores de tiempo y temperatura de gelación de cada una de las muestras.

Se puede observar que los parámetros de temperatura y tiempo de gelación, están estrechamente relacionados y son directamente proporcionales; puesto que cuando se requiere de una mayor temperatura para llevar a cabo el proceso de gelación; también se requiere de un mayor tiempo, y viceversa. La gráfica anterior, muestra que los resultados obtenidos no difieren tanto entre sí, sin embargo, todos son distintos, dejando en evidencia que la irradiación sí genera cambios, puesto que en esta prueba el hidrogel irradiado (CH-P 4) obtenido necesitó 4°C y 53 segundos más para llevar a cabo la gelificación, a comparación de la mezcla que solo es física. Lo anterior sugiere que debido a los cambios estructurales que ocurrieron al irradiar el compuesto, la Tgel aumenta, es decir, la irradiación hizo que se formara una estructura más estable, que aumenta la gelación del compuesto a una temperatura más alta.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	CH+P		CH-P 4		CH-P 7	
	tiempo	temperatura	tiempo	temperatura	tiempo	temperatura
P-407	si	si	si	si	no	no
CH+P			si	si	si	si
CH-P 4					si	si

Tabla 15. Resultados del análisis estadístico para la comparación de los resultados obtenidos de cada una de las muestras en la prueba de temperatura y tiempo de gelación, en esta prueba se compararon entre sí, todas las muestras (ver anexo III).

En la tabla 15 se observan los resultados de la comparación estadística, entre la mayoría de los compuestos existe una diferencia significativa para la temperatura y el tiempo de gelación, sin embargo, se observa que entre las muestras “P-407 y CH-P 7”, no existe diferencia significativa, y en efecto, los valores resultantes para el tiempo y la Tgel, entre estos compuestos, son muy cercanos, es decir, la mezcla irradiada al ajustarle el pH, necesita una menor temperatura y un menor lapso de tiempo para llevar a cabo el fenómeno de gelación; esto puede deberse al efecto de la trietanolamina, ya que debido a su estructura de alcohol, los átomos de oxígeno de sus grupos “OH”, pueden participar en la formación de enlaces de hidrógeno con el agua, disminuyendo así la interacción entre esta y el polímero, dando como resultado, la formación de micelas de P-407 (Fig. 48) y estructuras en forma de red, por lo que la TEA, puede actuar como agente de reticulación. Del mismo modo, si se lleva a cabo la formación de la sal “acetato de trietanolamina”, parte del agua se requiere para la solvatación de sus iones, lo cual puede llevar a una reducción en la actividad de agua con el POE del P-407, y un aumento en la concentración efectiva del polímero (micelar) [153].

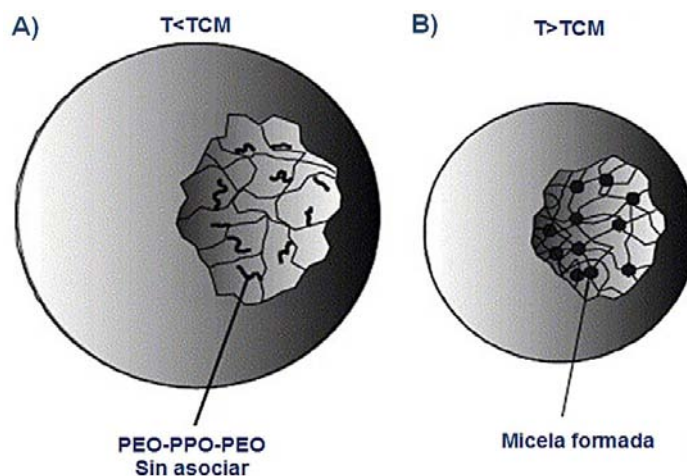


Figura 48. Representación del P-407 cuando A) se encuentra a una temperatura menor a la de formación de las micelas, y B) a una temperatura mayor a la de formación micelar.

31. Pruebas de viscosidad

El comportamiento mecánico de cada uno de los hidrogeles elaborados, fue determinado mediante un viscosímetro con el fin de observar la deformación y reestructuración de cada uno de ellos y ver si la radiación genera cambios.

En las figuras 49, 50, 51 y 52, se presentan los gráficos obtenidos al realizar el análisis reológico; en ellos, se observa el perfil de viscosidad en orden normal y en orden inverso de cada uno de los hidrogeles desarrollados (prueba realizada a una temperatura constante de 37°C).

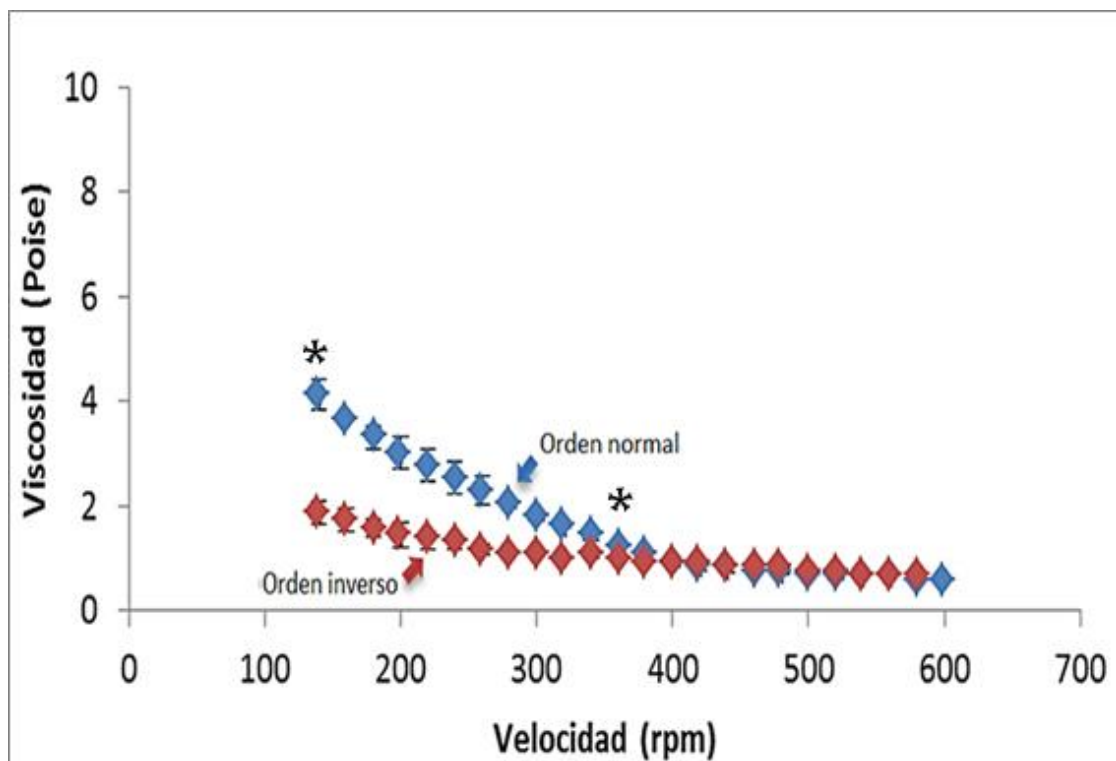


Figura 49. Gráfico de viscosidad del hidrogel P-407; “Fluido Tixotropico” (Diferencias significativas encontradas al aplicar la prueba estadística t-pareada: *120 rpm, P =0.0036; #360 rpm, P=0.0027).

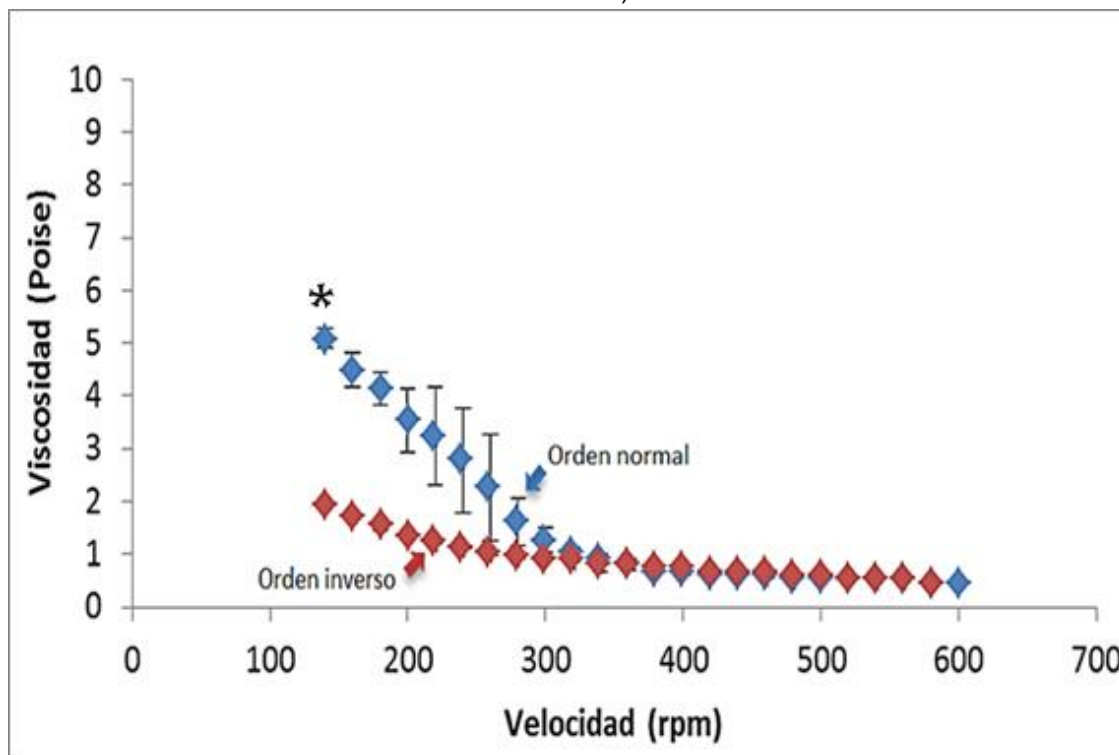


Figura 50. Gráfico de viscosidad del hidrogel CH+P; “Fluido Tixotropico” (Diferencias significativas encontradas al aplicar la prueba estadística t-pareada: *120 rpm, P =0.0003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Pruebas fisicoquímicas

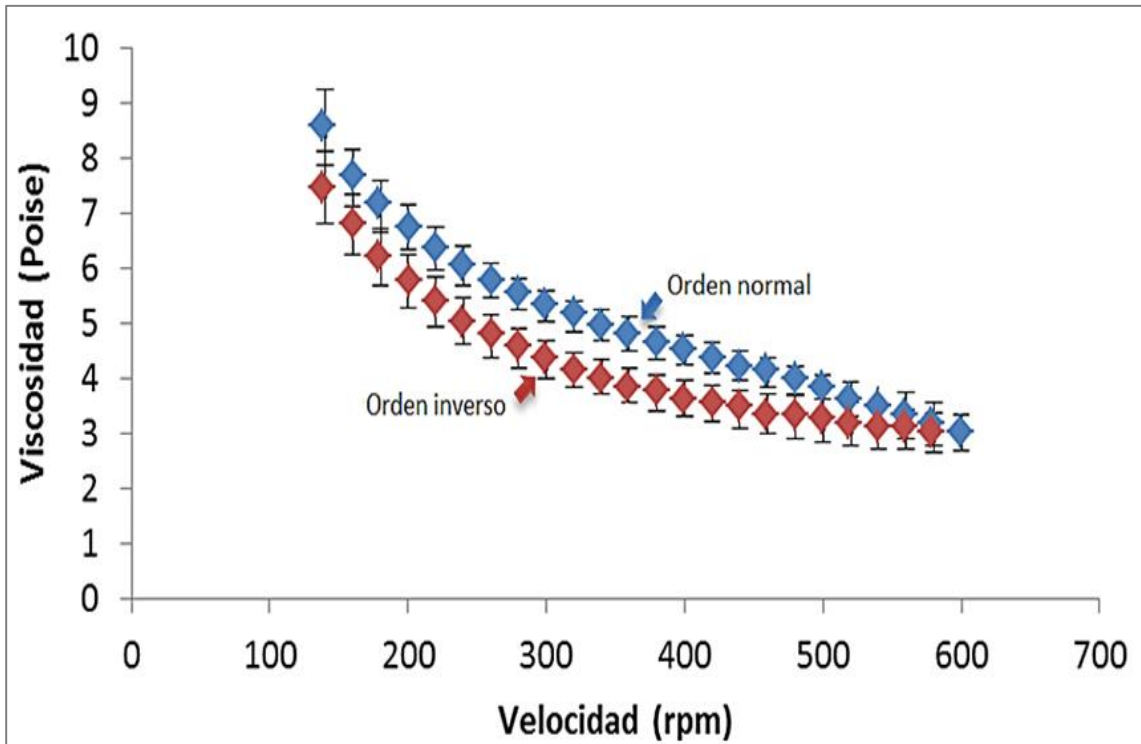


Figura 51. Gráfico de viscosidad del hidrogel irradiado a pH de 4. Se pierde la tixotropía: sin diferencias significativas encontradas $P>0.05$.

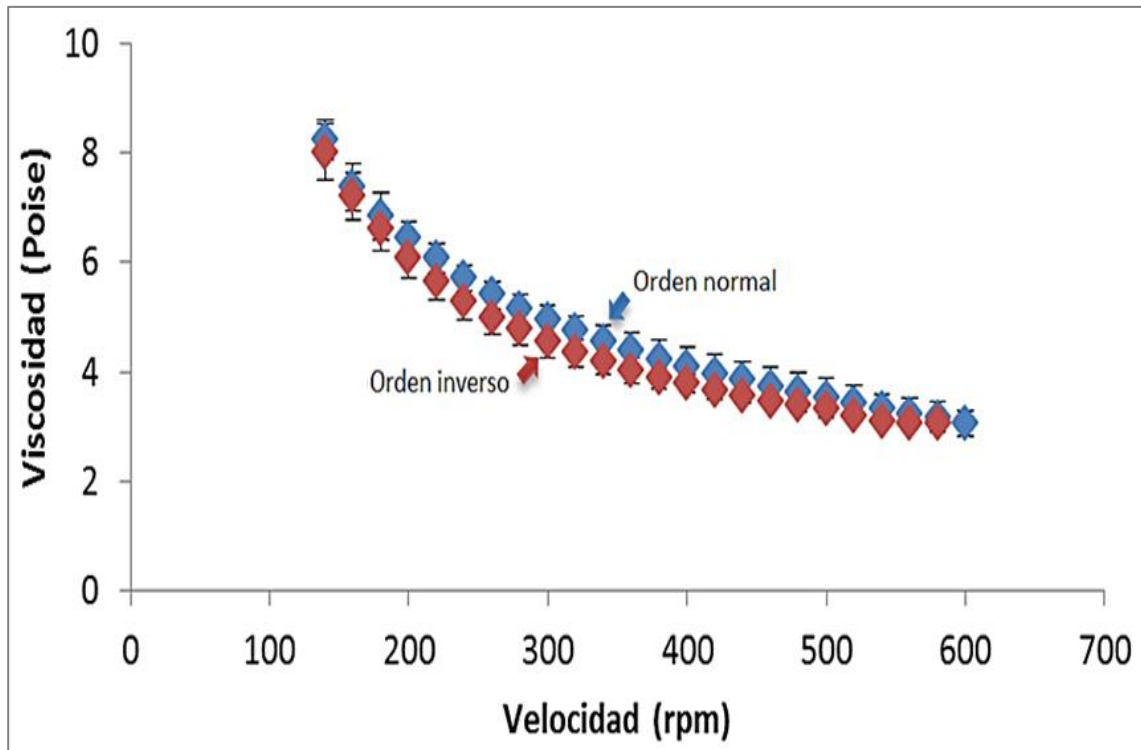


Figura 52. Gráfico de viscosidad del hidrogel irradiado a pH de 7. Se pierde la tixotropía: sin diferencias significativas encontradas $P>0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

Las propiedades mecánicas son de primordial importancia para determinar el rendimiento de los materiales previstos para someterse a diferentes tipos de estrés en el curso de las aplicaciones biomédicas, en este caso como apósito para heridas. En las gráficas se observa que para las muestras del P-407 y CH+P, al aplicarles un esfuerzo cortante, la viscosidad va disminuyendo y acto seguido vuelve a aumentar al cesar dicha fuerza debido a la reconstrucción de sus estructuras, sin embargo, no recupera su estructura inicial de inmediato, esto solo puede lograrse tras un tiempo de reposo debido al retraso que se produce para adaptarse al cambio (Fig. 53). Este fenómeno que se presenta se llama tixotropía, por lo cual las muestras son clasificadas como fluidos tixotrópicos.

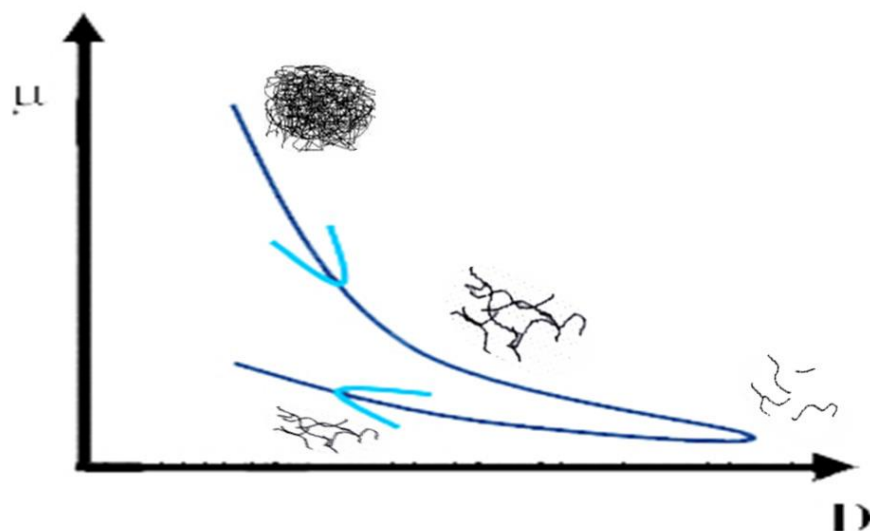


Figura 53. Representación gráfica del fenómeno de tixotropía presentada por un hidrogel; en orden normal, al aplicar una fuerza de cizallamiento, el hidrogel disminuye su viscosidad, produciendo la rotura de las cadenas que forman sus moléculas y con ello va perdiendo su estructura inicial. En orden inverso, al ir cesando el esfuerzo cortante, la viscosidad aumenta poco a poco, hay reconstrucción de las estructuras del compuesto, sin embargo, no se llega a la estructura inicial, hasta después de un tiempo de reposo (fenómeno de Histéresis).

En el CH-P 4, la tixotropía se pierde, esto debido a la irradiación, que hace que los materiales sean más estables por el grado de entrecruzamiento llevado a cabo y que hace que se forme una red. En el caso del CH-P 7, el fenómeno de la tixotropía también se pierde, ya que al cesar la fuerza de cizallamiento o esfuerzo cortante, el material recupera su viscosidad y por ende, su estructura inicial, esto

es debido a la reticulación dada por la irradiación [127] e influenciada por la trietanolamina [153].

32. Prueba de captación de humedad.

Un hidrogel ideal para el cierre de heridas tiene que absorber exudados de la herida al mismo tiempo que evita la deshidratación de la misma, y la mantiene húmeda para una curación más rápida, por este motivo se llevó a cabo la prueba de absorción de agua/captación de humedad. Esta prueba se realizó con el propósito de ver cómo se comportan los hidrogeles elaborados en diferentes atmósferas con humedades relativas distintas puesto que el contenido de agua en equilibrio y su capacidad de absorción en los apósitos son importantes para la absorción rápida de los exudados y la hidratación en la herida.

Los resultados arrojados muestran que los hidrogeles no absorben, si no que liberan agua al ambiente en diferentes proporciones dependiendo de la humedad relativa del medio, se observa que el patrón de liberación de agua es inversamente proporcional a la humedad relativa; esto es, los hidrogeles llevan a cabo un equilibrio de acuerdo con la humedad de la atmósfera en que se encuentren, puesto que liberan una mayor cantidad de agua (~10%) en atmósferas con humedades relativas bajas (20%HR) y esta va disminuyendo (hasta ~3%) conforme aumenta la humedad relativa (90%HR).

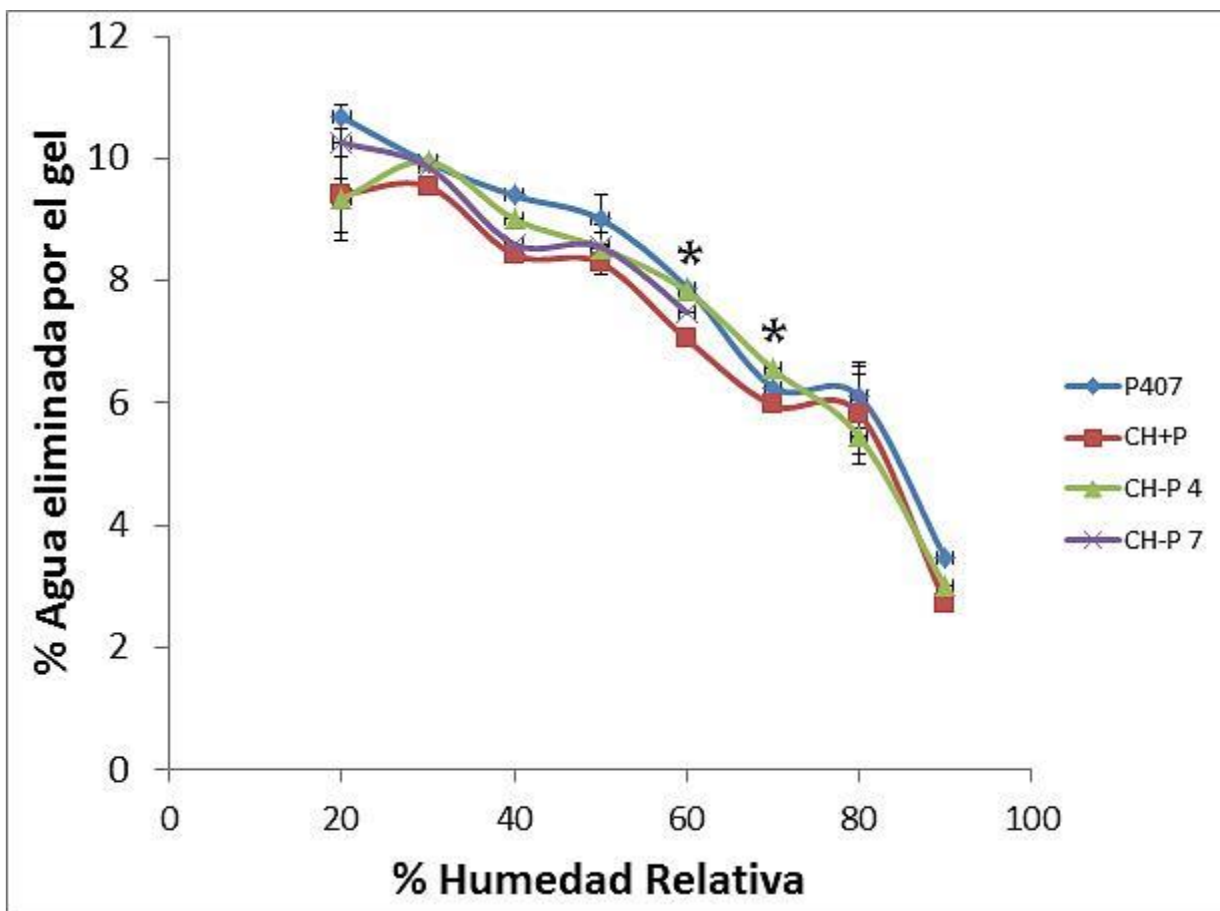


Figura 54. Gráfica del comportamiento de los diferentes hidrogeles a las distintas humedades relativas del medio. (Diferencias significativas encontradas al aplicar la prueba estadística ANOVA: 60%HR: P-407 y CH+P, $P = 0.213$, * 70%HR: P-407 y CH-P 4, $P = 0.0101$; CH-P 4 y CH-P 7, $P = 0.0224$).

Con la prueba de humedad relativa se evaluó el comportamiento de los hidrogeles ante diferentes ambientes húmedos que simulan distintas cantidades de exudado, es decir, una HR de 20% representaría una herida con poca cantidad de exudado, mientras que una herida con exudado abundante, se simbolizaría con una HR de 90%. Esto significa, que los hidrogeles liberarían más agua en heridas con poco exudado y poca en heridas con un exudado cuantioso.

Lo anterior, es adecuado, debido a que los hidrogeles siempre mantendrán una atmósfera húmeda adecuada para la cicatrización de las heridas, y evitarán la desecación de las mismas, sin embargo, también es deseable que absorban cierto grado de exudado.

33. Bioerosión/Hinchamiento

Sabiendo que los hidrogeles pueden absorber y retener grandes cantidades de agua en función de su reticulación, densidad de carga de su red y concentración de sus polímeros entrecruzados, se llevó a cabo esta prueba, en donde se determinó la tasa de bioerosión y/o hinchamiento de los hidrogeles a 37°C por diferentes tiempos utilizando suero sanguíneo humano, que a diferencia de otros medios, contiene proteínas y enzimas (Tabla 16), y simula el exudado (líquido evacuado de las heridas abiertas y que proviene del suero alrededor del tejido inflamado y dañado) que se presenta en una herida, el cual algunas veces llega a producirse en exceso, y es importante que sea absorbido por los hidrogeles para prevenir la infección y la humedad excesiva en las heridas, lo que perjudicaría su cierre/cicatrización.

SUERO SANGUÍNEO	
(composición)	
Componente	%
Agua	91-92
Proteínas (albúmina, globulinas)	7-8
Otros solutos	
<ul style="list-style-type: none"> • Electrolitos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) • Sustancias nitrogenadas no proteicas (urea, ácido úrico, creatinina, sales de amonio) • Sustancias nutritivas (glucosa, lípidos, aminoácidos) • Gases sanguíneos (oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno) • Sustancias reguladoras (hormonas, enzimas) 	1-2

Tabla 16. Componentes del suero sanguíneo humano.

Como se ve en la tabla 16, el suero sanguíneo tiene diferentes componentes, entre ellos azúcar, proteínas, enzimas, y más. Los hidrogeles pueden descomponerse en presencia de enzimas que reconocen grupos funcionales específicos sobre la cadena principal de hidrogel y la degradan o simplemente se descomponen a través de la hidrólisis, ya sea en condiciones de pH ácidas o básicas. Los ensayos *in vitro* de bioerosión pueden simular el comportamiento *in vivo* de los hidrogeles al aplicarlos en una herida. Estudios de bioerosión de los hidrogeles también son importantes para garantizar que los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

materiales se degradan en componentes seguros, que pueden ser identificados y analizados para evaluar su toxicidad en células huésped [2].

De los resultados obtenidos, se observa que el hidrogel de P-407 presentó un perfil de bioerosión, y los hidrogeles irradiados a ambos pH's, mostraron un perfil de hinchamiento; pero el hidrogel de P-407 mezclado con CH, mostró un perfil con ambos comportamientos, ya que en las primeras horas (2, 4, 6, 8 y 10), se hinchó, y posteriormente se erosionó.

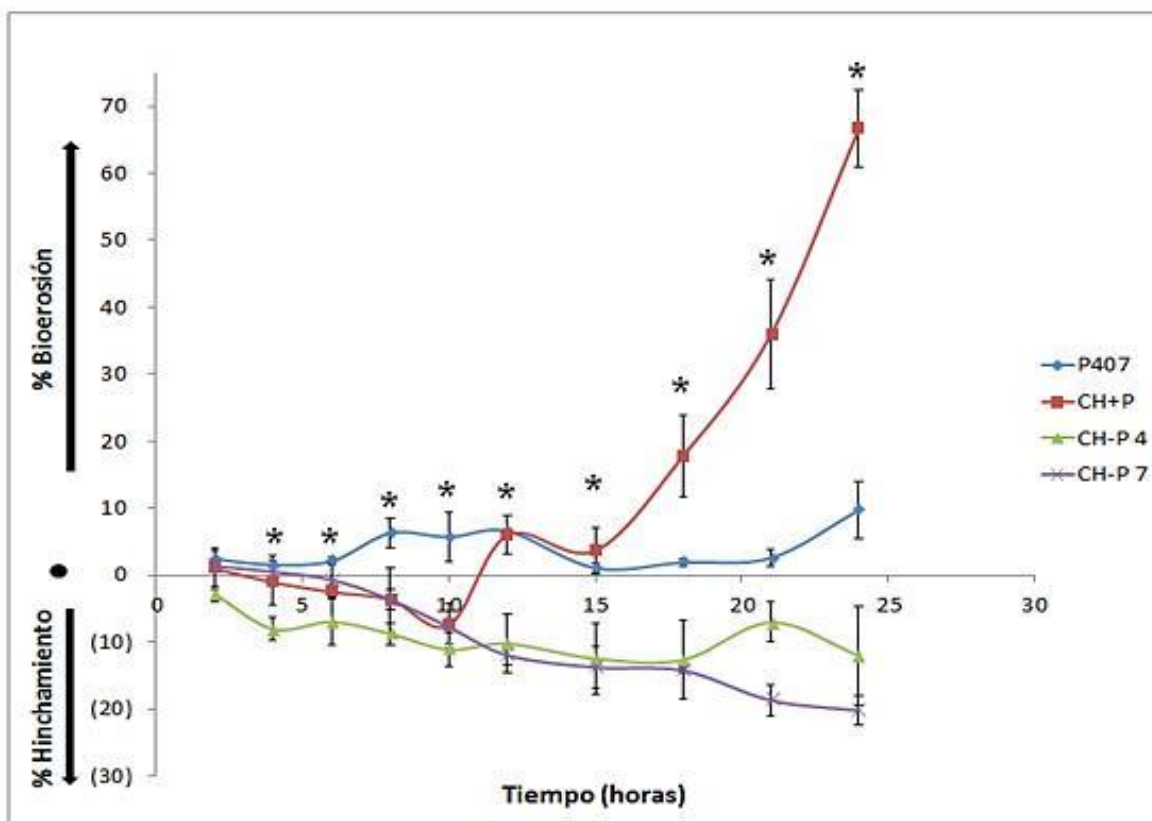


Figura 55. Gráfica de porcentaje de Bioerosión y/o hinchamiento mostrado por los distintos geles. (Diferencias significativas encontradas al aplicar la prueba estadística ANOVA: *4hrs: P-407/CH, $P = 0.0031$; CH+P/CH-P 4, $P = 0.011$; CH-P 4/CH-P 7, $P = 0.0073$; *6hrs: P-407/CH-P 4, $P = 0.0046$; CH-P 4/CH-P 7, $P = 0.0349$; *8hrs: P-407/CH+P, $P = 0.001$; P-407/CH-P 4, $P < 0.0001$, P-407/CH-P 7, $P = 0.001$; *10hrs: P-407/CH+P, $P = 0.0006$; P-407/CH-P 4, $P < 0.0001$; P-407/CH-P 7, $P = 0.0009$; *12hrs: P-407/CH-P 4, $P < 0.0001$; P-407/CH-P 7, $P < 0.0001$; CH+P/CH-P 4, $P < 0.0001$; CH+P/CH-P 7, $P < 0.0001$; *15hrs: P-407/CH-P 4, $P = 0.0063$; P-407/CH-P 7, $P = 0.0036$; CH+P/CH-P 4, $P = 0.0021$; CH+P/CH-P 7, $P = 0.0013$; *18hrs: P-407/CH-P 4, $P = 0.0337$; P-407/CH-P 7, $P = 0.0465$; CH+P/CH-P 4, $P = 0.0237$; CH+P/CH-P 7, $P = 0.0367$; *21hrs: P-407/CH+P, $P < 0.0001$; P-407/CH-P 4, $P = 0.0369$; P-407/CH-P 7, $P = 0.0003$; CH+P/CH-P 4, $P < 0.0001$; CH+P/CH-P 7, $P < 0.0001$; CH-P 4/CH-P 7, $P = 0.0197$; *24hrs: P-407/CH+P, $P < 0.0001$; P-407/CH-P 4, $P = 0.0029$; P-407/CH-P 7, $P = 0.0005$; CH+P/CH-P 4, $P < 0.0001$; CH+P/CH-P 7, $P < 0.0001$; CH-P 4/CH-P 7, $P = 0.2829$. –Ver anexo III–)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

La porosidad de los hidrogeles es un factor importante en sus características de hinchamiento, puesto que entre más poroso sea un material retiene una mayor cantidad significativa de agua dentro de su estructura, es decir, se hincha más, y viceversa, a una porosidad menor, el hidrogel tiene una menor capacidad de hinchamiento, no obstante, para conocer la porosidad de los materiales estudiados, se necesitaría realizar una prueba fisicoquímica adicional.

El P-407, no mostró hinchamiento, sino bioerosión, esto puede deberse a que al ser soluble en agua gracias a las dos cadenas hidrofílicas de POE, estas se disuelven al estar en contacto con el suero sanguíneo, sin embargo, la disolución es mínima, puesto que no rebasa el 10% de bioerosión.

En cuanto al CH+P se refiere, este hidrogel, presenta cierta capacidad de hinchamiento en la etapa temprana debido a la difusión de fluidos dentro del hidrogel, asimismo, el quitosano, presenta grupos funcionales como el NH_3^+ , que pueden interactuar con el agua ayudando generando este efecto. Una vez alcanzado el máximo grado de hinchamiento, el hidrogel comenzó a bioerosionarse gradualmente, lo cual puede deberse a la degradación del quitosano y a la disolución del poloxámero.

Contrariamente al hidrogel del P-407 y la mezcla física CH+P, los hidrogeles irradiados mostrarán únicamente un perfil de hinchamiento, lo cual nos indica que la irradiación modifica el efecto del suero sanguíneo sobre el hidrogel. Esto puede deberse al entrecruzamiento desarrollado entre las cadenas poliméricas del P-407 y el CH al someterlos a la irradiación, lo que hizo que se constituyeran estructuras más estables que en el hidrogel formado solo por el P-407 o en la mezcla de ambos polímeros sin irradiarse, lo que conlleva a una mayor estabilidad de los materiales.

Todo esto indica nuevamente que la radiación presenta efectos positivos en los hidrogeles ayudando a estos a presentar un perfil de hinchamiento (lo cual se traduce en absorción de exudado en las heridas) y volviéndolos más resistentes al estar en contacto con los diversos componentes del suero sanguíneo. Lo que sugiere que los hidrogeles CH-P 4 y CH-P 7 podrían tener potencial para prevenir a la herida de la acumulación de líquido por la adsorción de exudado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas fisicoquímicas

Las pruebas fisicoquímicas realizadas de pH y precipitación, tiempo y temperatura de gelación, y bioerosión e hinchamiento muestran que el hidrogel CH-P 7 desarrollado, puede ser utilizado como vehículo ya que al presentar un pH neutro evita la desnaturalización de principios activos (principalmente moléculas biológicas) provocada por ambientes ácidos o básicos, adicionalmente, gracias a su termorreversibilidad inversa podría mantenerse en refrigeración hasta el momento de su utilización haciendo que se conserven mejor las proteínas/moléculas y a la temperatura fisiológica mostrar gelificación, y finalmente, la irradiación hace posible que el hidrogel se hinche ayudando a controlar la liberación de los principios activos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

34. Pruebas antimicrobianas/antimicóticas.

La actividad antibacteriana/antimicótica es una propiedad adicional que se busca en un apósito ideal. Se ha reportado que el CH presenta esta propiedad, la cual se conserva al aplicar irradiación Gamma; sin embargo, se sabe que el peso molecular y el DD del CH, y el pH del medio pueden mejorar o eliminar esta propiedad; por esta razón, se realizaron pruebas antimicrobianas y antimicóticas para evaluar si las muestras en estudio tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos. Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la tabla 17.

Microorganismo	Muestra					Control Negativo "CN"
	P-407	CH	CH+P	CH-P 4	CH-P 7	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	0 mm	9 mm	10 mm	10 mm	10 mm	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	0 mm	10 mm	11 mm	10 mm	10 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (aislado clínico)	0 mm	8 mm	10 mm	10 mm	11 mm	0 mm
<i>Candida albicans</i> (aislado clínico)	0 mm	11 mm	9 mm	11 mm	0 mm	0 mm

Tabla 17. Halos de inhibición mostrados por las diferentes muestras, en el test de difusión en agar.

Los datos revelan que el P-407 no presenta ningún tipo de actividad antimicrobiana, mientras que el CH, CH+P y CH-P 4 muestran una gran capacidad antibacteriana puesto que en estos compuestos se observó inhibición del crecimiento de las tres bacterias estudiadas; presentando cada una de ellas halos de inhibición de entre 8 a 11mm de diámetro. De la misma manera, estas muestras tienen una capacidad antimicótica, ya que lograron evitar el crecimiento de *C. albicans* con halos de inhibición desde 9 a 11mm de diámetro.

Por último, el CH-P 7 muestra actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento de las tres bacterias con halos de inhibición de 10 y 11 mm de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

diámetro. Sin embargo, no presenta actividad antimicótica, puesto que *C. albicans*, mostró un desarrollo total en la zona del agar donde se encontraba este compuesto, sin revelar ningún tipo de sensibilidad ante los discos impregnados con esta muestra.

***Escherichia coli* (gram negativa)**

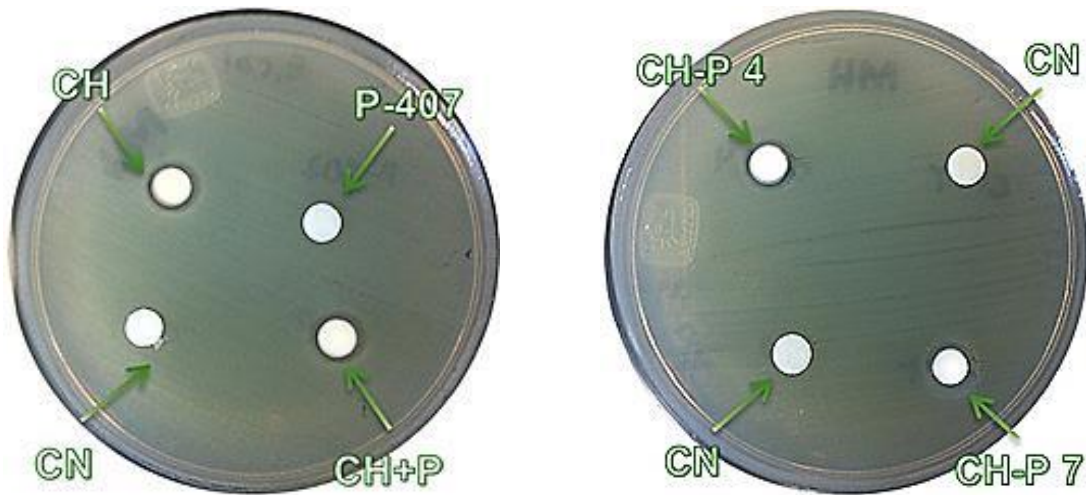


Figura 56. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria *E. coli*, para cada una de las muestras desarrolladas.

***Staphylococcus aureus* (gram positiva)**

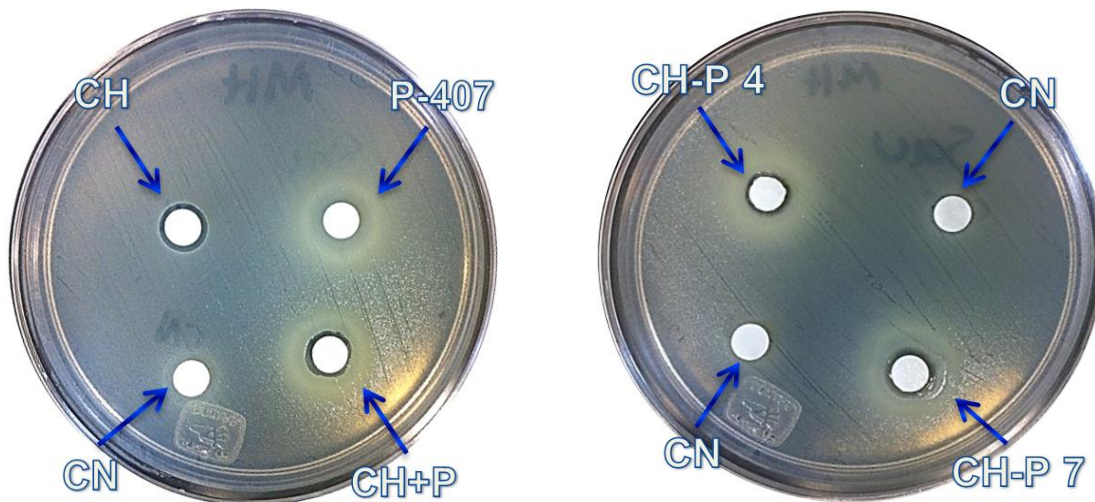


Figura 57. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria *S. aureus*, para cada una de las muestras desarrolladas.

***Pseudomonas aeruginosa* (gram negativa)**



Figura 58. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra la bacteria *P. aeruginosa*, para cada una de las muestras desarrolladas.

***Candida albicans* (hongo)**

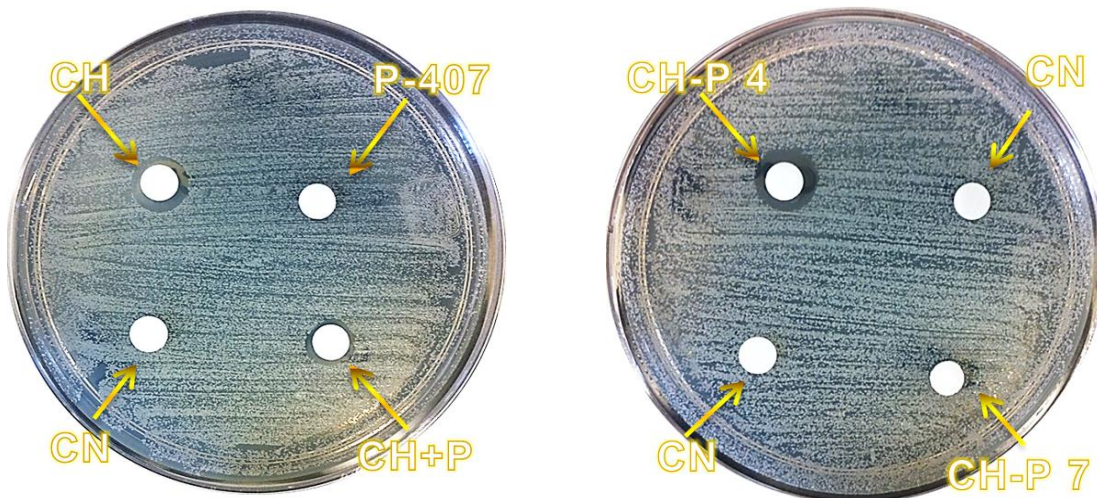


Figura 59. Antibiogramas obtenidos de la prueba de susceptibilidad en agar contra el hongo *C. albicans*, para cada una de las muestras desarrolladas.

Como se esperaba, el CH mostró actividad tanto antibacteriana, como antimicótica, lo cual concuerda con los estudios reportados en la literatura, en donde a este compuesto se le atribuye una capacidad antibacteriana relacionada a: su peso molecular, a menor peso molecular mayor actividad antibacteriana, (el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

CH puede entrar en las células bacterianas y alterar su metabolismo) [103] [96] [104], su grado de desacetilación (cuanto mayor grado de desacetilación, mayor actividad antibacteriana) [104], su naturaleza policatiónica que permite la interacción con la superficie de las células bacterianas (la interacción entre los grupos catiónicos del quitosano y los grupos aniónicos en la superficie de las células bacterianas alteran la permeabilidad de la membrana produciendo un desequilibrio osmótico e inhibiendo el transporte de nutrientes esenciales, asimismo la interacción de estos grupos cargados positivamente con el ADN y ARN de hongos y bacterias inhibe la síntesis de proteínas) [96] y la propiedad quelante del quitosano (formación de complejos entre el quitosano y iones metálicos necesarios por las enzimas bacterianas, principalmente a un pH elevado) [154] [96] [104]. Con base a los resultados obtenidos, se puede decir que el CH utilizado para la preparación de las muestras, el cual presenta un DD de 75% y bajo peso molecular, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos comunes presentes en las heridas.

Asimismo, el CH+P, presenta una actividad antibacteriana y antifúngica de manera similar a la solución de quitosano; lo cual sugiere que en este hidrogel, el potencial antibacteriano y antifúngico, es debido al CH, el cual se encuentra a la misma concentración en ambas muestras; aunque no se descarta la posibilidad de que el P-407 presente en la mezcla tenga la capacidad de aumentar ligeramente esta propiedad antibacteriana, dado que este polímero, al ser un surfactante no iónico, podría interaccionar con la membrana bacteriana [155] y alterar su permeabilidad; sin embargo, no se puede llegar a una conclusión definitiva, puesto que el P-407 por sí solo no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.

En el caso del CH-P 4, la actividad antibacteriana y antifúngica permaneció presente, y en algunos casos es mayor (al mostrar halos de inhibición de un tamaño ligeramente mayor que el CH). Estos resultados no sólo demuestran que la irradiación Gamma no altera la capacidad del CH de inhibir el crecimiento microbiano, sino que además la aumenta, esto puede deberse a la acción de la irradiación aplicada, la cual puede provocar una degradación (escisión) de las cadenas poliméricas, disminuyendo el peso molecular [104], y conllevando a una

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas antimicrobianas/antimicóticas

mayor facilidad de penetración de los componentes en la superficie celular, impidiendo el paso de nutrientes y con esto provocar su destrucción; aunque en este caso tampoco se descarta la posibilidad de que el P-407 presente en el hidrogel sea el que provoca este efecto.

Finalmente, en el CH-P 7 la capacidad antibacteriana no se ve alterada a pesar de la modificación del pH, situación que es contraria a lo esperado, ya que se sabe el CH pierde su actividad antimicrobiana a un pH neutro por la desprotonación de los grupos amina y la baja solubilidad en agua [96]. Esta situación se puede explicar porque, como ya se mencionó, la aplicación de la irradiación gamma permite neutralizar el pH sin que exista una precipitación del CH y a que uno de los efectos de la irradiación es la degradación (escisión, ver la prueba de DSC) de las cadenas poliméricas que provoca una disminución de su tamaño y consecuentemente permite un fácil acceso de los componentes al interior de la célula, en donde al no estar protonados los grupos amina del CH, tienen la capacidad de formar complejos con los iones metálicos necesarios para las enzimas bacterianas, alterando su metabolismo. Por otro lado, la actividad antimicótica desapareció, dejando en evidencia que el hongo es resistente a un pH neutro, por lo que puede crecer sin complicaciones. Esto puede deberse a que la actividad antimicótica del CH es debido a su carácter policationico [156], que resulta en una fuerte unión del polímero a la superficie negativa de las células [157], la cual se pierde al modificar el pH a 7.

Lo anterior sugiere que, estos materiales cumplen con un requisito más de los establecidos para ser un apósito ideal y/o vehículo para la liberación controlada de fármacos, ya que; al ser aplicados en las heridas, prevendrían su infección, y ayudarían a un mejor cierre de las mismas.

Evaluación in vivo

35. Porcentaje de cierre de las heridas

Esta prueba se llevó a cabo para poder determinar macroscópicamente los efectos de la aplicación tópica de cada una de la muestras en el cierre de heridas excisionales a diferentes tiempos.

En la figura 60 se muestran fotografías representativas de las heridas excisionales de espesor total (realizadas en el dorso del ratón) al inicio (0 días), a los 3 días (fase inflamatoria), a los 7 (fase proliferativa) y a los 11 días (inicio de la fase de remodelación), observando su resolución con el respectivo tratamiento que les fue aplicado.

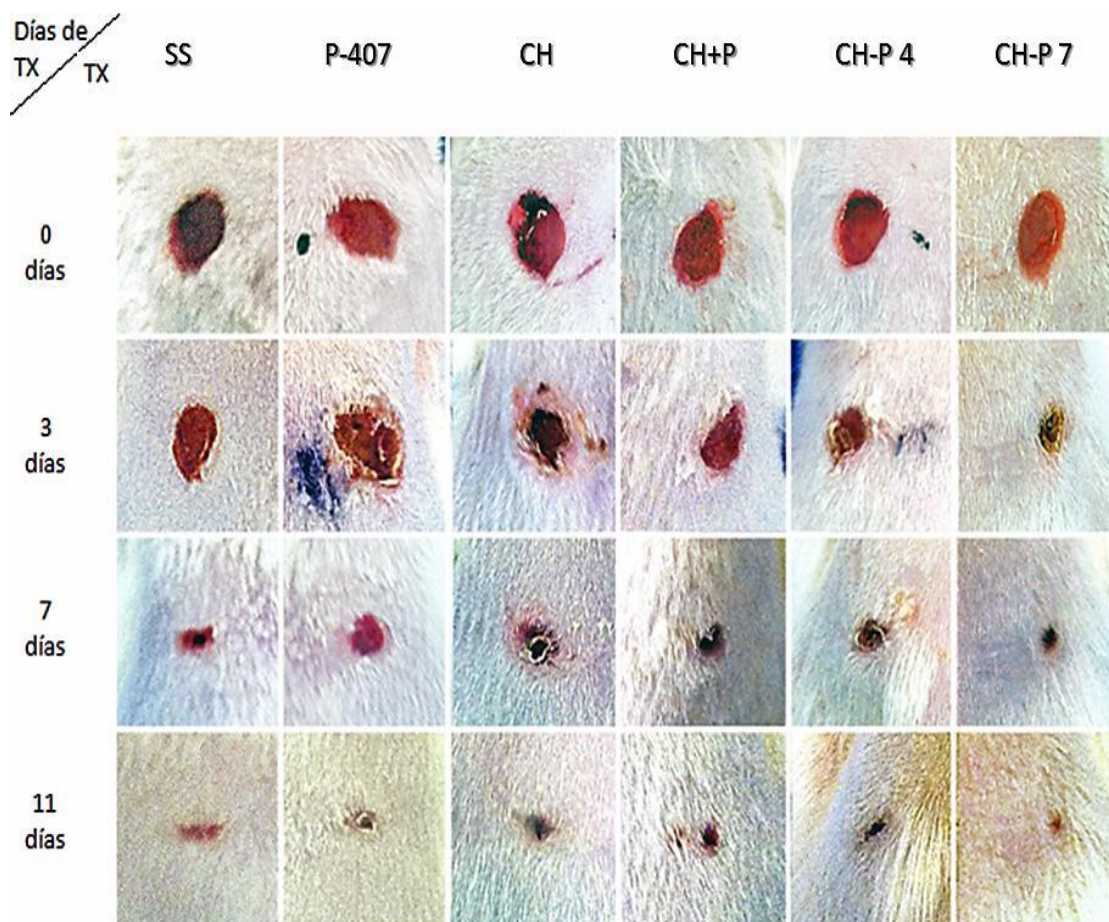


Figura 60. Fotografías macroscópicas que muestran la fase inicial de la herida excisional de espesor total y su resolución a los 3, 7 y 11 días posteriores a su realización al tratarlas con cada una de las muestras: solución salina (SS), utilizado como grupo control, P-407, CH, CH+P, CH-P 4, y CH-P 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación in-vivo

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico que consiste en una serie compleja de eventos que comienzan en el momento de la lesión. La reparación de las heridas implica principalmente tres etapas de cicatrización, es decir, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación. Las fotografías anteriores muestran que la cicatrización, evidenciada por el área y contracción de la herida, aumenta de una manera dependiente del tiempo y del tratamiento en todos los grupos.

Como se presenta en la tabla 18 y en la figura 61, la cinética del cierre de las heridas se obtuvo a partir de las mediciones y cálculos para determinar el área de la herida en diferentes días, y se expresaron como porcentaje de cierre/contracción de la herida. Al aplicar la prueba KW; estadísticamente no se encuentran diferencias significativas en el cierre de la herida al comparar entre todos los grupos. Solo existen diferencias significativas en el porcentaje de cierre entre los diferentes días de estudio, es decir, entre 0-11 días.

Día	Tratamiento aplicado y su respectivo porcentaje de cierre de la herida.					
	SS	P-407	CH	CH+P	CH-P 4	CH-P 7
3	28.149 %	21.010 %	28.013 %	17.524 %	33.023 %	46.451 %
7	74.117 %	77.470 %	53.194 %	76.800 %	71.678 %	74.752 %
11	91.697 %	93.799 %	91.644 %	91.273 %	93.209 %	93.374 %

Tabla 18. Valores numéricos de los porcentajes de cierre de herida mostrados por cada uno de los grupos tratados con las diferentes muestras a los días 3, 7 y 11, n=3.

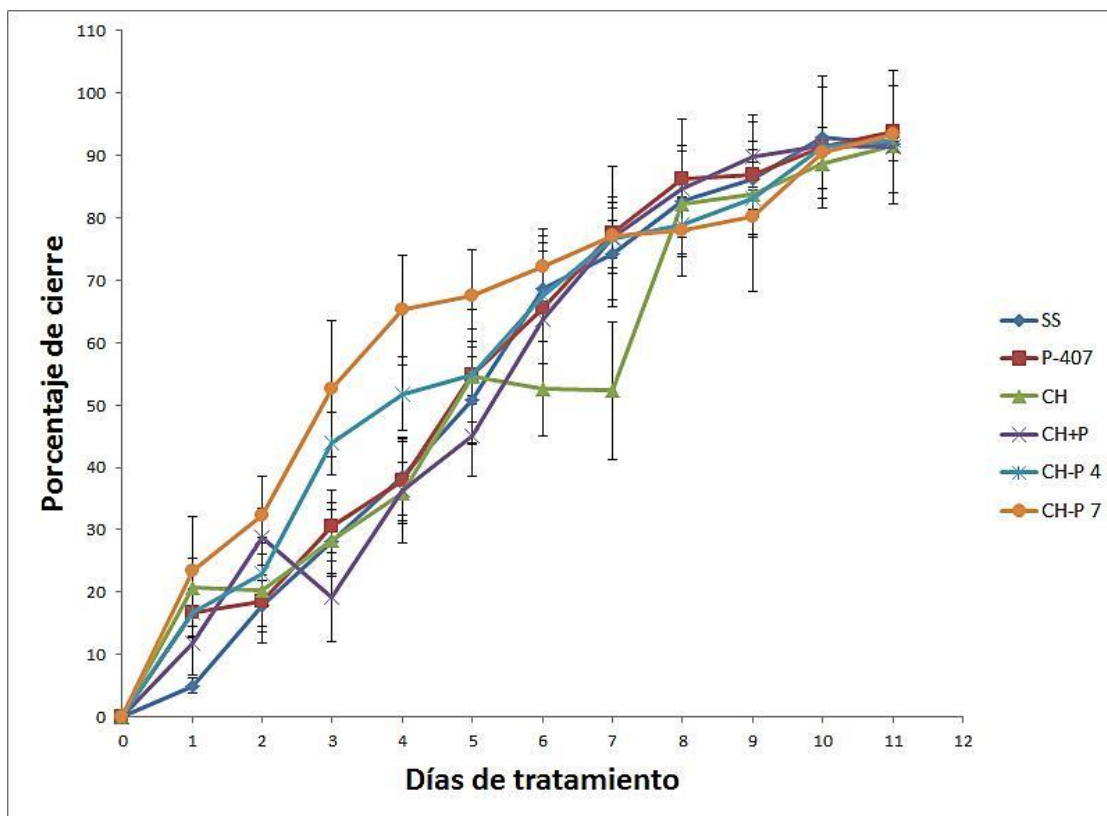


Figura 61. Gráfica de dispersión en donde se presenta el porcentaje de cierre (contracción) de las heridas desde los 0 hasta los 11 días, y sus respectivos errores estándar.

- Descripción clínica de las heridas

Día 0

Las heridas fueron creadas y en su mayoría presentaron sangrado. Al día 0, clínicamente, se observa una herida totalmente abierta excisional de espesor total, en la que puede visualizarse el músculo sin daño aparente cubierto por tejido conjuntivo; las heridas en todos los grupos tienen un área inicial de aproximadamente 19.635mm^2 (Φ 5 cm).

En las heridas que fueron tratadas con los hidrogeles, estos pueden proporcionar una matriz que absorba la sangre gracias a su capacidad de hinchamiento, y además pueden donar agua a la herida al reducir la pérdida de líquidos y mantener la humedad [1].

Día 3 (Fase inflamatoria)

Al tercer día posterior a la lesión, las heridas mostraron una reducción del área lesionada, así como una contracción en aumento, y ya se presentaban costras en

el lecho de la herida. En ningún caso se observó evidencia de infección en ningún grupo.

A este día, el menor porcentaje de cierre fue presentado por los ratones tratados con CH+P (17.524 %) y el mayor, fue el del grupo tratado con CH-P 7 (46.451 %). Esta diferencia puede deberse a los efectos de la irradiación en el hidrogel (esto con base a que el segundo grupo con el mayor porcentaje de cierre fue el tratado con CH-P 4).

Día 7 (Fase de proliferación)

En este día, se observa una mayor contracción de las heridas, en todos los casos, ya se rebasa el 50% del porcentaje de cierre; todas las heridas muestran costra, la cual en la mayoría de los casos presenta una coloración café oscuro.

Al día 7, el menor porcentaje de cierre fue presentado por los ratones tratados con CH (53.194 %), situación que sugiere un retraso en la cicatrización en comparación con los otros grupos en estudio. El resto de los tratamientos muestra un cierre similar de las heridas, aunque el porcentaje es ligeramente mayor, para el grupo CH+P (76.800%), por lo cual se puede deducir que su mejor actividad cicatrizante lo muestra entre los 3 y 7 días. El tratamiento con CH+P, aunque disminuyó la velocidad de cierre de la herida durante los primeros días, durante la fase inflamatoria, se observó un incremento en la tasa del cierre de la herida a los 7 días posteriores a la lesión, durante la fase de proliferación. Lo que sugiere que estos hidrogeles influyen de manera distinta durante el curso de la cicatrización.

Día 11 (Fase de remodelación)

La piel se compone de dos capas principales: la epidermis y la dermis. Una característica esencial de una herida cicatrizada es la restauración de una barrera epidérmica reflejada por la reepitelización de la herida.

Al día 11, las heridas ya muestran una gran evolución, a este tiempo, todavía se observa una costra, no obstante, esta ya es de menor tamaño y delgada, el porcentaje de cierre mostrado a este día, ya es de más del 90% en todos los grupos, lo que nos indica que ya hay una reepitelización, sin embargo, esta no se ha completado totalmente, por lo que se concluye que para poder estudiar de forma más extensa esta última fase, es necesario dejar evolucionar

por más tiempo las heridas, hasta observar macroscópicamente una reepitelización completa, con un porcentaje de cierre total y sin costra. No hubo evidencia macroscópica de infección, hemorragia, cicatrices queloides o hipertróficas en todos los animales durante el experimento

A este día, las áreas de heridas fueron muy similares en todos los grupos, ya que solo hubo una mínima diferencia en cuanto a los porcentajes de cierre mostrados, el menor porcentaje de cierre fue presentado por los ratones tratados con CH+P (91.273 %) y el mayor, fue el del grupo CH-P 7 (93.799 %). Las fotografías de la figura 60, muestran que las costras son sumamente pequeñas, y entre ellas, la que se observa con un mejor aspecto y a simple vista más pequeña, es la de CH-P 7. No obstante, la información de la calidad del cierre de las heridas con respecto a cada uno de los tratamientos aplicados se observa en la sección de las tinciones histológicas y pruebas de Inmunofluorescencia.

Los hidrogeles irradiados aceleraron el cierre de las heridas en los primeros días, principalmente el CH-P 7 ya que fue el que mostró el mayor porcentaje de cierre (sin ser estadísticamente significativo), siendo el pionero hasta los 6 días, puesto que a los 7 días el porcentaje de cierre se iguala con los demás tratamientos, a excepción del CH, el cual muestra un porcentaje de cierre aceptable hasta el día 5, en donde comienza a mantenerse e incluso retrasar el cierre de las heridas a los 7 días, aunque las fotos clínicas no reflejan esto. Con base en la figura 61, podría sugerirse una aplicación del CH-P 7 diariamente hasta el día 7, y aplicar el quitosano desde el día 7.

Sin embargo, al final no hay cambios en el cierre de la herida, entre los distintos tratamientos, ya que todos los porcentajes de cierre se igualan, esto sugiere que los hidrogeles irradiados actúan a diferentes niveles, promoviendo la cicatrización al inicio del proceso y retrasándola durante la proliferación.

36. Peso de los animales.

El peso es un parámetro que indica la estabilidad de los animales; si estos bajan de peso, sería un indicativo de una alimentación inadecuada, presencia de algunos malestares o algún tipo de depresión, todo lo opuesto a que si el peso se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación in-vivo

conserva o aumenta, lo que querría decir que los animales están en un buen estado y siguen con su desarrollo normal.

La siguiente figura (Fig. 62), muestra el comportamiento del peso de los ratones utilizados, desde los 0, hasta los 11 días de tratamiento.

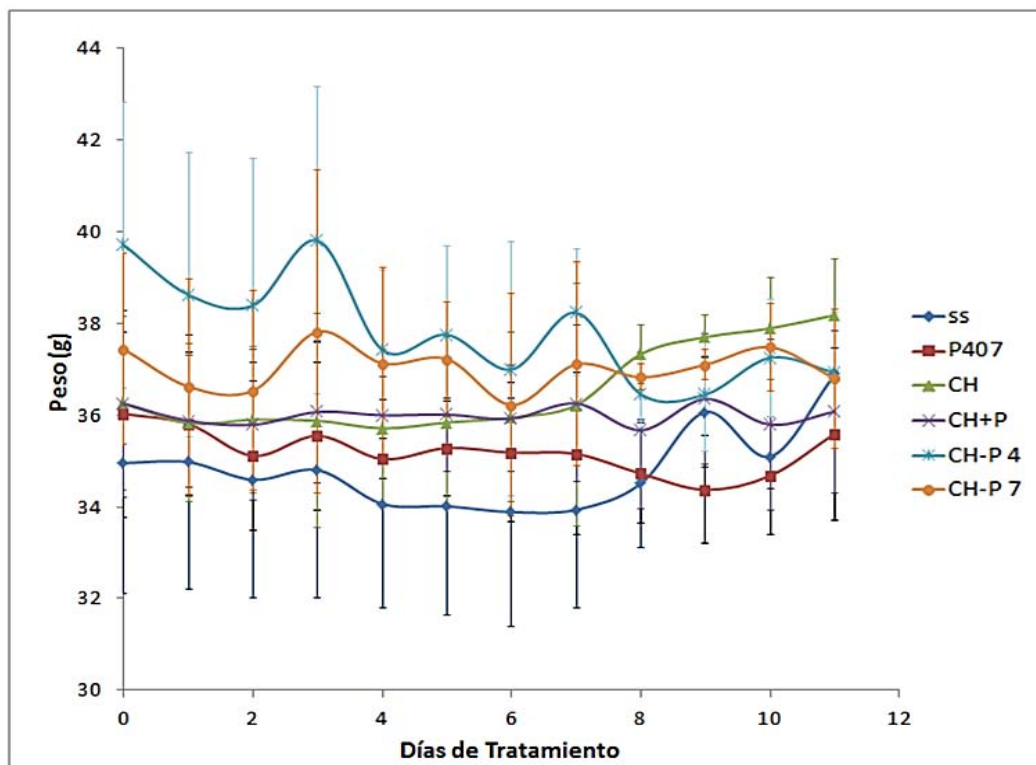


Figura 62. Gráfico del peso de los animales, desde los 0 hasta los 11 días de tratamiento.

Como se observa, el peso en los primeros días disminuye ligeramente, lo que quiere decir que los ratones presentan algunos malestares debidos al dolor ocasionado por las heridas, no obstante, el peso fue incrementándose alrededor del tercer día, lo cual se puede apreciar en la gráfica como un ligero pico; posteriormente, a los siguientes días, el peso vuelve a ser el mismo que el inicial e incluso aumenta, en algunos casos, el peso disminuye ciertos días, pero al día 11, ningún peso está por debajo del inicial, esto quiere decir, que los ratones permanecieron en condiciones óptimas y no presentaron ningún tipo de complicación.

37. Tinciones histológicas

Se realizó el análisis histológico de las heridas, que, a diferencia de la descripción macroscópica, permite estudiar a nivel celular la recuperación del tejido, con el fin de evaluar el progreso de cada etapa del proceso de reparación de las heridas: al día 3, la fase inflamatoria, al día 7, la fase de proliferación y al día 11, el inicio de la fase de remodelación. Esto mediante la tinción de H&E para observar el infiltrado celular, la reepitelización y la formación del tejido de granulación; la tinción tricrómica de Masson para evaluar la evolución y organización de la matriz extracelular a lo largo del tiempo en donde las fibras de colágena se observan en azul; y la tinción de Herovici, para determinar la madurez de las fibras de colágena, ligeras empaquetadas de color azul claro (colágena tipo III), y empaquetadas de rosa magenta (colágena tipo I).

A continuación se describe brevemente lo observado en los segmentos histológicos de las zonas de la lesión de cada tratamiento con sus fotografías representativas (Fig. 63-71) a los 3, 7 y 11 días post-lesión.

- Día 3 (Fig. 63, 66, 69)**Descripción**

SS: Mediante la tinción de H&E se observó que en todos los casos persistió la escara y la herida no reepitelizó (3 ratones de 3, 3/3). El infiltrado celular se presentó de manera abundante y resultó positivo para la inmunofluorescencia Anti-elastasa (Fig. 72), la cual confirma la presencia de neutrófilos que forman parte del infiltrado inflamatorio. Se observó con la tinción de Masson una gran cantidad de tejido en reparación caracterizado por una matriz extracelular compacta en la superficie, probablemente correspondiente a la matriz provisional de fibrina, mientras que en la región subyacente, se observó la presencia de una matriz laxa cuyas fibras se organizan paralelamente entre ellas con regiones organizadas en redes en la parte más profunda del tejido (Fig. 66). Ocasionalmente (2/3) se presentaron de manera dispersa, fibras de colágena empaquetada evidenciadas por las tinciones de Masson y Herovici (Fig. 69). Se observó una ligera extensión de la epidermis sana hacia la región de la herida indicando el inicio de la migración epitelial (2/3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

P-407: La tinción de H&E (Fig. 63) muestra que la escara es persistente al igual que el infiltrado inflamatorio evidenciado por la inmunofluorescencia Anti-elastasa (Fig. 72). Solo en un caso se observó una reepitelización completa (1/4). En 2/3 de las heridas que no han reepitelizado se presentó una ligera extensión epitelial hacia la herida correspondiente a la migración de este tejido a partir de un evidente epitelio hiperproliferativo. La matriz extracelular del tejido en reparación es poco abundante. En la superficie de la herida se presentan regiones de matriz extracelular compacta correspondiente a la matriz de fibrina que aparentemente está siendo sustituida por nueva matriz correspondiente al tejido de granulación que, aunque menos densa que la matriz de fibrina, aún se observa compacta sin presencia de fibras de colágena mediante las tinciones de Masson (Fig. 66) y Herovici (Fig. 69).

CH: Se presenta escara y no hay reepitelización, aunque hay indicios del inicio de la migración epitelial a partir de un epitelio hiperproliferativo (2/3), evidenciado por la tinción de H&E (Fig. 63). Se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio abundante confirmado por la inmunofluorescencia Anti-elastasa (Fig. 72). La cantidad de la matriz depositada en las heridas tratadas con este hidrogel es muy parecida a la observada mediante las tinciones de Masson y Herovici en las heridas control, sin embargo, la matriz de fibrina comprendió un área mayor, abarcando casi todo el tejido en reparación con áreas laterales que se encuentran sustituyendo al coágulo de fibrina por tejido de granulación y sin presentar depósito de colágena (Fig. 66 y 69).

CH+P: Se presentaron características muy similares a las heridas tratadas con CH sólo que aquí no se observó un recambio de la matriz de fibrina sino una persistencia (tinción de Masson, Fig. 66). Mediante la tinción de H&E (Fig. 63), se observa la presencia de escara con nula reepitelización y un infiltrado inflamatorio abundante evidenciado por la inmunofluorescencia Anti-elastasa (Fig. 72). Las tinciones de Masson y Herovici mostraron que la zona de reparación presentó una matriz muy compacta correspondiente a la matriz de fibrina que abarcó la mayor parte del tejido de reparación, sin presencia evidente de una matriz laxa (Fig. 66 y 69). Aunque se evidencio la presencia de un epitelio hiperproliferativo en 2/3 con una incipiente

migración epitelial. Estos resultados indican un retraso en la formación del tejido de granulación.

CH-P 4: La escara persistió en todos los casos debido a una falta de reepitelización evidente. El infiltrado inflamatorio es medianamente abundante, esto observado mediante la tinción H&E (Fig. 63) y la inmunofluorescencia Anti-elastasa (Fig. 72). Mayoritariamente la matriz provisional es escasa en comparación de los otros tratamientos. La matriz superficial es muy delgada caracterizada por presentar tejido compacto propia de una matriz compuesta principalmente de fibrina. Subyacente a esta, hay una matriz con apariencia laxa con un patrón caracterizado por una organización fibrilar paralela, en la cual se observa un incipiente depósito de colágena predominantemente poco empaquetada que fue identificada por las tinciones de Masson (Fig. 66) y Herovici (Fig. 69). Esto indica una ligera aceleración en la formación de la dermis en reparación Únicamente en un caso de tres se observó epitelio hiperproliferativo con una migración epitelial incipiente.

CH-P 7: La escara persistió en tres ratones de cuatro, pero en dos ratones se observa una integración de la misma al tejido en reparación; mientras que en las otras heridas ésta es delgada. No se observa reepitelización en ningún caso y sólo se observa epitelio hiperproliferativo y migración incipiente en un caso. El infiltrado inflamatorio es medianamente abundante (tinción de H&E, Fig. 63 y la inmunofluorescencia Anti-elastasa, Fig. 72). Las tinciones de Masson (Fig. 66) y Herovici (Fig. 69) mostraron, en general, que la matriz provisional es escasa pero con mayor proporción que en las heridas tratadas con el gel irradiado a pH=4. En los casos en donde no se observa la escara integrada al tejido, se presenta una matriz superficial compacta de fibrina; mientras que en los otros casos hay presencia evidente de fibras empaquetadas correspondientes a colágena tipo I, embebidas en una matriz superficial medianamente compacta. Por otro lado, en uno de los casos en el que se observa escara y matriz de fibrina, la matriz profunda es laxa con una organización paralela de las fibras. Al igual que el grupo tratado con CH-P 4, hay una aparente aceleración en la síntesis de colágena.

Análisis

Al día tres, en todos los casos, las heridas presentan escara y no presentan reepitelización completa, esto corresponde con lo observado en los porcentajes de cierre, en donde el cierre máximo a este día fue menor al 50.0%; únicamente un ratón de cuatro de los que fueron tratados con P-407 presentó reepitelización completa; sin embargo, no hay evidencia suficiente para establecer que esto se deba al tratamiento dado que se requiere de un mayor número de repeticiones. Por otro lado, ***la escara de las heridas tratadas con CH-P 7 presenta diferencias con respecto a las otras heridas, en las cuales dos ratones (2/4) muestran una escara con una integración al tejido en reparación, mientras que en el resto de los ratones la escara es delgada, esto es ventajoso con respecto a los otros tratamientos dado que se ha observado en otros estudios que una escara reducida acelera el proceso de cicatrización al permitir una reepitelización más rápida*** [158], además, la integración de la escara al tejido, puede deberse a las propiedades adhesivas del hidrogel, ya que se sabe que el CH tiene esta característica, aunque en los otros tratamientos en donde está presente el compuesto esto no ocurrió, por lo tanto, es posible que el pH sea un factor que está modificando los grupos funcionales en la estructura del polímero que pueden interactuar con los tejidos.

Como ya se mencionó, no se observa reepitelización total de las heridas, pero sí el inicio de la migración epitelial a partir de un epitelio hiperproliferativo, el cual está presente en la mayoría de las heridas de cada tratamiento (2/3); sólo en el caso de los hidrogeles irradiados, esto se observó únicamente en una herida. ***A pesar de la poca migración epitelial, a este día las heridas tratadas con CH-P 7 y CH-P 4 fueron las que presentaron el mayor porcentaje de cierre, lo que sugiere que el cierre está ocurriendo principalmente por contracción y no por reepitelización del tejido.***

El infiltrado inflamatorio es abundante en las heridas tratadas con SS, P-407, CH y CH+P, mientras que en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados es medianamente abundante, indicando una tendencia de estos últimos a reducir la respuesta inflamatoria.

En cuanto a la MEC, en los grupos control y P-407 se observó una gran cantidad de tejido en reparación (menor en el P-407) caracterizado por una matriz provisional superficial de fibrina y una matriz laxa compuesta de fibras organizadas paralela y

reticularmente en la región subyacente profunda del tejido, dejando en evidencia que el P-407 no tiene efecto sobre la matriz provisional. De forma similar, las heridas tratadas con CH y CH+P presentan una gran cantidad de tejido en reparación compuesto principalmente por una matriz de fibrina con la diferencia de que ésta última abarca la mayor parte del tejido. Esto muestra que a pesar de que el P-407 se encontraba en mayor proporción, el efecto observado en el hidrogel con la mezcla es atribuido al CH, el cual pudiera estar relacionado con la actividad hemostática del polímero [105] que promueve la matriz abundante de fibrina.

En los otros tratamientos (CH-P 4 y CH-P 7) el tejido en reparación fue escaso, compuesto principalmente por fibrina en la región superficial y por una matriz profunda laxa organizada en fibras paralelas, sugiriendo de esta manera que los hidrogeles irradiados tienen la capacidad de disminuir la cantidad de tejido en la matriz provisional.

Adicionalmente, las heridas tratadas con SS y CH-P 7 presentaron fibras de colágena empaquetada (tipo I) embebidas en la matriz superficial; **y las heridas tratadas con CH-P 4 muestran un incipiente depósito de colágena predominantemente poco empaquetada, lo que demuestra un retraso en la síntesis de colágena en los otros tratamientos.** Finalmente, en los grupos del P-407 y CH, la matriz provisional está siendo sustituida por tejido de granulación sin presencia de fibras de colágena, lo que sugiere que en estas heridas hay una transición a la fase de proliferación que pudiera estar relacionado con una actividad pro-angiogénesis.

- Día 7 (Fig. 64, 67, 70)

Descripción

SS: Mediante la tinción de H&E (Fig. 64) se observa que las heridas están completamente reepitelizadas, en donde el epitelio nuevo es más grueso y consta de varias capas epiteliales (8-10 estratos) en comparación con el epitelio sano (3-4 estratos), evidenciadas con la tinción de Herovici (Fig. 70). La dermis en reparación presenta una matriz compacta con fibras gruesas organizadas paralelamente en dos ratones de tres. Solo en un caso, se observa el tejido de granulación caracterizado por poco depósito de ECM (tinciones de Masson, Fig. 67 y Herovici, Fig. 70), y presencia abundante de células y vasos sanguíneos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

P-407: En general, las heridas se observan completamente reepitelizadas (2/3), con una herida que presentó reepitelización parcial (Fig. 64). El epitelio que cubre la herida es más grueso (8-14 capas) que el del grupo control, al igual que el estrato córneo. En un caso de tres se observa un tejido en reparación similar al del grupo control mientras que en dos de tres hay un tejido de granulación inmaduro evidenciado por las tinciones de Masson (Fig. 67) y Herovici (Fig. 70), donde aparecen vasos sanguíneos de calibre pequeño y poca presencia de matriz.

CH: Mediante la tinción de H&E (Fig. 64), se observó que ninguna de las heridas presentó reepitelización completa. La escara persiste y está integrada al tejido de reparación, en estas áreas se observa una matriz desorganizada compacta, con presencia de fibrina, evidenciada por una coloración roja en la tinción de Masson (Fig. 67); sin embargo, subyacente a esta matriz y en las zonas laterales a ella, hay formación de tejido de granulación, con abundante presencia celular y vasos sanguíneos de calibre similar a los de las heridas del grupo control.

CH+P: Solamente en un caso de tres la reepitelización es completa, mientras que en las otras heridas una pequeña porción de la escara está integrada al tejido en reparación con una reepitelización parcial (tinción de H&E, Fig. 64). El epitelio de la herida, aunque es más grueso que el tejido sano, tiene un grosor (8-10 capas) cuya proporción es menor a la del grupo tratado con P-407, siendo similar al grupo control. El tejido de granulación abarca toda el área que está reepitelizada, ya que en donde está integrada la escara, se observa una matriz compacta que corresponde a la matriz de fibrina. El tejido de granulación presenta vasos de mayor tamaño a los observados en las heridas tratadas con poloxámero 407, abundante infiltrado celular y un incipiente depósito de colágena tipo I ligeramente empaquetada evidenciada por las tinciones de Masson (Fig. 67) y Herovici (Fig. 70).

CH-P 4: En 1/3 no hay reepitelización completa y en la zona sin epitelio hay una escara reducida integrada al tejido en reparación (Fig. 64). En dos de tres casos, el nuevo epitelio comprendió de 11 a 20 capas epiteliales, mientras que en el caso restante se apreciaron aproximadamente 7 capas. Mediante las tinciones de Masson (Fig. 67) y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

Herovici (Fig. 70) se observó que mayoritariamente (2/3) hay presencia de una matriz compacta que parece ser de fibrina en la zona central de la herida. Adyacente, en las zonas laterales a ésta se observa tejido de granulación con vasos sanguíneos de tamaño semejante a los observados con la mezcla. La matriz de este tejido es más compacta en comparación con las heridas tratadas con la mezcla y además se observa un depósito incipiente de colágena, la cual se identifica como colágena tipo I, al ser positiva para la tinción Herovici (Fig. 70). También hay abundante número de células (Fig. 64).

CH-P 7: La tinción de H&E mostró que la reepitelización es completa para todos los casos estudiados (Fig. 64). El tejido se observa engrosado con respecto a la piel sana (7-14 estratos epiteliales). Hay tejido de granulación con abundantes vasos sanguíneos de tamaño similar a los de la mezcla y al gel irradiado, con abundante presencia de células ((Fig. 64).). En la región subyacente al epitelio, se observa en la tinción de Masson (Fig. 67) una matriz compacta similar a la de fibrina posiblemente compuesta por fibronectina, el resto de la matriz se caracteriza por un depósito evidente de matriz rica en colágena tipo I (Fig. 70). La matriz del tejido en reparación es más compacta en comparación con el tejido de la mezcla y similar a la del tratamiento con el gel irradiado a pH 4.

Análisis

Al día 7 se esperaba que el proceso de reparación de las heridas se encontrara en la fase de proliferación con una reepitelización evidente, un gran número de células en la zona de lesión como consecuencia de la migración y proliferación de fibroblastos y la formación del tejido de granulación. Los resultados muestran que la mayoría de las heridas presentan vasos sanguíneos, infiltrado celular abundante, así como reepitelización completa, a excepción de las heridas tratadas con CH, en donde en ningún caso se muestra reepitelización total, situación que es además congruente con la cinética de cierre de las heridas en donde el porcentaje de cierre es menor en el grupo tratado con CH. Esto sugiere que este polímero retrasa el cierre de las heridas en el día 7, lo que es contrario a lo esperado, ya que en otros estudios se ha observado que este compuesto acelera la reepitelización [107], aunque es importante considerar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

que este estudio fue realizado en quemaduras utilizando ratas, a diferencia de este estudio en donde el modelo experimental fue con heridas excisionales de ratón. Adicionalmente, en las heridas tratadas con P-407 y CH-P 4 ocurrió que solo 1/3 no reepitelizó completamente; sin embargo, para el caso del CH+P, 2/3 ratones presentaron característica. Esto apoya la observación de que el CH retrasa el cierre de las heridas.

En todos los tratamientos, el nuevo epitelio es más grueso que el epitelio sano, lo que sugiere que no hay una resolución óptima de la herida en ninguna de las condiciones estudiadas, al día 7. Esta situación es normal dado que indica que hay un proceso de proliferación y diferenciación para restaurar la barrera epitelial. **Los grupos del CH-P 4 y P-407 presentaron el epitelio más grueso, en donde este último adicionalmente mostró un estrato córneo grueso, lo que indica una mayor tasa de diferenciación celular.** Las heridas tratadas con CH y CH+P que no reepitelizaron mostraron una escara integrada al tejido de forma similar a las heridas del CH-P 7 al día 3, confirmando que el CH le confiere propiedades al hidrogel que promueven la formación del coágulo sirviendo como tapón hemostático.

El tejido de granulación comprende la mayor parte del tejido en reparación en los grupos tratados con CH+P, CH-P 4 y CH-P 7, con una región en la zona central subyacente a la epidermis con características de matriz compacta similar a la de fibrina, que muestra que el recambio de matriz provisional se hace desde la región profunda de los bordes de la herida hacia la parte superficial y central. Asimismo presentan depósito incipiente de colágena I que sugiere el inicio de la fase remodelación con el recambio a una matriz permanente. Es importante señalar que a diferencia de los grupos control (en donde la matriz provisional aún se observa compacta y no presenta características de tejido de granulación), P-407 (en donde el tejido de granulación aún es inmaduro), CH (en donde aún no se presenta reepitelización total) y CH+P (en donde 2/3 ratones no reepitelizaron completamente), **los grupos CH-P 4 y CH-P 7 presentan reepitelización completa, tejido de granulación evidente y depósito de colágena tipo I, lo que sugiere que el proceso de reparación está más avanzado en las heridas a las que se les aplicaron los hidrogeles irradiados, efecto que pudiera deberse a la aplicación de irradiación gamma en los materiales.**

- Día 11 (Fig. 65, 68, 71)**Descripción**

SS: El tejido está completamente reepitelizado (Fig. 65)., siendo el epitelio ligeramente grueso (8 estratos) en comparación con el tejido sano. Se observa un recambio evidente del tejido de granulación por un tejido cicatrizal compuesto principalmente por colágena empaquetada evidenciada por las tinciones de Masson (Fig. 68) y Herovici (Fig. 71), y en el cual aún residen varias células. Las fibras se encuentran organizadas en forma paralela, y en la región más profunda se observa presencia de vasos sanguíneos de mayor calibre mientras que en la zona superficial son de menor. No hay formación de folículos.

P-407: La tinción de H&E mostró que en un caso de tres hay una ligera porción de la herida que no está reepitelizada, y que el epitelio está formado por 5-6 estratos, siendo más delgada que en las heridas del grupo control (Fig. 65). Hay un incipiente recambio del tejido de granulación por tejido cicatrizal observado con las tinciones de Masson (Fig. 68) y Herovici (Fig. 71). Hay presencia de vasos sanguíneos, los cuales son predominantemente de calibre pequeño y con algunas células. No se observan folículos en la zona lesionada.

CH: Se observa mediante la tinción de H&E que en uno de tres ratones hay una pequeña área de la herida que aún está abierta (Fig. 65), en la que persiste una pequeña escara en la región del epitelio de la herida. El nuevo epitelio está formado por 8-10 estratos y en una de las heridas se observa hiperqueratosis en una región. El recambio del tejido de granulación por tejido cicatrizal es evidente pero menor que en el grupo control, pero mayor que en las heridas tratadas con P-407 (Fig. 68 y 71). En comparación de los tratamientos anteriores se observa una abundante presencia de células. No hay formación de folículos pilosos en el área de la herida. Los vasos sanguíneos se distribuyen en todo el tejido de reparación y son generalmente de calibre pequeño. En uno de tres ratones se observan dos granulomas embebidos por el epitelio de la herida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

CH+P: En dos heridas de tres la reepitelización fue completa, en el otro caso la herida aún se encuentra abierta (Fig. 65). El epitelio de la herida consta de 6-9 estratos. Hay un incipiente recambio del tejido de granulación por tejido cicatrizal, en el cual se observan varias células y vasos sanguíneos de calibre pequeño distribuidos a toda la zona lesionada, y las fibras de colágena empaquetada (positiva para las tinciones de Masson, Fig. 68 y Herovici, Fig. 71) se organizan en forma paralela entre sí.

CH-P 4: En una de cuatro, la herida se encuentra aún abierta en la parte central, en donde además persiste una escara en la zona epitelial. El grosor del epitelio consta de 6-8 estratos (Fig. 65). Se observa un recambio evidente del tejido de granulación por tejido cicatrizal aunque el empaquetamiento de las fibras es inicial evidenciado por la coloración adquirida en las tinciones de Masson (Fig. 68) y Herovici (Fig. 71), además las fibras comienzan a organizarse en forma paralela. Hay presencia de vasos sanguíneos de calibre pequeño que es más evidente en la región profunda de la herida. Se observan células en la zona de la herida y no hay folículos pilosos.

CH-P 7: La tinción de H&E muestra que las heridas están completamente reepitelizadas (Fig. 65). En un caso, el grosor del epitelio es casi similar al grosor de un epitelio sano, mientras que en el otro se observan entre 8-9 estratos. Presenta un recambio evidente del tejido de granulación por tejido cicatrizal compuesto por fibras de colágena tipo I empaquetada dispuestas en forma paralela evidenciada por una intensa tinción de Herovici (Fig. 71) y Masson (Fig. 68) similar a las heridas del grupo control. Aún hay presencia de varias células y vasos sanguíneos de calibre pequeño embebidos en la matriz. En el caso donde el epitelio está engrosado, hay fibras menos empaquetadas en la dermis papilar posiblemente correspondientes a colágena tipo III.

Análisis

Las heridas reepitelizaron completamente en los grupos SS y CH-P 7, mientras que para cada uno de los otros tratamientos se presenta un caso (1 ratón de 3) en donde la herida no reepitelizó en su totalidad, esto sugiere que hay un retraso en la reepitelización que persiste hasta el día 11. En el caso de los hidrogeles, esta situación pudiera deberse a un exceso de humedad en el lecho de la herida que pudiera estar

causando un daño en la piel [159], esto con base a los resultados obtenidos en la prueba de bioerosión, en donde el hidrogel de CH+P es el que muestra el mayor grado de erosión (proporciona una mayor cantidad de agua a la herida), por lo que su capacidad para absorber exudado es baja, además las heridas tratadas con este material presentan ligeramente un menor porcentaje de cierre (sin diferencias que fueran estadísticamente significativas) al día 11. Así mismo, el hidrogel de P-407 presentó predominantemente erosión, por lo tanto, este material también proporcionaría un ambiente húmedo y no se eliminaría el exceso de exudado que es perjudicial durante la reparación de la herida. ***Por el contrario, el hidrogel CH-P 7 muestra una tendencia al hinchamiento, es decir, tiene la capacidad de absorber el exudado de las heridas, disminuyendo la humedad de las mismas, situación que evita que éstas vuelvan a abrirse. Otra explicación podría ser que el pH ácido presente en la solución de CH y en los hidrogeles causa irritación en la piel de los ratones, lo que provoca que éstos se rasquen y lesionen las heridas, situación que se evita con el hidrogel a pH 7.***

Por otro lado, el grosor del epitelio disminuyó (7-10 estratos) a este día en todos los tratamientos en estudio en comparación con el día 7, siendo el del grupo P-407 similar al del tejido sin lesión. Mientras que en el caso del CH se observó hiperqueratosis sugiriendo que este compuesto estimula la proliferación celular [160].

En este día ya es posible visualizar el recambio del tejido de granulación por tejido cicatrizal con depósitos evidentes de fibras de colágena tipo I dispuestas en forma paralela, específicamente, las heridas tratadas con SS y CH-P 7 muestran mayor cantidad de colágena empaquetada que se tiñe de color magenta, dejando en evidencia que si bien en los primeros días el cierre de la herida se acelera, la resolución de la misma no se ve mejorada al aplicar este hidrogel. Argumento que se reitera por la organización de las fibras de colágena en paralelo, característica de cicatrices y no de tejido sano en donde las fibras se entrecruzan en forma de cesta [161]. Con base en estos resultados se puede establecer que los tratamientos únicamente presentan diferencias en los primeros días de aplicación dado que al día 11 ya no se observan diferencias con respecto al grupo control (SS), y en el caso de los hidrogeles P-407, CH+P y CH-P 4 aplicarlo durante un largo periodo de tiempo no muestra un beneficio el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinciones histológicas: H&E, Masson y Herovici

cierre de las heridas sino todo lo contrario, por lo tanto, la aplicación de los hidrogeles debería de ser únicamente en los primeros días, posteriores a la lesión.

Además, a pesar del incipiente recambio de matriz, la zona de la herida aún contiene células y vasos sanguíneos, por lo tanto, el proceso de cicatrización aún no ha terminado, sobre todo en el grupo del CH que muestra histológicamente un retraso. Esto significa que para poder hacer un estudio más detallado de la última fase del proceso de cicatrización, es necesario aumentar el número de días evaluados para llevar a cabo el análisis histológico.

Por último es importante mencionar que en algunas heridas tratadas con CH se presentó la formación de granulomas, situación que ya había sido reportada con anterioridad en otros estudios; en donde se explica que el granuloma se forma para eliminar cuerpos extraños que promueven la inflamación [162]; sin embargo, el cuerpo humano tiene la capacidad de biodegradar al quitosano [126].

37.1. Tinción de H&E para el análisis histomorfológico de las heridas

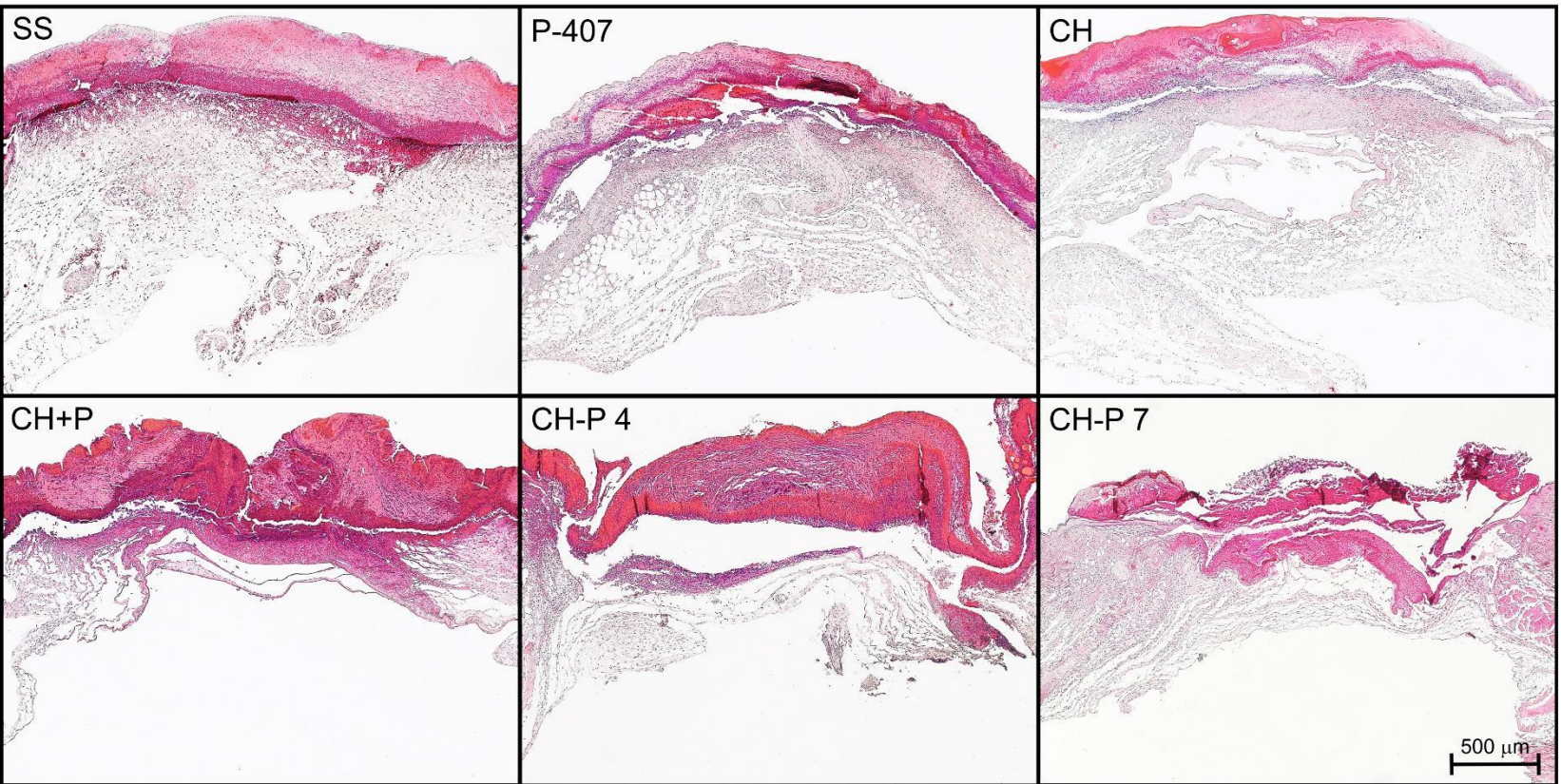


Figura 63. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x. En todas las heridas se observa la presencia de escara sin reepitelización evidente pero con migración incipiente y de un infiltrado inflamatorio abundante.

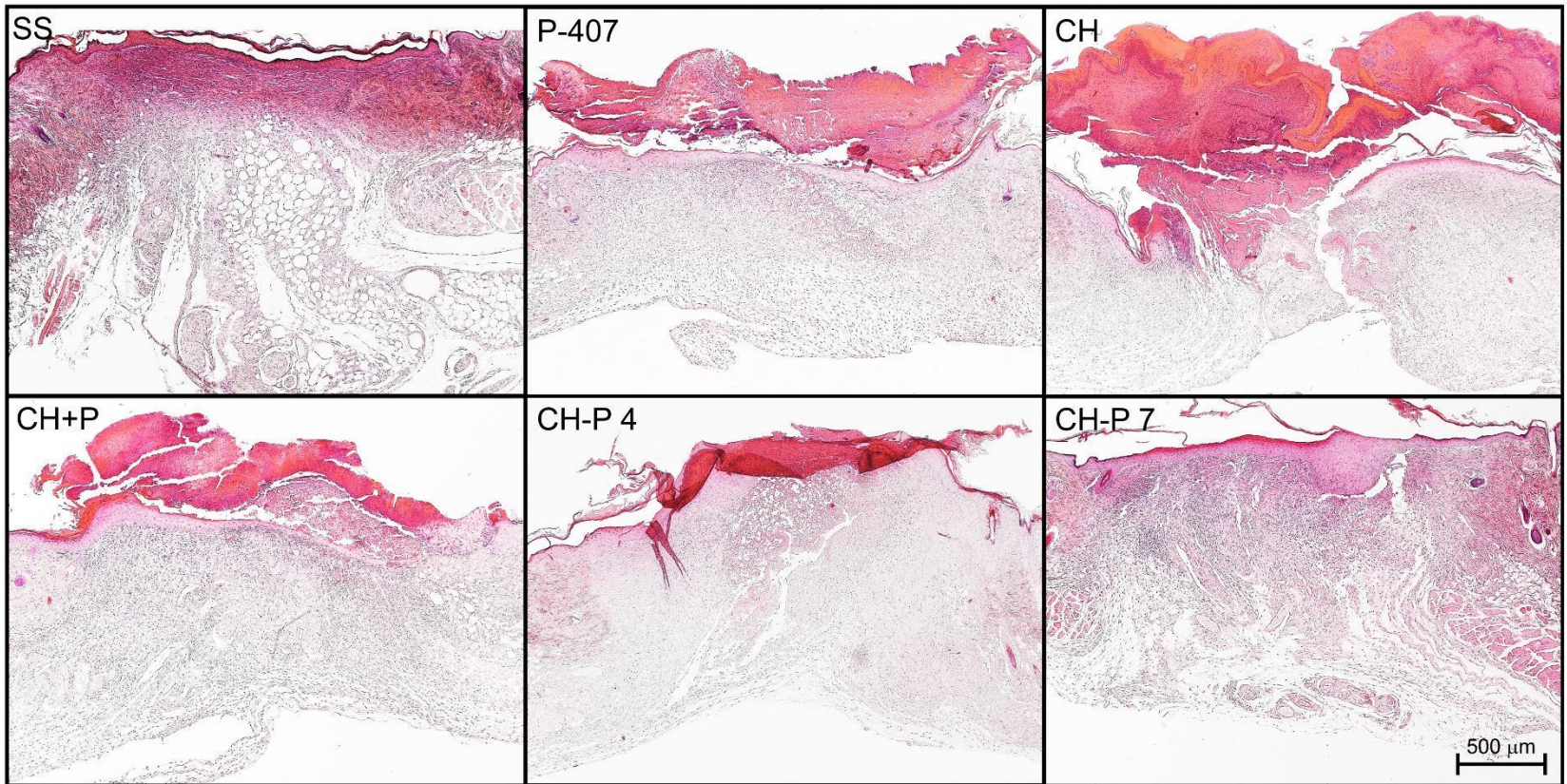


Figura 64. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x. La mayoría de las heridas presentan vasos sanguíneos, infiltrado celular abundante, así como reepitelización completa, a excepción de las heridas tratadas con CH, en donde no se muestra reepitelización total. El tejido de granulación comprende la mayor parte del tejido en reparación en los grupos tratados con P-407, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7, con una matriz compacta en la región central subyacente a la dermis.

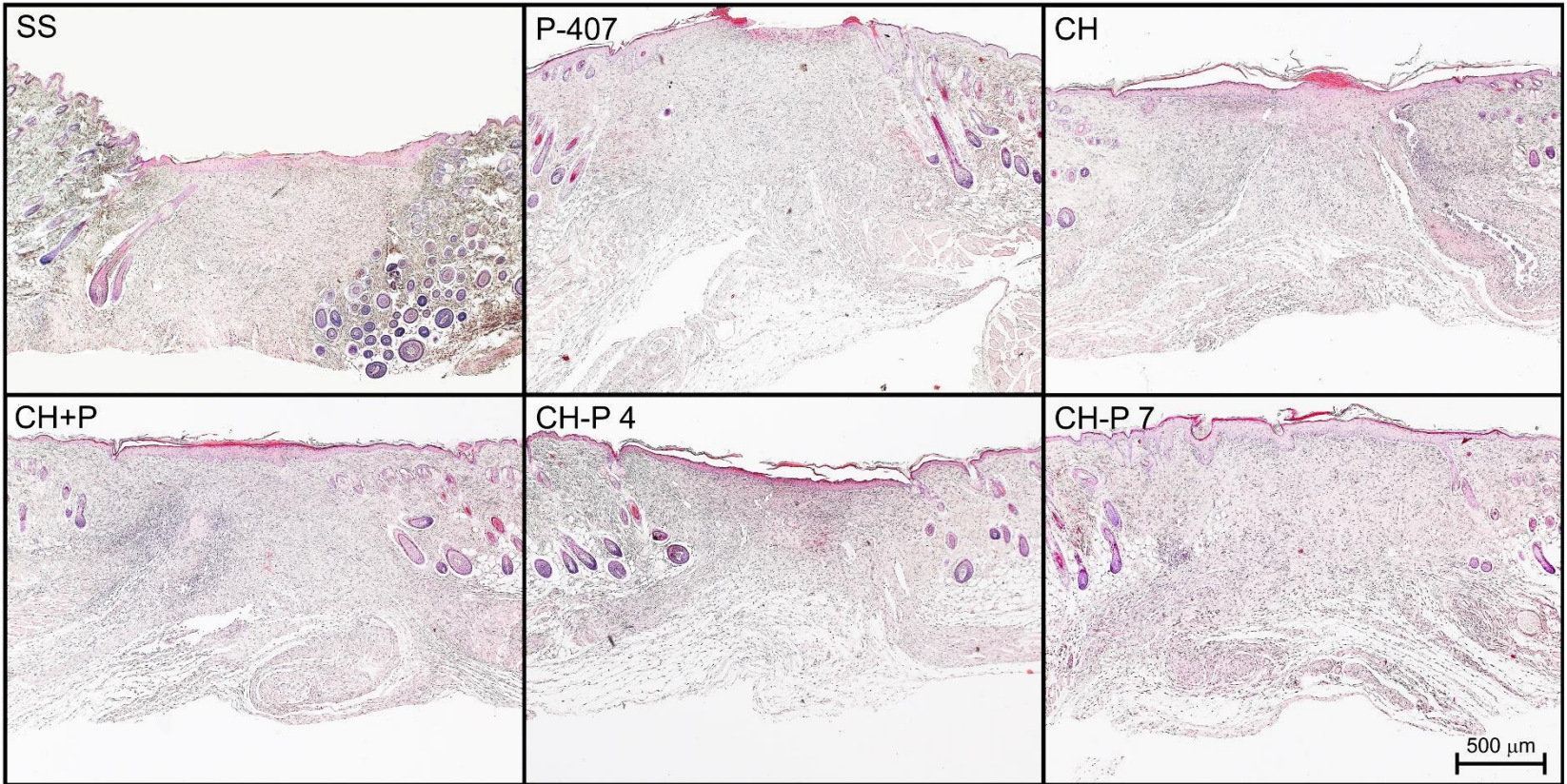


Figura 65. Fotografías de la tinción de H&E para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x. Las heridas reepitelizaron completamente en los grupos SS, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7, mientras que en los otros tratamientos se presenta un caso en donde la herida no reepitelizó en su totalidad. La mayoría de las heridas aún presenta tejido de granulación con vasos sanguíneos e infiltrado celular abundante.

37.2. Tinción Tricrómica de Masson para observar la matriz de colágena

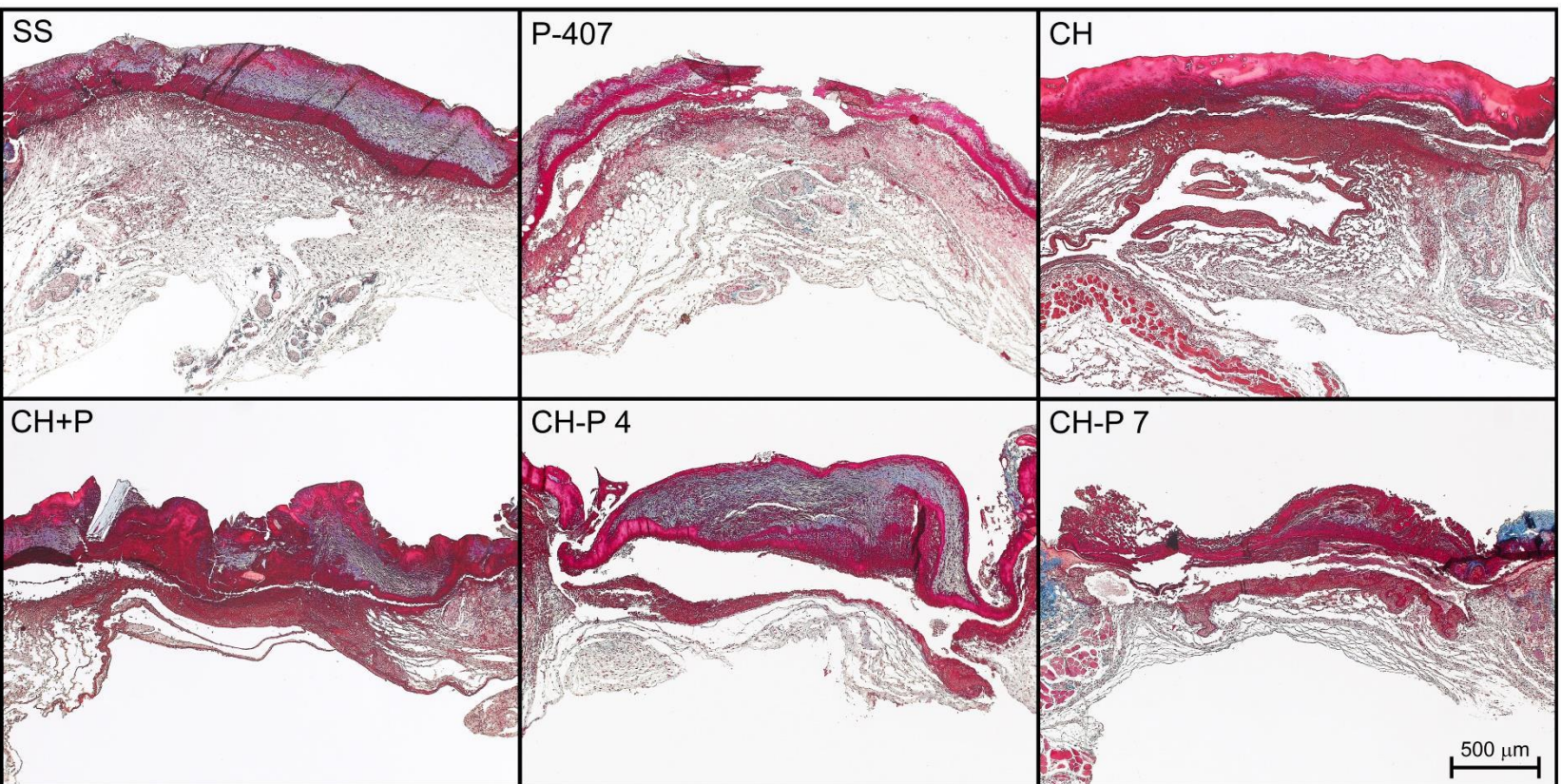


Figura 66. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x. El tejido de reparación es menos abundante en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados, la matriz de fibrina (se muestra en rojo) es mayor en las heridas tratadas con CH y CH+P, comienza el recambio de matriz con incipiente síntesis de colágena (teñida de azul) en la zona profunda de las heridas tratadas con CH-P 4, y CH-P 7.

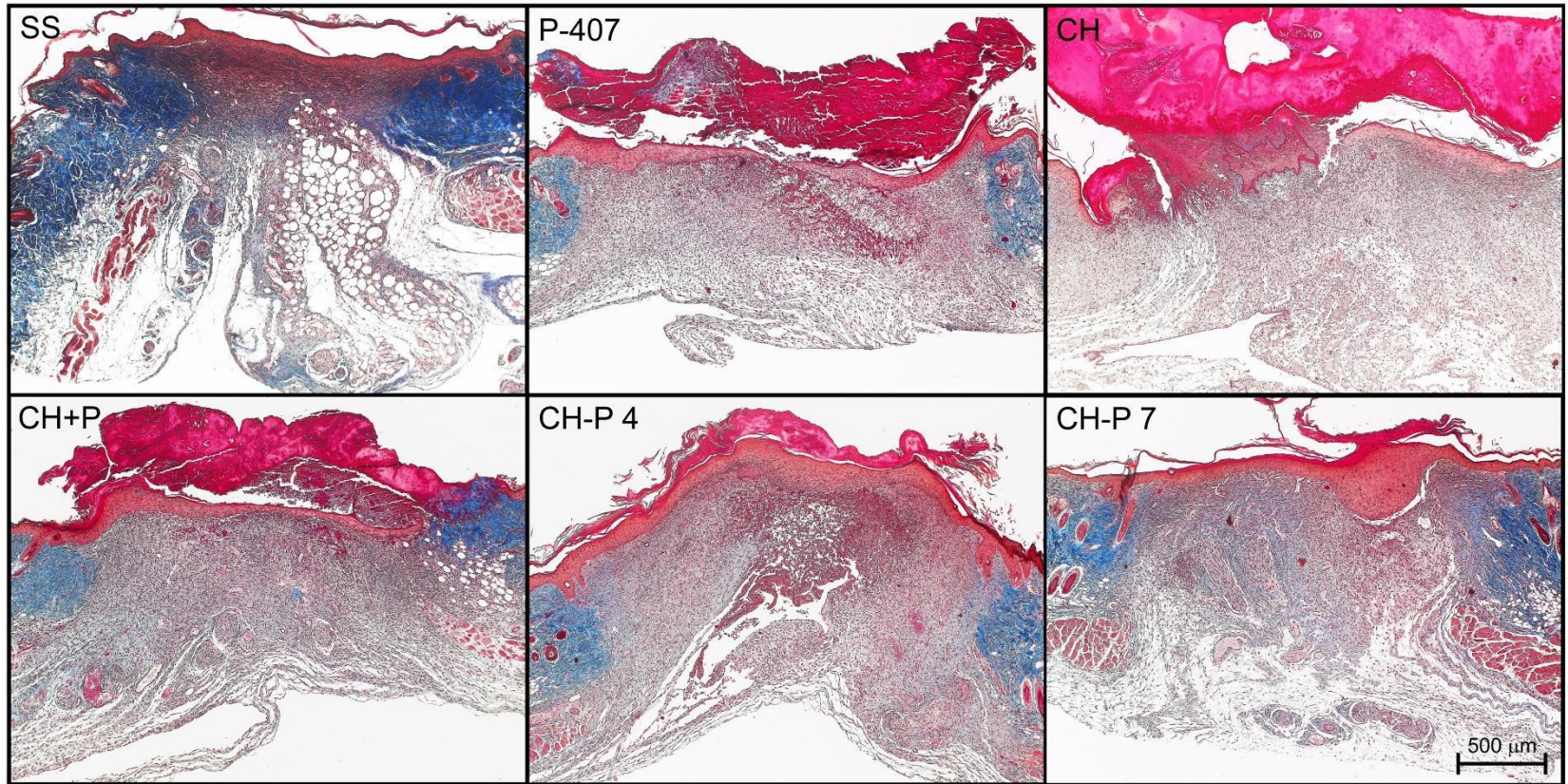


Figura 67. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x. Se observa tejido de granulación y síntesis de colágena (que se tiñe de color azul) en las heridas tratadas con la mezcla de polímeros. Aún se observa matriz compacta con características similares a la fibrina en los grupos a los que se les aplicó SS, P-407, CH, CH+P y CH-P 4.

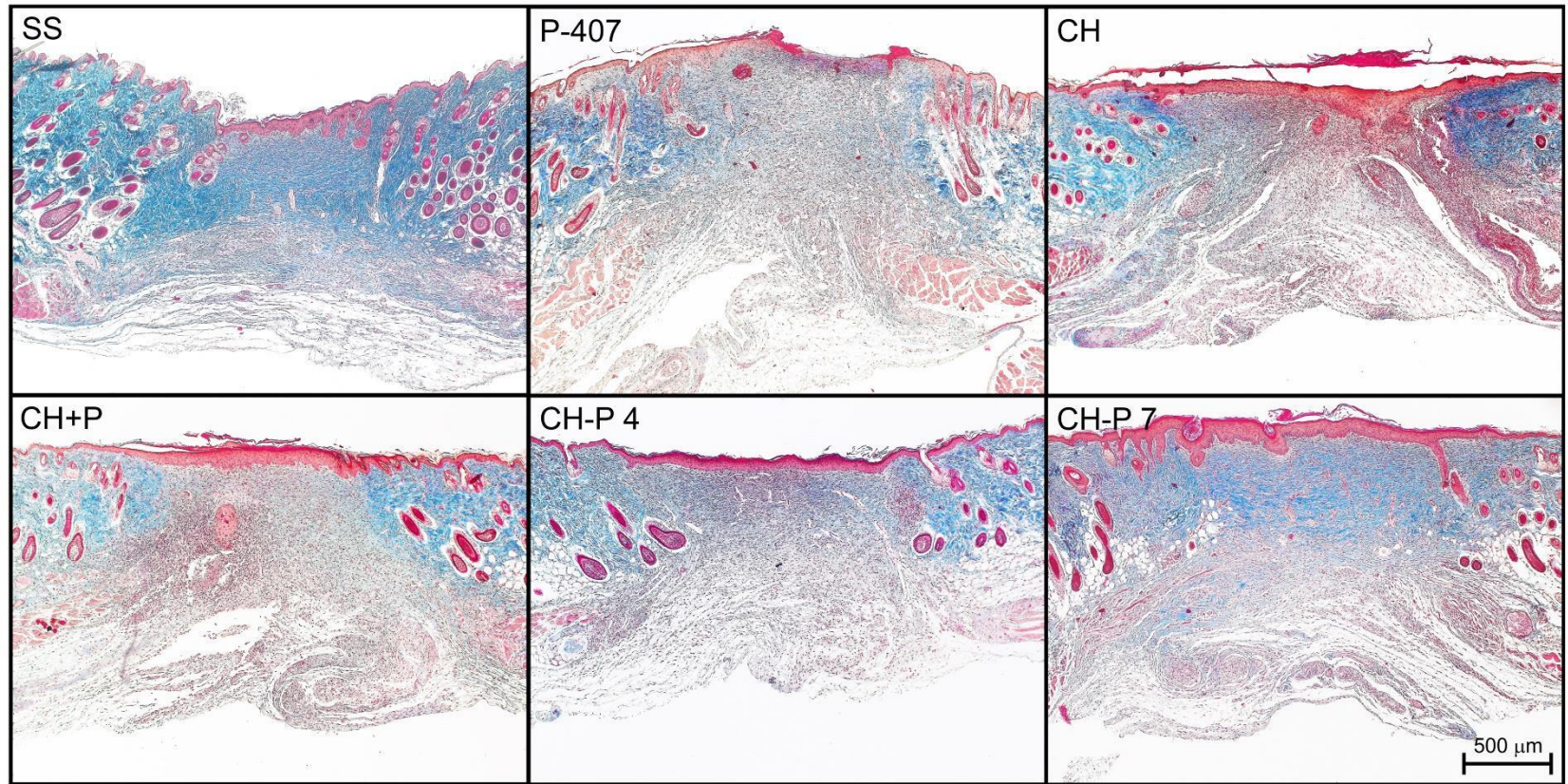


Figura 68. Fotografías de la tinción de Masson para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x. Se observa un recambio evidente del tejido de granulación por un tejido cicatrizal compuesto principalmente por fibras de colágena (teñida de azul) dispuestas en forma paralela.

37.3. Tinción de Herovici para distinguir el tipo de colágena de la matriz

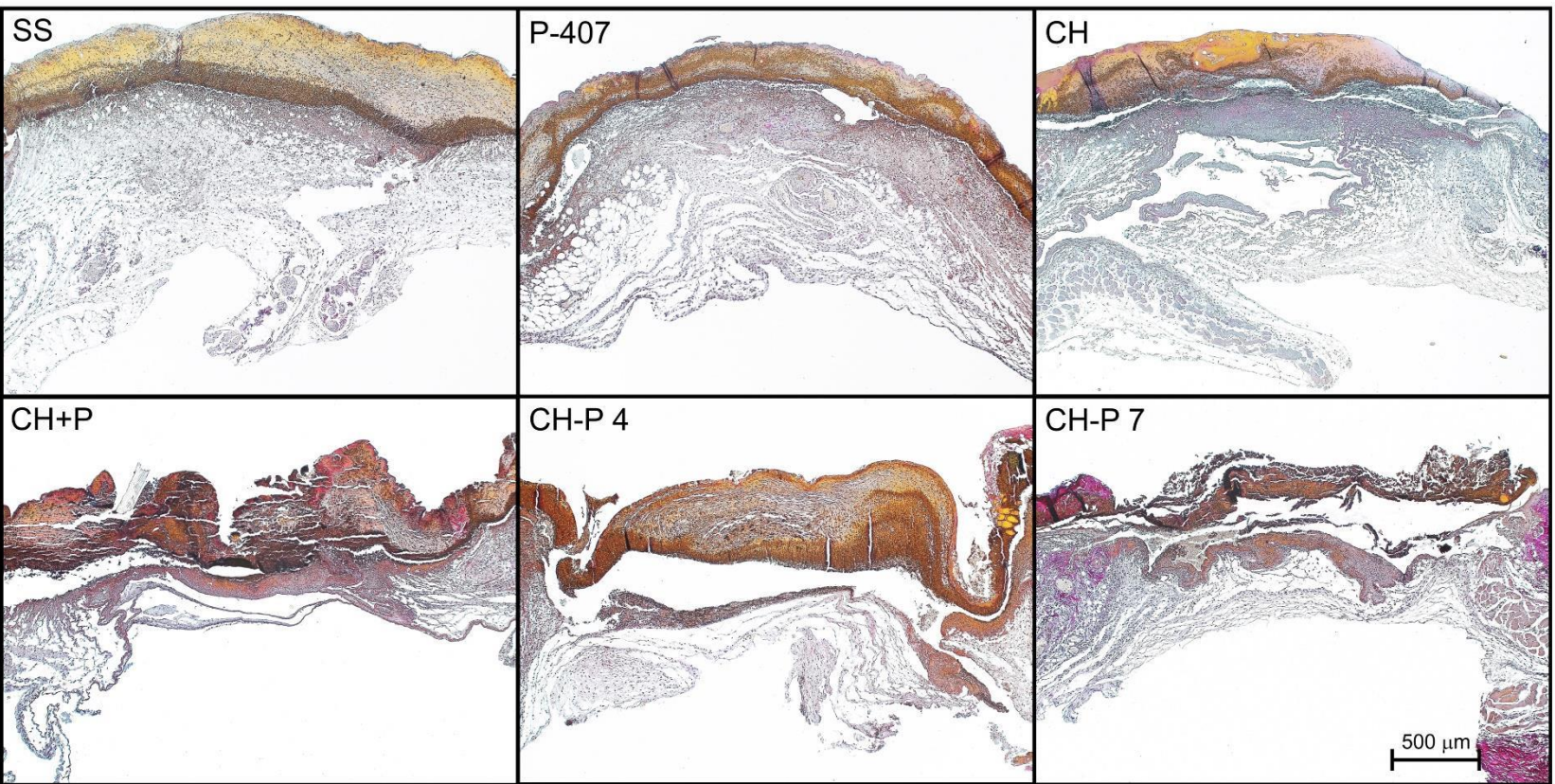


Figura 69. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 3 tomadas con el objetivo 5x. Las heridas tratadas con CH-P 7 presentaron fibras de colágena empaquetada (tipo I, en color magenta) embebidas en la matriz superficial; y las heridas tratadas con CH-P 4 muestran un incipiente depósito de colágena predominantemente poco empaquetada (teñida de azul claro).

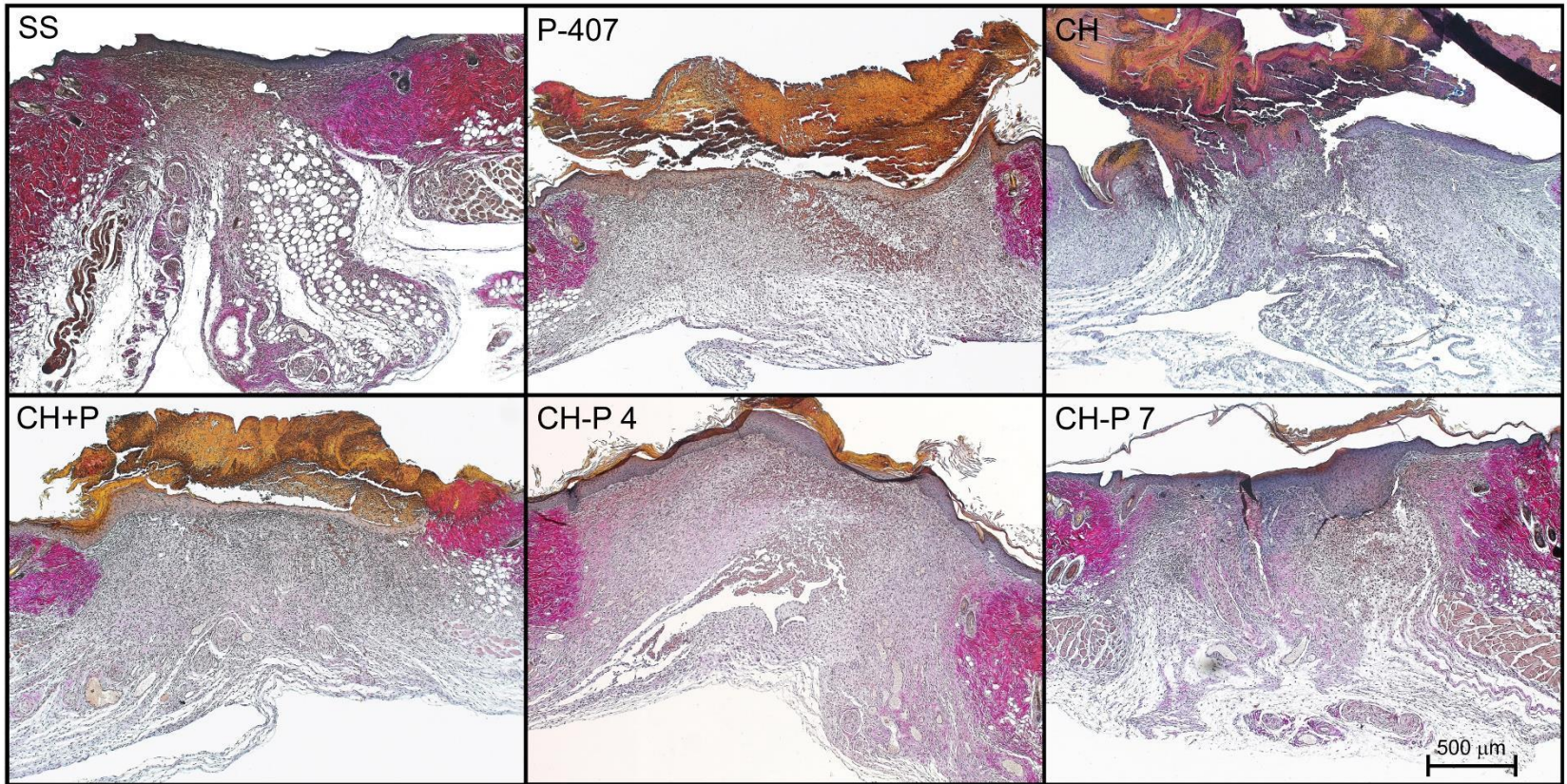


Figura 70. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 7 tomadas con el objetivo 5x. Las heridas tratadas con CH+P, CH-P 4 y CH-P 7 muestran un incipiente depósito de colágena I (se tiñe de color magenta).

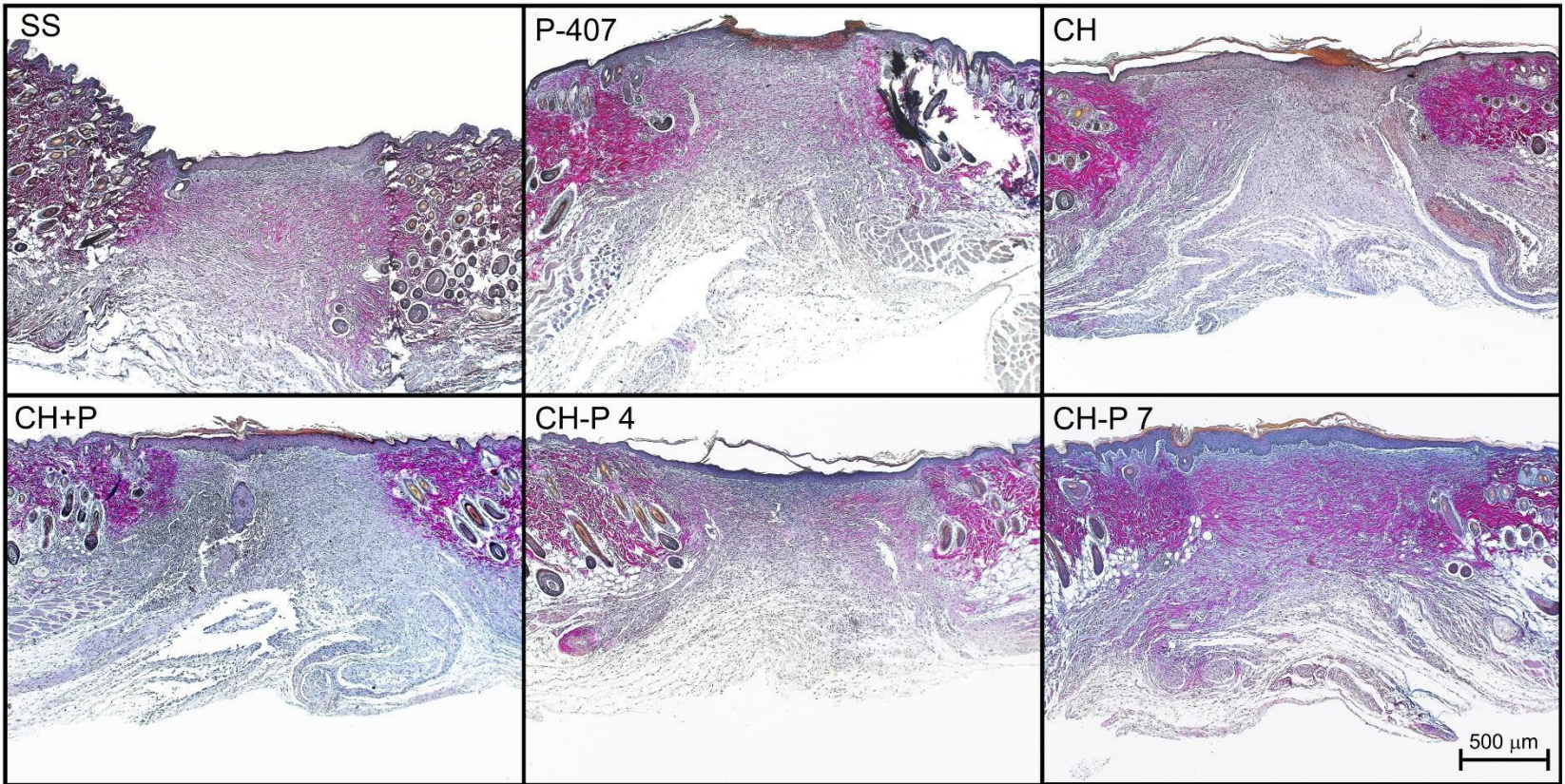


Figura 71. Fotografías de la tinción de Herovici para los segmentos histológicos de las heridas de cada tratamiento al día 11 tomadas con el objetivo 5x. Se observa el recambio del tejido por una matriz permanente con un depósito evidente de colágena tipo I, específicamente, las heridas tratadas con SS y CH-P 7 muestran mayor cantidad de colágena empaquetada que se tiñe de color magenta.

38. Pruebas de Inmunofluorescencia

Después de realizar el análisis histológico de las heridas de cada tratamiento y encontrar diferencias en el proceso de reparación, principalmente en los hidrogeles irradiados; se llevaron a cabo pruebas de inmunofluorescencia para determinar los posibles efectos que las muestras en estudio pudieran llegar a tener sobre las principales células que participan en el cierre de heridas: neutrófilos, macrófagos y fibroblastos activados; así como en la expresión de TGF- β_3 como marcador de una resolución de alta calidad. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada prueba de inmunofluorescencia realizada, fotografías representativas de cada tratamiento a los días 3, 7 y 11, y las gráficas resultantes de la cuantificación.

38.1. Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de neutrófilos

Se realizó esta prueba de inmunofluorescencia (Anti-Elastasa), para confirmar que el infiltrado celular observado en las histologías corresponde a un infiltrado inflamatorio y para estudiar si los hidrogeles tienen algún efecto en el reclutamiento de neutrófilos. Los neutrófilos son los leucocitos dominantes en etapas tempranas de la cicatrización, cuya distribución predomina en la escara, por esta razón, se esperaba que éstas células presentaran niveles elevados al día 3 y que disminuyeran en los días posteriores; sin embargo, la proporción de estas células en la región de reparación es similar en el día 3 y el 7 (Fig. 84) en este modelo. Debido a su abundancia, la cuantificación de los neutrófilos en la escara se torna complicada.

Las observaciones muestran que el número de neutrófilos en la zona de reparación disminuye, pero no se abate al día 11. El grupo tratado con CH mostró un mayor número de neutrófilos al día 7, que correlaciona con un retraso en el proceso de cicatrización como se estableció en las histologías. Este retraso pudiera ser consecuencia del número elevado de neutrófilos, los cuales se sabe inhiben directamente la migración de queratinocitos y posiblemente su proliferación como consecuencia de la liberación de proteasas que pueden inducir un daño en el tejido; sin embargo, se requiere de un mayor número de réplicas para poder confirmar este resultado. Finalmente, al día 11 se observa una reducción evidente de la proporción de neutrófilos en este grupo, la cual es similar a la de los otros grupos en estudio.

Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (SS) que indiquen que los hidrogeles en estudio tengan algún efecto en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inmunofluorescencia: Anti-Elastasa

estas células fagocíticas, lo que significa que los hidrogeles irradiados no generan una respuesta inflamatoria mayor a la que se produce originalmente por la lesión.

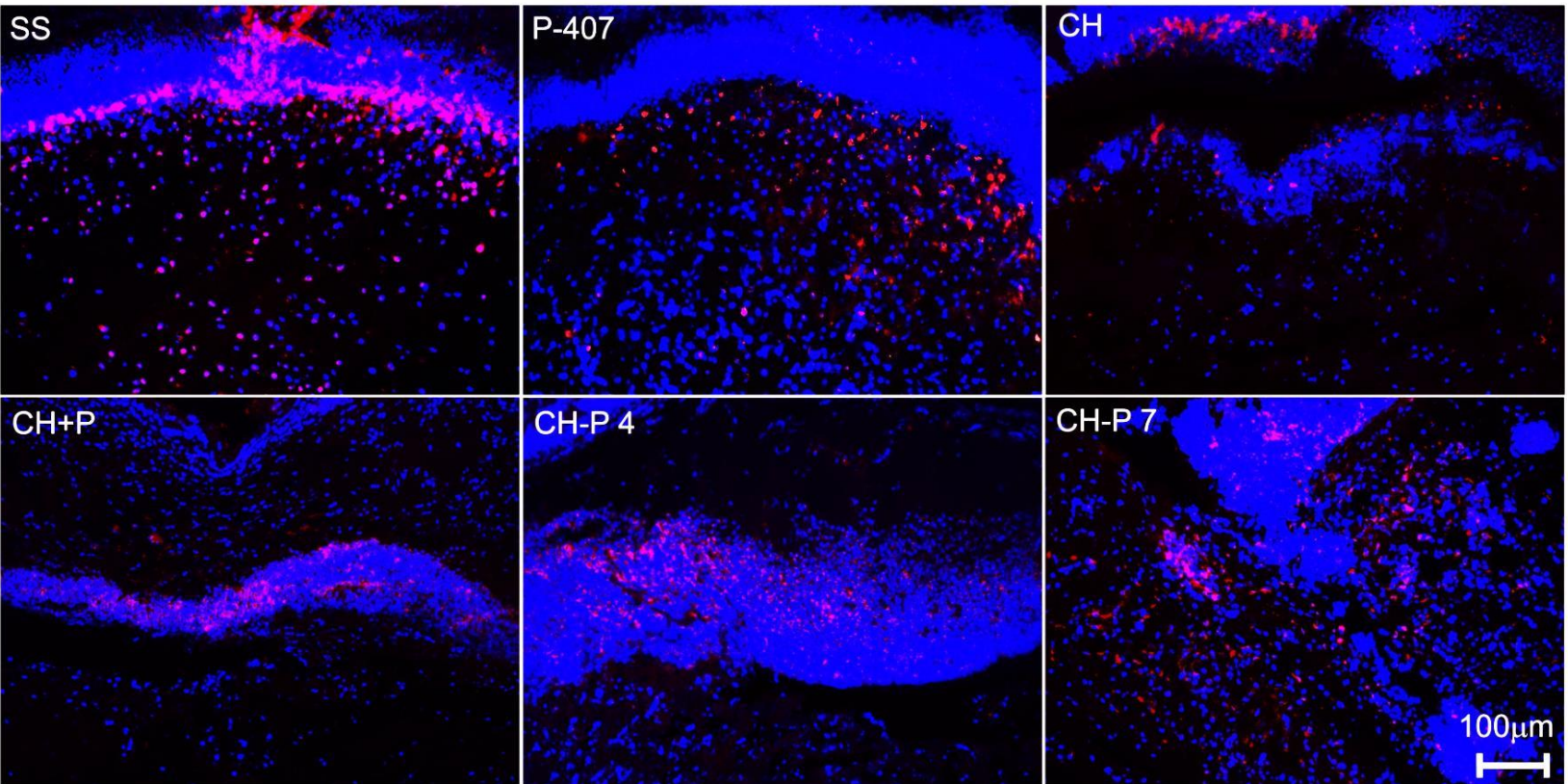


Figura 72. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona de la herida al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x. Se observa un recultamiento similar de neutrófilos en todos los tratamientos, el cual es ligeramente menor en las heridas tratadas con CH, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7.

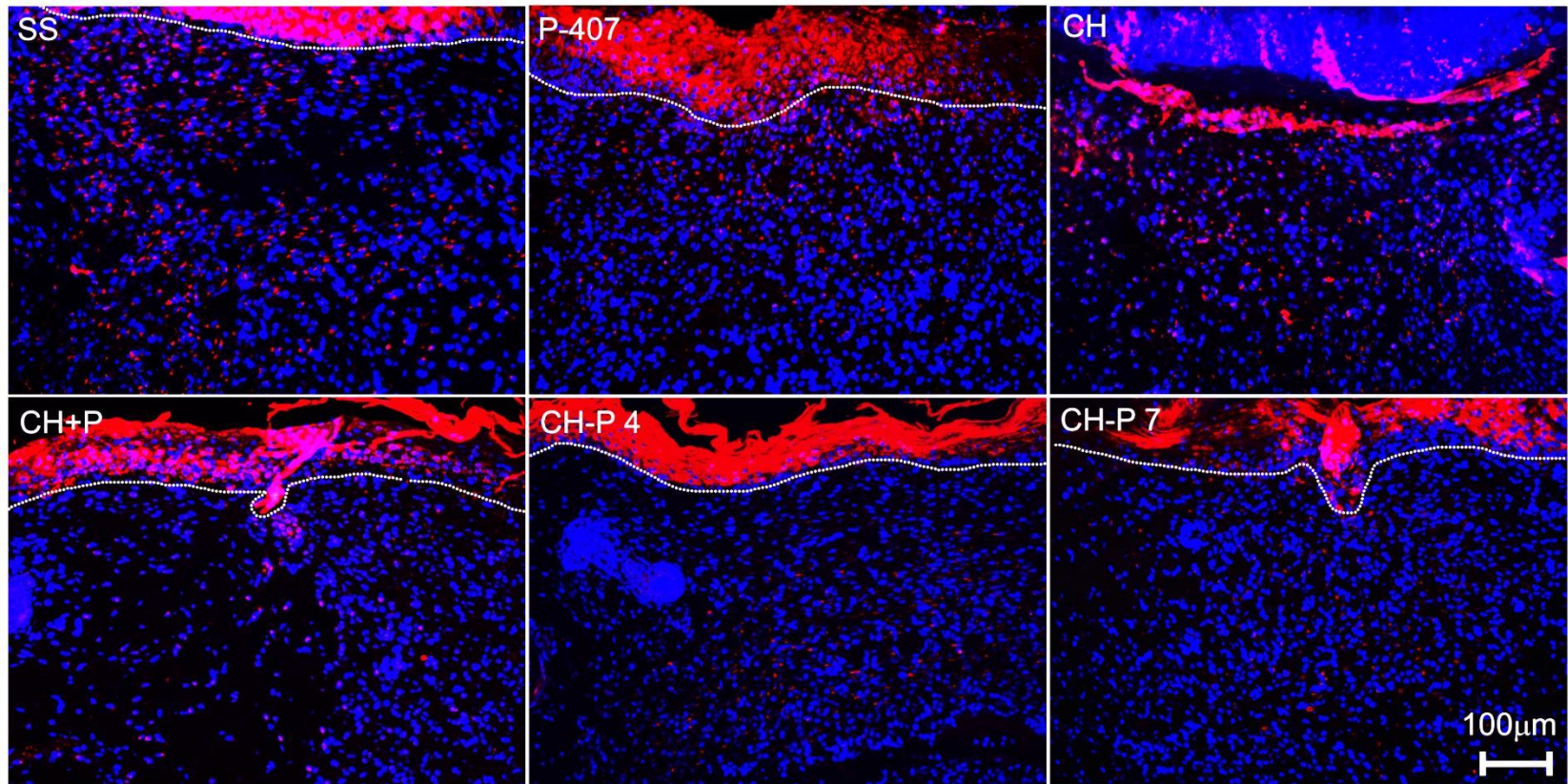


Figura 73. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona superficial de la herida al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. El número de neutrófilos presenta niveles elevados a este día, lo que significa que la fase inflamatoria es persistente. Las heridas tratadas con CH muestran un mayor reclutamiento de neutrófilos en comparación con los otros grupos en estudio.

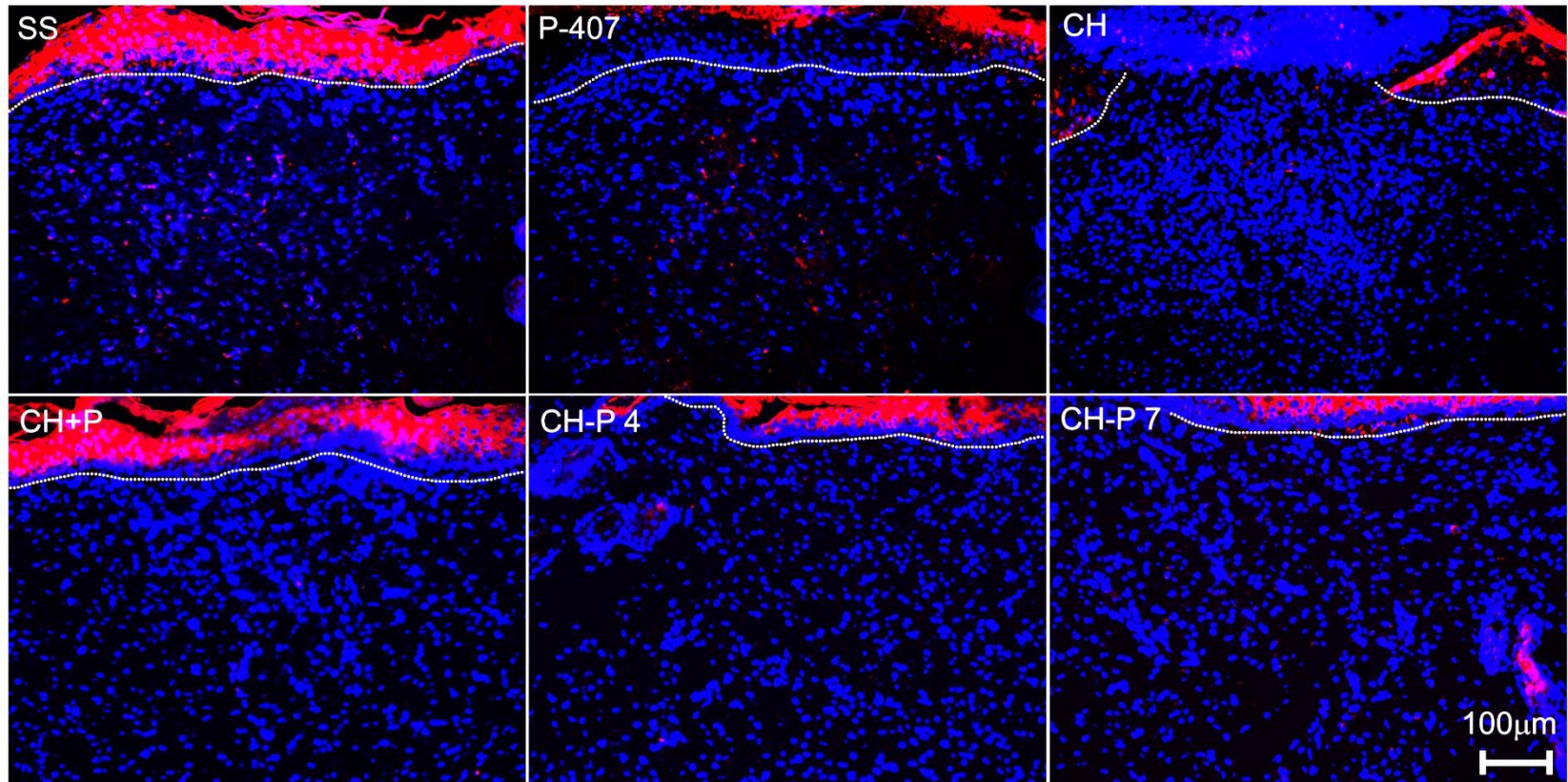


Figura 74. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-Elastasa de la zona superficial de la herida al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. El número de neutrófilos presenta niveles considerables a este día, lo que significa que la fase inflamatoria es persistente. No se observan diferencias evidentes entre los tratamientos.

38.2. Inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de macrófagos

Se realizó esta prueba de inmunofluorescencia (Anti-F4/80) para analizar el infiltrado de macrófagos y determinar el efecto que los hidrogeles pudieran llegar a tener sobre estas células. Los macrófagos forman parte del infiltrado inflamatorio y son reclutados a la zona de la herida predominantemente entre las 48 a 72 horas, su principal función es fagocitar bacterias y otros microorganismos, y además participan en la última etapa de la fase inflamatoria, regulando la transición a la fase de proliferación y de remodelación, por la secreción de factores de crecimiento clave para la progresión de dichas etapas.

En general, al día tres el infiltrado de macrófagos es bajo en todos los casos, siendo las heridas tratadas con CH y P-407 las que presentan el mayor número de macrófagos en comparación con los otros tratamientos (Fig. 75). Estas células predominan a las 72 horas (día 3), por lo tanto, se esperaba que el número de macrófagos fuera mayor a este día; sin embargo, eso no fue lo que se observó. Esta disminución puede estar relacionada a la presencia de neutrófilos que sugiere una fase inflamatoria aguda persistente, lo que además coincide con las histologías, en donde al día 3 aún no hay formación del tejido de granulación y continúa la matriz temporal de fibrina.

Al día siete, se incrementó de forma notable el reclutamiento de estas células, principalmente en las heridas que fueron tratadas con CH, CH+P, CH-P 4 y CH-P 7; de las cuales, las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados, son las que presentan el mayor número de macrófagos (Fig 76 día 7 y Fig. 85) con una diferencia evidente al compararlas con el grupo control (SS), en donde el grupo tratado con el hidrogel CH-P 7, muestra una diferencia que es estadísticamente significativa (Fig. 85). Estos resultados sugieren que la actividad de reclutamiento de macrófagos está dada por el CH, tal como se ha visto en estudios en donde este compuesto estimula su quimiotaxis [163], y que además este efecto no se pierde después de que el compuesto se expone a irradiación Gamma.

Estas células, que pueden llegar a permanecer por días a semanas en la zona de lesión, se encargan de regular la transición a la fase de proliferación mediante la liberación de factores de crecimiento importantes, por esta razón, al día 7, el número de macrófagos es mayor y es posible observar la formación del tejido de granulación en

todas las histologías, a excepción del grupo tratado con SS, el cual a su vez presenta un menor número de macrófagos.

Finalmente, para el día 11, el infiltrado de macrófagos aumentó de forma significativa con respecto al día 3, en las heridas del grupo control, P-407 y CH; mientras que en las heridas tratadas con la mezcla de ambos polímeros (CH+P, CH-P 4 y CH-P 7), el número de estas células se mantuvo, siendo ligeramente mayor que en el grupo control (Fig. 85). La presencia de macrófagos a este día está relacionado con la regulación de la transición a la fase de remodelación, e histológicamente es posible observar que la mayoría de las heridas se encuentran en el inicio de esta última fase. Al ser similar el número de macrófagos presentes en la zona de lesión en todos los tratamientos (excepto el CH), se puede decir, que los hidrogeles irradiados ya no tienen un efecto evidente sobre estas células a los 11 días. Por otro lado, las heridas tratadas con CH, presentan el mayor reclutamiento de macrófagos a este día con un incremento significativo al del día 3 (Fig. 85), que es congruente con lo que se muestra en las histologías al día 11 para las heridas a las que se les aplicó CH, en donde aún persiste la fase de proliferación con un evidente tejido de granulación y poco recambio de matriz. Con base a lo observado en esta inmunofluorescencia, y en la inmunofluorescencia para analizar el infiltrado de neutrófilos, se puede decir que el CH puede inducir una respuesta inflamatoria, al mostrar un mayor reclutamiento de neutrófilos y macrófagos.

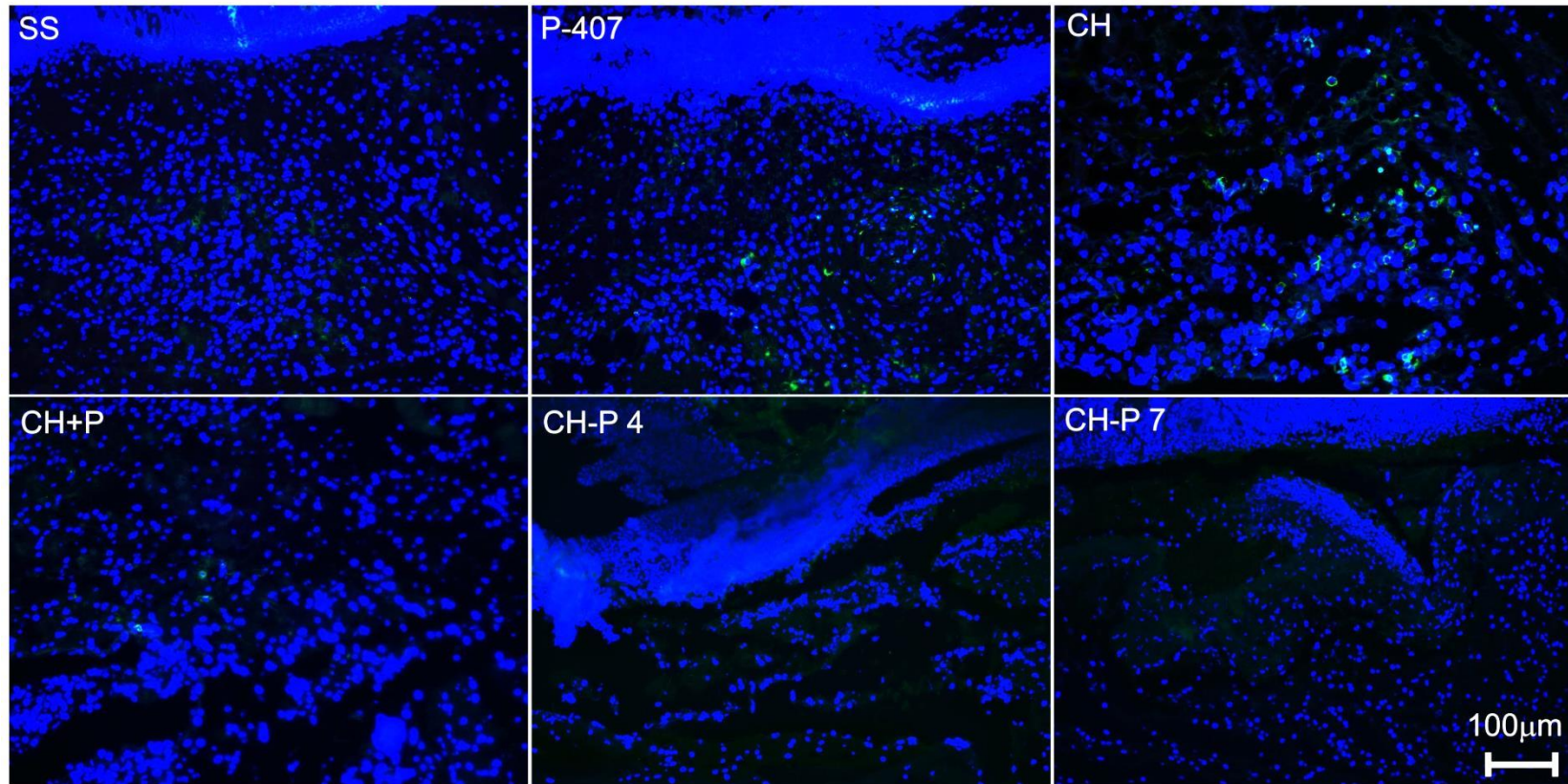


Figura 75. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x. Se observa un reclutamiento escaso de macrófagos en todos los tratamientos; sin embargo, es ligeramente mayor en las heridas tratadas con CH y P407.

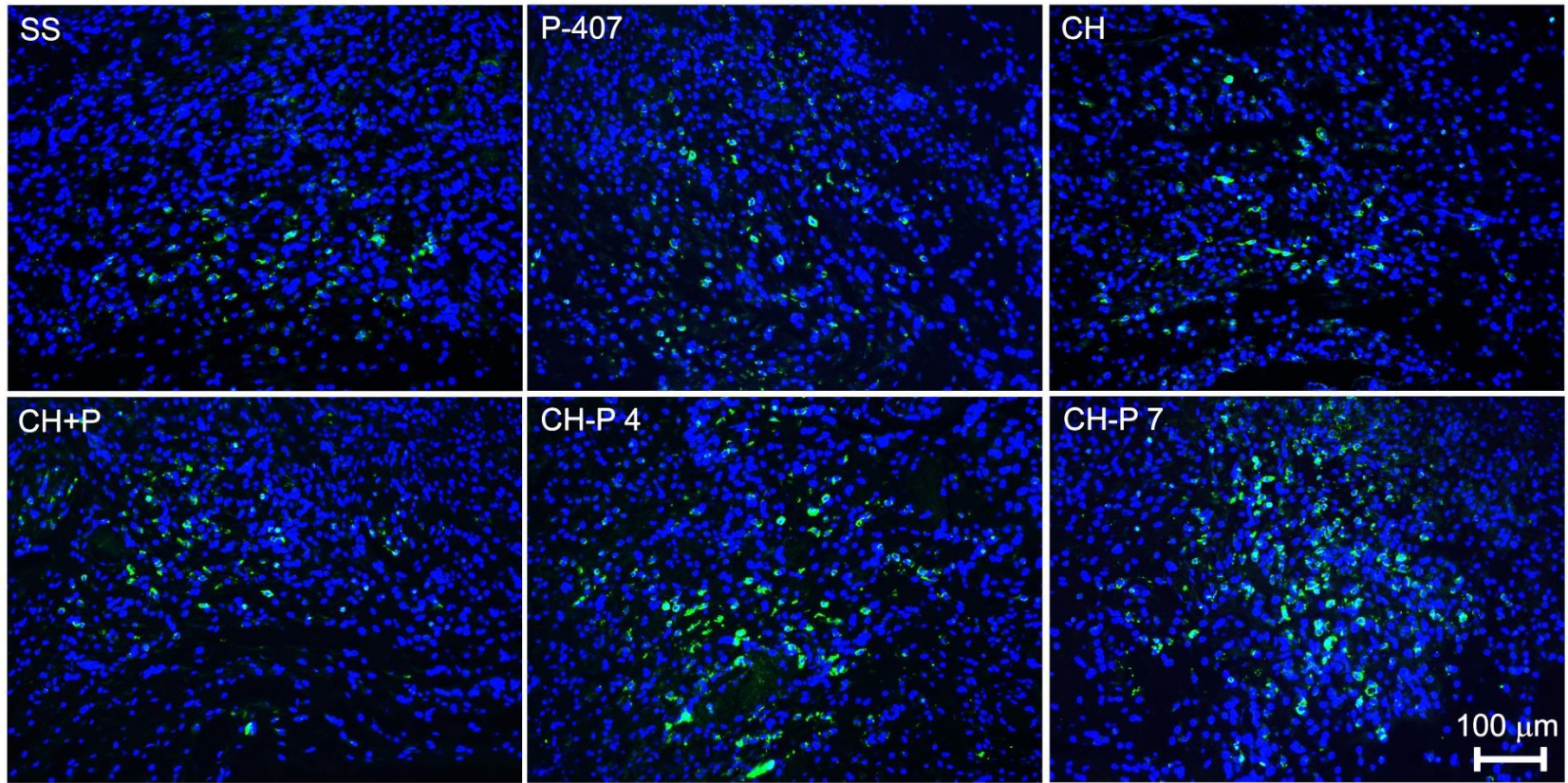


Figura 76. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x. El infiltrado de macrófagos en la zona de la herida se incrementa de forma notable en todos los tratamientos del día 3 al día 7. Las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados, CH y CH+P muestran un mayor reclutamiento de macrófagos en comparación con los otros grupos en estudio.

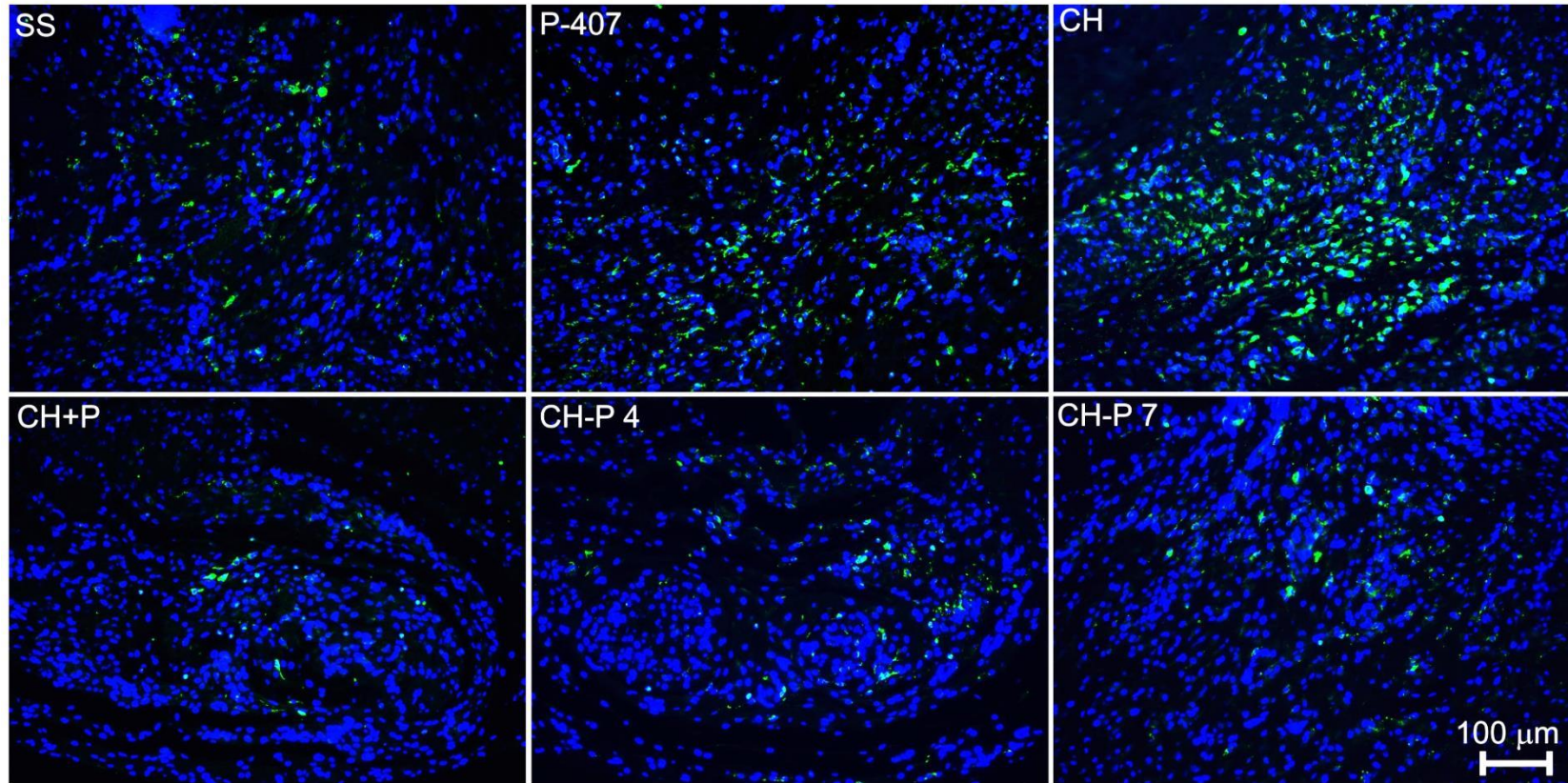


Figura 77. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-F4/80 de la región profunda de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x . El infiltrado de macrófagos se incrementó en las heridas tratadas con SS, P-407 y CH, siendo en este último mayor que en cualquier otro tratamiento; mientras que en los grupos tratados con CH+P, CH-P 4 y CH-P 7 el número de macrófagos se mantuvo similar al del día 7.

38.3. Inmunofluorescencia para analizar la expresión de α -SMA

Se realizó esta prueba de inmunofluorescencia (Anti- α SMA) para observar fibroblastos activados, también conocidos como miofibroblastos, y determinar el efecto que los hidrogeles pudieran llegar a tener sobre estas células con actividad contráctil.

Al día 3 no se observa expresión de α -SMA que pudiera estar relacionada con la presencia de fibroblastos activados en la zona de lesión, la marca positiva se puede atribuir a formación de nuevos vasos sanguíneos (Fig. 78 y 86 día 3), los cuales presentan células de músculo liso que expresan α -SMA. Al día 7 hay una expresión evidente de α -SMA en la región superficial de los bordes de la herida independiente a la de los vasos sanguíneos. ***Las heridas tratadas con CH y CH+P presentan niveles de expresión más bajos que el grupo control (SS), mientras que los grupos tratados con los hidrogeles irradiados muestran mayor expresión (Fig. 86 día 7), lo que significa que hay una mayor actividad contráctil ejercida por estas células en estas heridas.*** Por último, al día 11 se observa una disminución evidente en la expresión de α -SMA en todos los grupos, excepto en las heridas tratadas con P-407 y CH, en donde en el primero, aún persiste la expresión de α -SMA, y en el segundo, los niveles se mantuvieron similares con respecto al día 7 (Fig. 86 día 11).

Los fibroblastos activados aparecen en el área de la herida a partir del cuarto día después de la lesión [14], por esta razón no se esperaba expresión de α -SMA al día 3, lo que es consistente con lo observado en las inmunofluorescencias realizadas; por el contrario, al día 7 sí se esperaban niveles elevados de expresión que se corresponden con el cambio de fenotipo de los fibroblastos que inician la contracción de la herida. ***La presencia de un mayor número de fibroblastos activados en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados, podría sugerir que estos favorecerían el cierre de las heridas, primordialmente por contracción, mientras que los otros tratamientos podrían promover otros mecanismos alternos, tal como la reepitelización y la formación del tejido de granulación en tiempos posteriores al día 7, como sugieren los análisis histológicos; así como una mayor deposición de fibras de colágena, por esta razón, al día 7 es posible observar fibras de colágena tipo I en la tinción de Herovici en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados en donde se presenta la mayor área marcada por α -SMA, sugiriendo una fase de remodelación temprana.***

Existe una relación entre un mayor número de macrófagos y niveles de expresión de α -SMA elevados en los hidrogeles irradiados. Los fibroblastos comienzan a infiltrarse en la herida durante la formación de tejido de granulación y están involucrados en varios procesos de la cicatrización de la herida: contribuir a la formación de tejido de granulación, producir citocinas que favorecen la proliferación y la migración de queratinocitos, y finalmente diferenciarse a fibroblastos activados que expresan α -SMA para promover el cierre de heridas; este último evento está regulado por una molécula producida por los macrófagos: TGF- β_1 . Cuando un fibroblasto es estimulado por TGF- β_1 , se activa un factor de transcripción que promueve la expresión de genes contráctiles. La expresión de estos genes provoca cambios en el citoesqueleto, y en última instancia, la diferenciación a miofibroblastos y el desarrollo de la función contráctil [164]. Por lo tanto, al haber un mayor número de macrófagos que producen TGF- β_1 se promueve una activación temprana de los fibroblastos, resultando en un mayor depósito de colágena I y en una maduración acelerada de la herida.

Este argumento podría ser completamente cierto si esta relación también existiera para las heridas tratadas con CH y CH+P, en donde al día 7 se observa un gran número de macrófagos; sin embargo, no hay niveles elevados de expresión de α -SMA. Esto podría deberse a que existen varias subpoblaciones de macrófagos: los macrófagos activados por agentes microbianos y citocinas conocidos como macrófagos M1 y los moduladores de la inflamación denominados macrófagos M2. Los macrófagos M1 producen un importante nivel de óxido nítrico (NO) y citocinas proinflamatorias, por otro lado, los macrófagos M2 son una población mucho más heterogénea compuesto por todos los macrófagos que no corresponden a las características de los M1, en donde existe un subgrupo, los macrófagos desactivados o M2c, que son capaces de controlar la inflamación y están implicados en la remodelación tisular [29]. Los resultados sugieren que el CH, presente en igual concentración en la mezcla sin irradiar, favorecería la quimiotaxis de macrófagos M1, mientras que los hidrogeles irradiados promueven la quimiotaxis de macrófagos M1 y M2c, siendo estos últimos los que activan a los fibroblastos. Esto podría confirmarse realizando una inmunofluorescencia que fuera específica para esta subpoblación de macrófagos y una inmunofluorescencia para TGF- β_1 que confirme la vía de señalización.

Adicionalmente, la heridas que presentaron el menor porcentaje de cierre fueron a las que se les aplicó CH, esto pudiera estar relacionado con un menor número de miofibroblastos en la zona lesionada provocando una disminución en la tasa de contracción y en consecuencia un menor cierre de la herida como se muestra en la figura 61.

Finalmente al día 11 hay una disminución de la expresión de la actina porque el número de fibroblastos activados en el sitio de lesión se reduce debido a que la actividad contráctil de estas células se termina cuando el tejido está completamente reepitelizado [40]. La marca positiva que se observa en los grupos de P-407 y CH se debe a la expresión de α -SMA por fibroblastos activados en las heridas que de acuerdo a las histologías aún no han reepitelizado.

En resumen, los hidrogeles irradiados promueven un mayor reclutamiento de macrófagos, probablemente de macrófagos M2c, que se mantiene hasta los 11 días; los cuales liberan TGF- β_1 promoviendo la activación temprana de los fibroblastos con un cambio en su fenotipo por células contráctiles, resultando en un mayor depósito de colágena tipo I y en una maduración acelerada de la herida.

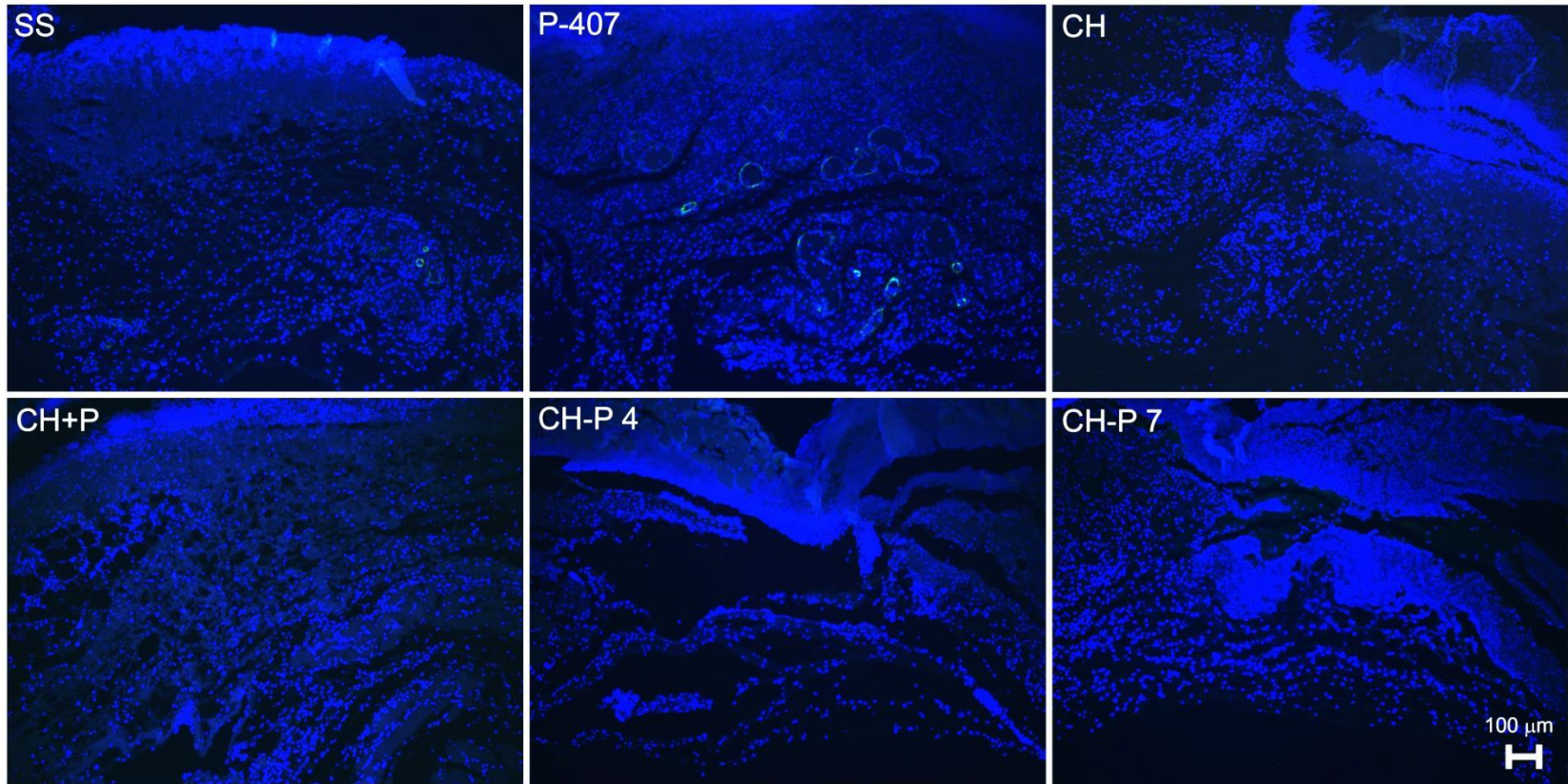


Figura 78. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 10x. No se observa expresión de α -SMA que esté relacionada con fibroblastos activados en ninguno de los grupos estudiados.

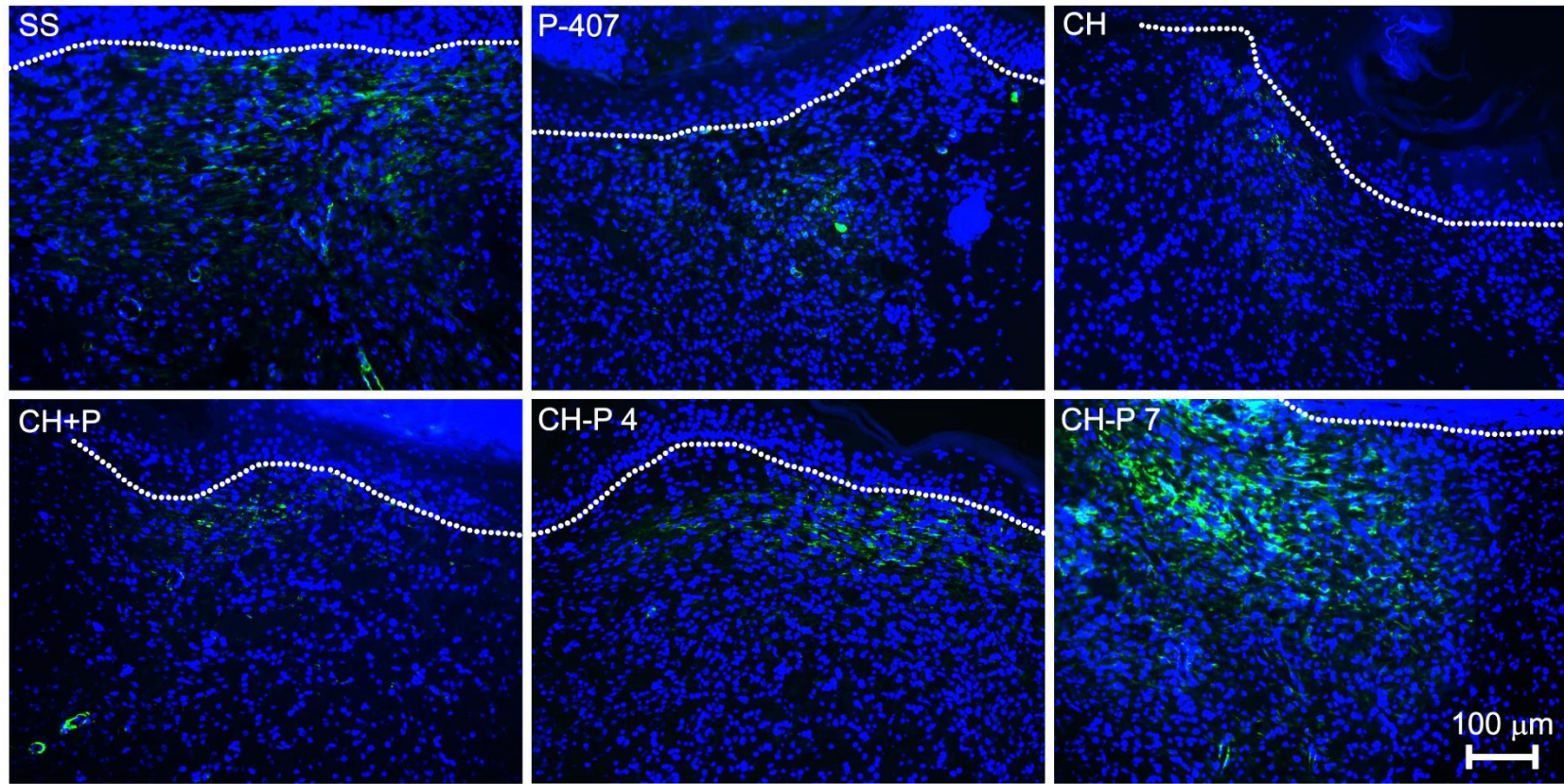


Figura 79. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de la región superficial de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. Se observa expresión de α -SMA en la región superficial de los bordes de herida. La expresión de α -SMA fue mayor en los grupos tratados con los hidrogeles irradiados, mientras que las heridas que recibieron CH y CH+P presentan el menor nivel de expresión.

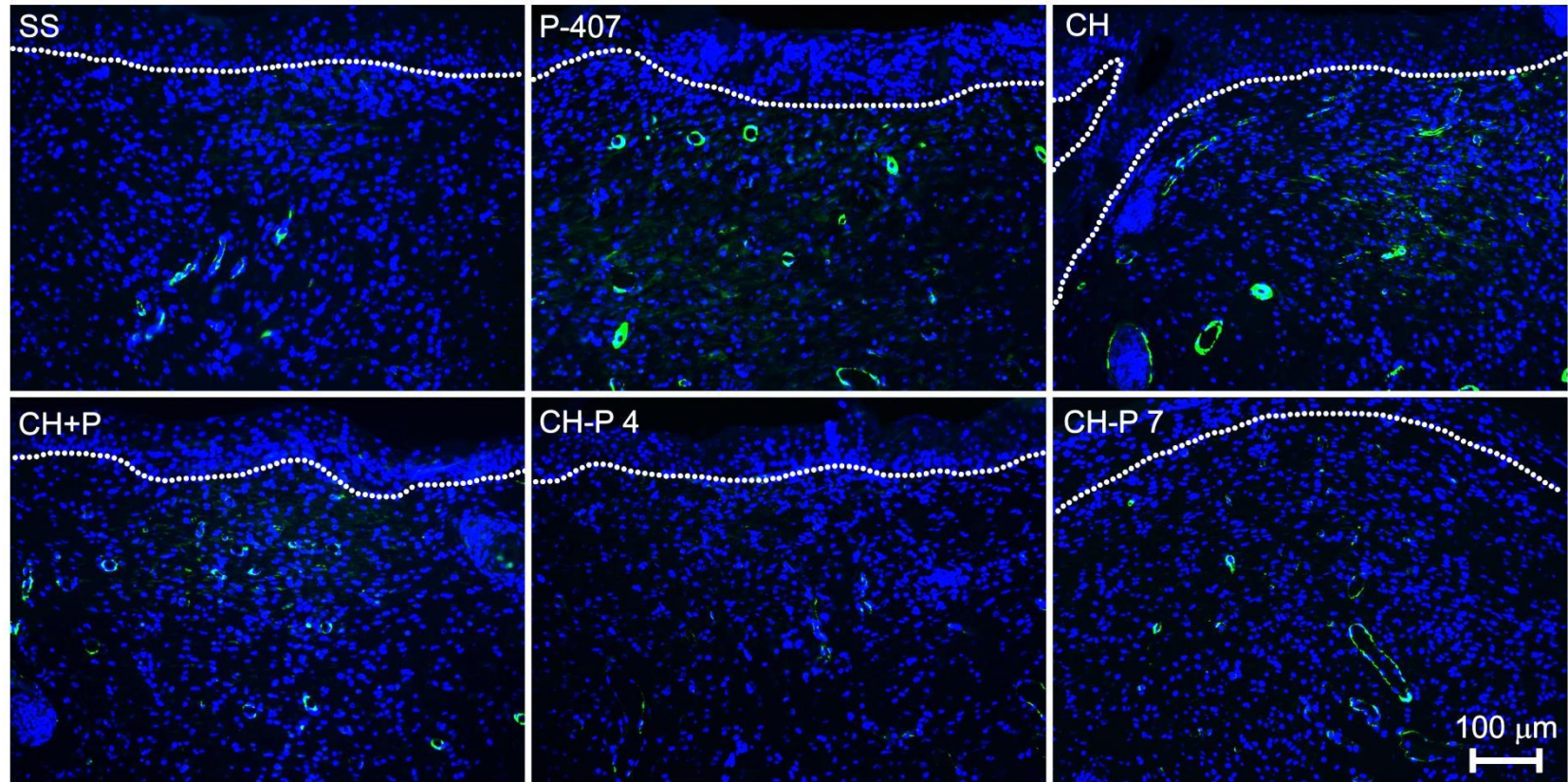


Figura 80. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti- α SMA de la región superficial de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. La expresión de α -SMA disminuyó en todos los casos, excepto para el grupo tratado con CH, en donde la expresión se mantuvo similar con respecto al día 7.

38.4. Inmunofluorescencia para analizar la expresión de TGF-β₃

Se realizó esta prueba de inmunofluorescencia para estudiar la expresión de TGF-β₃ y determinar si los hidrogeles modifican la expresión de este factor que pudiera sugerir una resolución de alta calidad de la herida. Esto debido a que se ha observado que en heridas con mínima o ninguna formación de cicatriz, hay un aumento significativo en la proporción de TGF-β₃ [36].

La figura 87 muestra que no hay diferencias evidentes en la expresión de TGF-β₃ entre los tratamientos y los días, y que la variación que se observa es únicamente la que existe entre cada ratón. En el proceso normal de cicatrización, este factor se expresa en fases tempranas y es necesario para el cierre de heridas *in vivo* [165], es por esta razón que se muestran niveles de expresión de este factor en estos días. Por otro lado, se ha reportado que niveles elevados de TGF-β₃ en heridas reduce la deposición de colágena tipo I mediante la restricción de la diferenciación de los miofibroblastos y la promoción de la degradación del colágeno por MMPs [36]. Todo ello conduce a la disminución de la formación de cicatrices. Durante los tiempos analizados de las histologías, no se observó que los tratamientos presentaran una mejor resolución de la cicatriz, por lo tanto, se esperaba que los niveles de TGF-β₃ fueran similares a los del grupo control, tal como se observa en los resultados. ***Además, al haber un mayor número de fibroblastos activados y depósito de colágena en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados, es congruente que no haya niveles de expresión elevados para este factor sabiendo que restringe la activación de estas células, situación que es congruente con lo que se observa al día 3, en donde los niveles del factor son ligeramente menores para el grupo al que le aplicó el hidrogel CH-P 7.*** Únicamente se observa que al día 7 el grupo al que se le aplicó el P-407 mostró niveles elevados del factor, los cuales disminuyen al día 11, aunque histológicamente no se encontraron diferencias que sugieran una resolución óptima de alta calidad de la herida; sin embargo, un análisis en días posteriores al día 11, podría confirmar o rechazar dicha hipótesis.

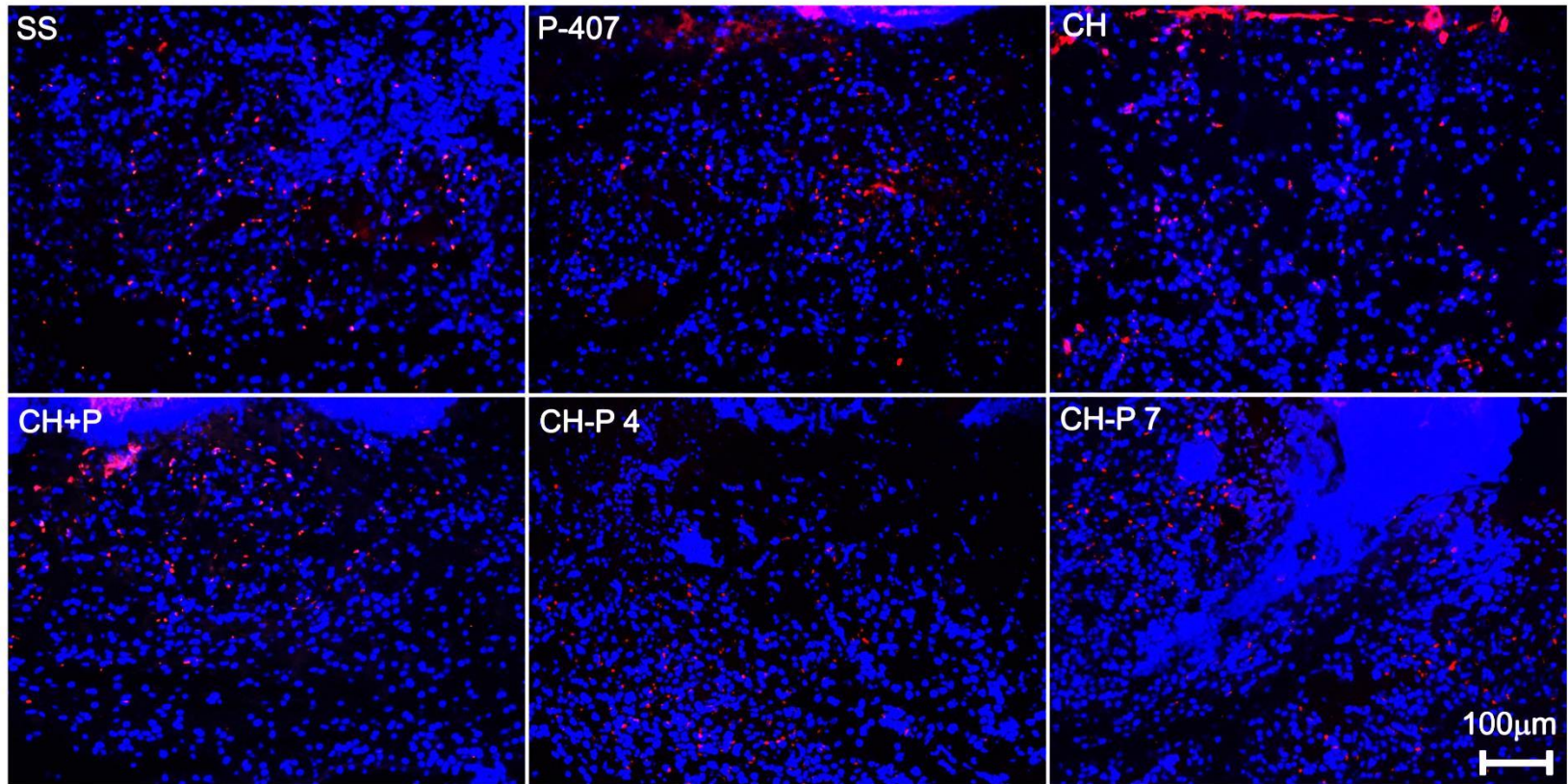


Figura 81. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF-β₃ de las heridas al día 3 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x. Las heridas tratadas con SS y P-407 presentan ligeramente una mayor expresión de TGF-β₃.

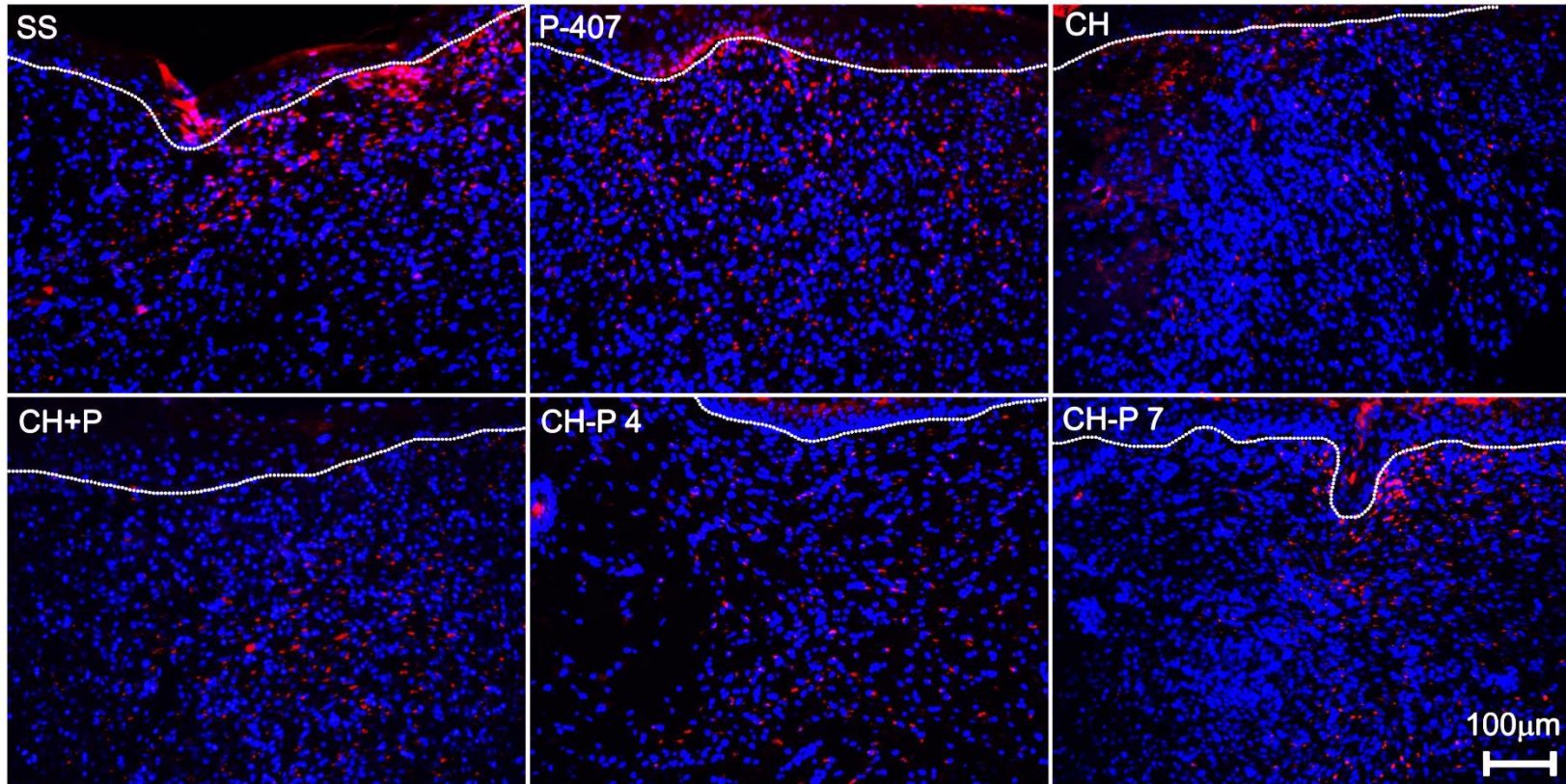


Figura 82. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF- β_3 de la región superficial de las heridas al día 7 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. Las heridas tratadas P-407 presentan ligeramente mayor expresión de TGF- β_3 .

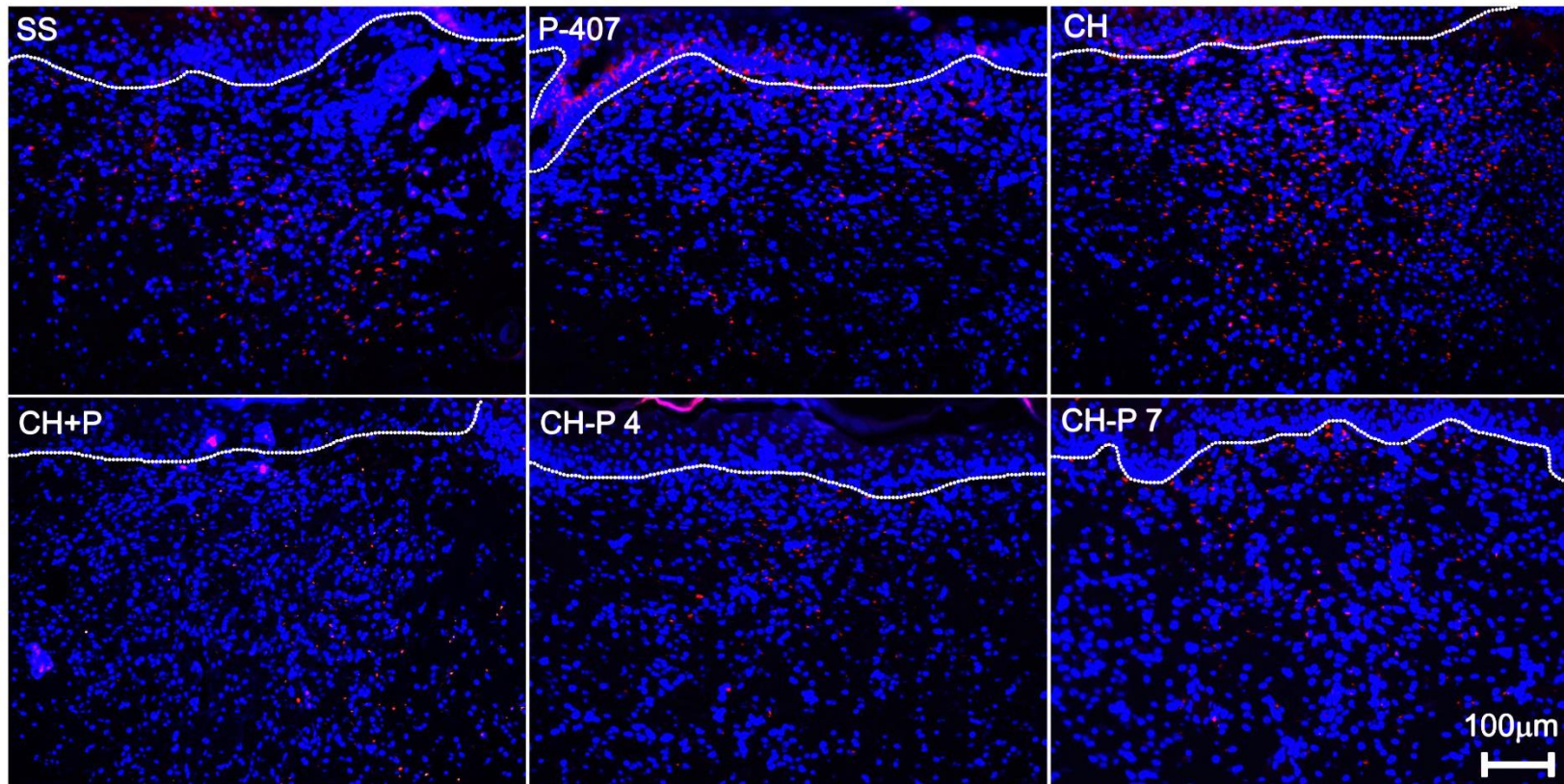


Figura 83. Fotografías de la inmunofluorescencia Anti-TGF- β_3 de la región superficial de las heridas al día 11 de cada tratamiento tomadas con el objetivo 20x, la línea blanca separa al epitelio de neoformación de la zona de reparación. Las heridas tratadas P-407 presentan menor expresión de TGF- β_3 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inmunofluorescencia: Cuantificación utilizando el programa Fiji

38.5. Resultados de la cuantificación de la marca positiva para los diferentes anticuerpos empleados en las pruebas de inmunofluorescencia utilizando el programa Fiji Is just ImageJ

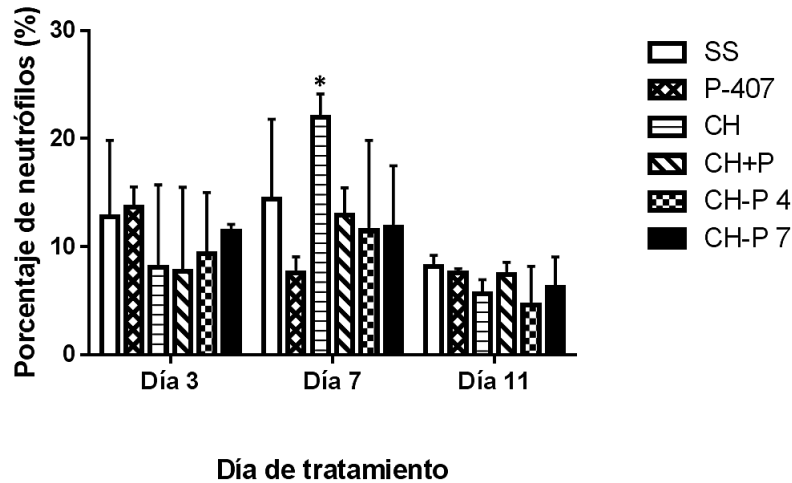


Figura 84. Porcentaje de neutrófilos presentes en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11, con respecto al número de células totales presentes. Cuantificación realizada utilizando el programa Fiji Is just ImageJ (*Día 7: P-407/CH, $P=0.0436$)[†].

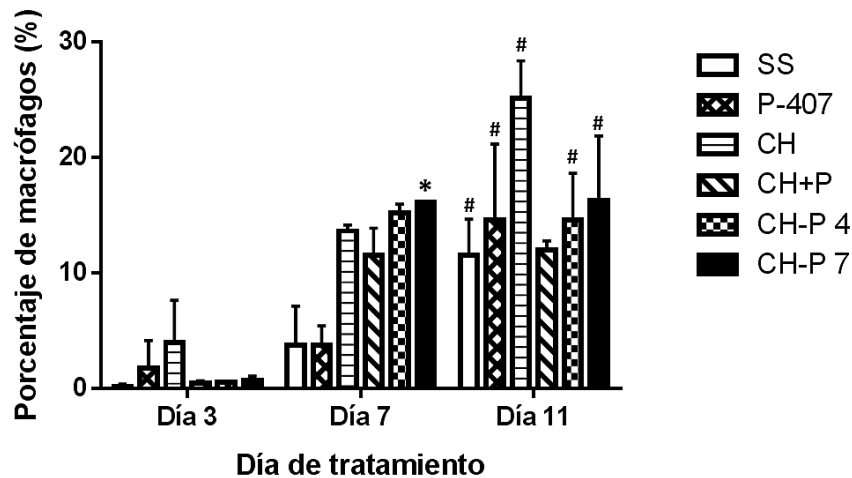


Figura 85. Porcentaje de macrófagos presentes en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11, con respecto al número de células totales presentes. Cuantificación realizada utilizando el programa Fiji Is just ImageJ (*Día 7: SS/CH-P 7, $P=0.0727$; #SS: Día3/Día11, $P=0.0107$; #CH: Día3/Día11, $P=0.0107$; #CH-P 4: Día3/Día11, $P=0.0918$; #CH-P 7: Día3/Día11, $P=0.0908$;) [†].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Immunofluorescencia: Cuantificación utilizando el programa Fiji

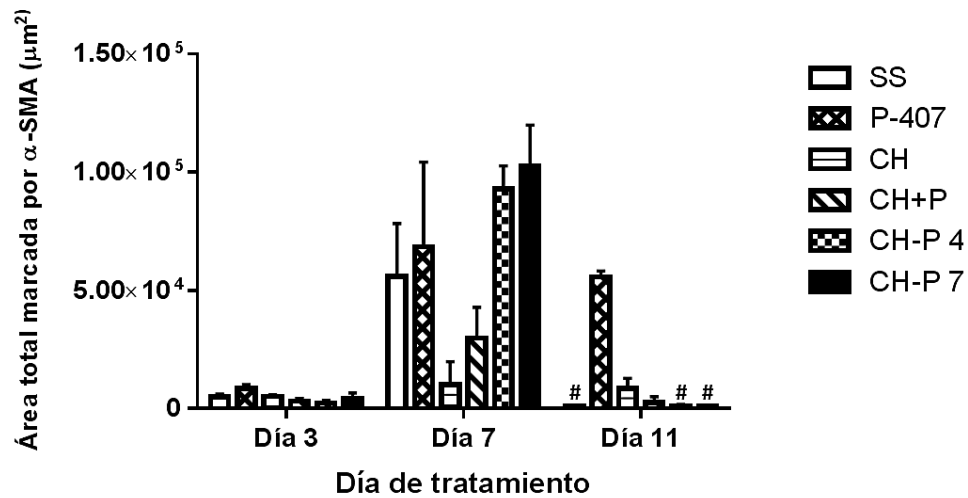


Figura 86. Área total positiva para α -SMA de las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11. Cuantificación realizada utilizando el programa Fiji Is just ImageJ (#SS: Día7/Día11, $P=0.0714$; #CH-P 4: Día7/Día11, $P=0.0229$; #CH-P 7: Día7/Día11, $P=0.0286$)[†].

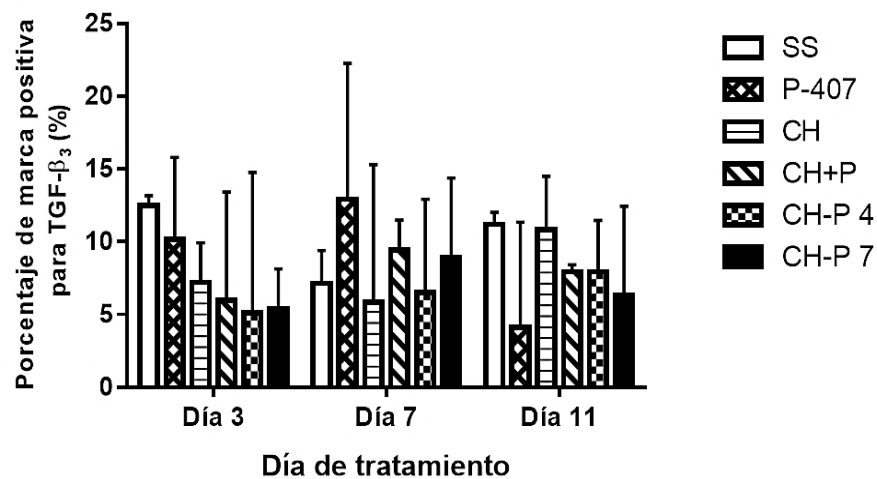


Figura 87. Porcentaje de expresión de TGF- β_3 en las heridas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 11, con respecto al número de células totales presentes. Cuantificación realizada utilizando el programa Fiji Is just ImageJ ($P > 0.05$)[†].

[†] ANOVA no paramétrica realizada utilizando el programa GraphPad Prism6, $\alpha=0.1$ (ver anexo IV)

Finalmente es importante señalar que en todas las pruebas de inmunofluorescencia se observa que la variación entre los ratones de un mismo grupo es grande, por lo tanto, para poder realizar pruebas estadísticas que permitan llegar a una conclusión definitiva, es necesario hacer la evaluación en un mayor número de ratones, o utilizar un método más preciso.

VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron mediante un método fácil, una serie de compuestos, a base de Poloxámero 407-Quitosano, cuatro de ellos hidrogeles, de los cuales dos fueron expuestos a irradiación gamma con el fin de provocar el entrecruzamiento de los polímeros y potenciar sus propiedades farmacéuticas para el cierre de heridas; adicionalmente a uno de ellos se le ajustó el pH a 7 para que al momento de su aplicación no origine molestias ocasionadas por un pH ácido y pueda utilizarse en un futuro como un vehículo de fármacos que promuevan la cicatrización

Mediante el análisis de caracterización fisicoquímica se determinó que la irradiación en el hidrogel:

- Cambia su morfología, sugiriendo un cambio en su estructura.
- Mantiene la característica de la termorreversibilidad inversa, lo cual hace que a temperaturas bajas se encuentre en forma de sol y a una temperatura cercana a la corporal ya se forme un hidrogel, haciendo posible una aplicación tópica.
- Hace posible el ajuste a un pH neutro sin presentar un fenómeno de precipitación, evitando molestias a la hora de su aplicación y daño en las heridas debido a pH ácidos o básicos.
- Disminuye los valores de la entalpía y punto de fusión, sugiriendo que además de un entrecruzamiento hay una escisión de las cadenas poliméricas.
- Aumenta el tiempo y temperatura para su gelificación, sin embargo el hidrogel continúa formándose rápidamente y a temperaturas menores a 37°C.
- Elimina fenómeno de la tixotropía, permitiendo que el hidrogel recupere su estructura inicial después de aplicar un esfuerzo cortante y cesar dicho esfuerzo.
- No altera su comportamiento de liberación de agua en atmósferas de 20 a 90% de HR y mejora sus propiedades de hinchamiento,

CONCLUSIONES

proporcionando un entorno húmedo propicio para la reparación de heridas.

- No elimina, ni potencia las actividades antimicrobianas/antifúngicas, presentando una de las características de los apósitos ideales.

Conjuntamente a las características conferidas por la irradiación gamma, la adición de TEA para ajustar el pH:

- Modifica el tiempo y temperatura de gelificación disminuyéndolo, haciendo que el gel se forme de una manera más rápida.
- No modifica la actividad antimicrobiana, pero si elimina la actividad antimicótica.

Además se evaluó su actividad biológica en un modelo de herida excisional de espesor total en ratones de la cepa CD1 sin presentar cambios evidentes en el peso de los animales que pudieran sugerir alteraciones patológicas.

Se determinó mediante la medición del porcentaje del cierre de heridas que:

- Al día 3 el grupo tratado con el hidrogel irradiado a pH 7 presenta un mayor porcentaje de cierre.
- Al día 7 el grupo tratado con la solución de CH muestra un retraso en el cierre de las heridas, mientras que en los otros tratamientos no se observan diferencias
- Finalmente, al día 11, el cierre para los distintos tratamientos es similar.

Por medio de las tinciones histológicas H&E, Tricrómica de Masson y Herovici, se encontró que:

- Al día 3, la matriz es menos abundante en las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados.
- Al día 7 se observa tejido de granulación y síntesis de colágena tipo I en las heridas tratados con los hidrogeles irradiados; además a este día las heridas ya están completamente reepitelizadas, a excepción

CONCLUSIONES

las que fueron tratadas con CH, en donde se observa un retraso en la reparación.

- Al día 11 se muestra un recambio de matriz evidente en todas las heridas.

Las pruebas de inmunofluorescencia mostraron que:

- No hay diferencias evidentes en el reclutamiento de neutrófilos entre los tratamientos que indiquen que los hidrogeles en estudio generen una respuesta inflamatoria mayor a la que se produce originalmente por la lesión.
- Las heridas tratadas con los hidrogeles irradiados presentan un mayor número de macrófagos que se mantiene hasta los 11 días y una activación temprana de los fibroblastos, sugiriendo que los hidrogeles irradiados promueven un mayor reclutamiento de macrófagos, probablemente de macrófagos M2c; los cuales liberan TGF- β_1 , promoviendo la activación de los fibroblastos con un cambio en su fenotipo por células contráctiles, resultando en un mayor depósito de colágena tipo I y en una maduración acelerada de la herida.
- No hay cambios en el patrón de expresión de TGF- β_3 entre el control y los demás tratamientos; lo que sugiere que no hay una reparación de alta calidad de las heridas.

Los resultados obtenidos sugieren que los hidrogeles irradiados, presentan buenas propiedades estructurales, mecánicas, y biológicas que los hacen candidatos para la aplicación como apósitos en heridas y/o vehículo para la administración controlada de fármacos.

IX. PERSPECTIVAS

- 1) Conocer con más detalle las modificaciones que la irradiación provoca en los polímeros, por medio de herramientas de evaluación estructural que proporcionen más información, especialmente, para determinar si la reacción que predomina es la de entrecruzamiento, como por ejemplo, IR, RMN o espectrometría de masas.
- 2) Realizar experimentos con un mayor número de unidades experimentales.
- 3) Dar seguimiento durante todo el tiempo de cicatrización de las heridas, es decir, desde que se realiza la lesión hasta que cierre por completo e histológicamente se observe una cicatriz completamente formada, aumentando el número de días de evaluación.
- 4) Reajustar el tiempo de aplicación de los hidrogeles con el fin de reducir el riesgo de que las heridas vuelvan a abrirse por un exceso de humedad.
- 5) Agregar un fármaco o factor de crecimiento que inhiba la formación de cicatrices y promueva una mejor resolución de la herida. Ejemplo de factores de crecimiento podría ser TGF- β_3 , ya que se sabe que la administración exógena de este factor inhibe la formación de cicatrices. Otro ejemplo es el FGF, en donde se ha observado que su aplicación exógena da como resultado heridas cuyo nuevo epitelio presenta un grosor normal. La ventaja que presentan los hidrogeles que se utilizan como vehículo es que permiten una liberación localizada y prolongada del fármaco, que en el caso de los factores de crecimiento es importante ya que la mayoría posee tiempos de vida terapéutica cortos. No obstante, para hacer factible esto, es necesario realizar primero pruebas de estabilidad del factor de crecimiento en el hidrogel, esto debido a que los factores de crecimiento, al ser de naturaleza proteica, son susceptibles a degradación.

Además se tendría que conocer la dosis efectiva para que la concentración del factor de crecimiento en la formulación ejerza el efecto esperado.

- 6) Efectuar pruebas de inmunofluorescencia adicionales, por ejemplo, utilizando un anticuerpo Anti-TGF β_1 , para confirmar el mecanismo por el cual el hidrogel acelera el cierre de heridas.

X. REFERENCIAS

- [1] B. Gupta, R. Agarwal y M. Alam, «Hydrogels for wound healing applications,» de *Biomedical Hydrogels. Biochemistry, Manufacture and Medical Applications*, 2011, pp. 184-227.
- [2] C. Ghobril y M. W. Grinstaff, «The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial,» *Chemical Society Reviews*, vol. 44, pp. 1820-1835, 2015.
- [3] G. Vela Anaya, A. Aparicio Aguilar, J. Jiménez Sánchez y A. Sánchez Rodríguez, «Características y Costo de la Atención de heridas en Instituciones de primer nivel de Atención un estudio de auditoría financiera para la gestión de clínicas de heridas,» *Revista Chilena de Heridas & Ostomías*, vol. 4, nº 1, pp. 81-83, 2013.
- [4] G. J. Tortora y B. Derrickson, *Principios de Anatomía y Fisiología*, 12 edición ed., John Wiley & Sons, 2009.
- [5] N. Mayet, Y. E. Choonara, P. Kumar, L. K. Tomar, C. Tyagi y L. C. Du Toit, «A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 103, pp. 2211-2230, 2014.
- [6] A. Oláh, A. Gábor y T. Bíró, «The Channel Physiology of the Skin,» *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 163, pp. 65-131, 2012.
- [7] D. B. Hom y E. A. Gantwerker, «Skin: Histology and Physiology of Wound Healing,» *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 19, pp. 441-453, 2011.
- [8] S. Kusuma, R. K. Vuthoori, J. E. Zins y M. Piliang, *Plastic and Reconstructive Surgery*, London: Springer-Verlag, 2010, pp. 161-171.
- [9] R. Arenas, *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*, 4 ed., China: McGraw Hill, 2009, pp. 1-9.
- [10] «Greatest Look,» 2014. [En línea]. Available: <http://www.greatestlook.com/advice/skin.htm>. [Último acceso: 12 Julio 2015].
- [11] K. Vowden y P. Vowden, «Wound dressings: principles and practice,» *Surgery (Oxford)*, vol. 32, nº 9, p. 462-467, 2014.
- [12] S. Hani y P. Satya, «Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review,» *Plastic Surgery International*, pp. 1-7, 2012.

REFERENCIAS

- [13] S. A. Eming, T. Krieg y J. M. Dav, «Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, pp. 514-525, 2007.
- [14] J. Benavides, «Reparación de heridas cutáneas,» *Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, vol. 16, pp. 29-35, 2008.
- [15] J. C. Jaime y D. Gómez, *Hematología. La sangre y sus enfermedades*, 2º ed., México: McGraw Hill, 2009.
- [16] K. Murphy, P. Travers y M. Walport, *Inmunobiología de Janeway*, 7 edición ed., México: McGrawHill, 2007.
- [17] P. Martin, D. D'Souza, J. Martin, R. Grose, L. Cooper, R. Maki y S. R. McKercher, «Wound Healing in the PU.1 Null Mouse-Tissue Repair Is Not Dependent on Inflammatory Cells,» *Current Biology*, vol. 13, p. 1122–1128, 2003.
- [18] C. L. Baum y C. J. Arpey, «Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events,» *Dermatologic Surgery*, vol. 31, pp. 674-686, 2005.
- [19] J. Li, J. Chen y R. Kirsner, «Pathophysiology of acute wound healing,» *Clinics in Dermatology*, vol. 25, pp. 9-18, 2007.
- [20] T. J. Koh y L. A. DiPietro, «Inflammation and wound healing: The role of the macrophage,» *Expert Rev Mol Med.*, vol. 13, pp. 1-14, 2013.
- [21] J. V. Dovi, L.-K. He y L. A. DiPietro, «Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice,» *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 73, pp. 448-455, 2003.
- [22] J. M. Daley, J. S. Reichner, E. J. Maho, M. Laura, W. L. Henry, B. Mastrofrancesco y J. E. Albina, «Modulation of Macrophage Phenotype by Soluble Product(s) Released from Neutrophils,» *The Journal of Immunology*, vol. 174, p. 2265–2272, 2005.
- [23] T. Peters, A. Sindrilaru, B. Hinz, E. A. D. Al-Azzeh, R. Hinrichs, A. Menke, K. Holzwarth, T. Oreshkova, W. Honglin, D. Kess, B. Walzog, S. Sulyok, C. Sunderkotter, W. Friedrich, M. Wlaschek y T. Krieg, «Wound-healing defect of CD18^{-/-} mice due to a decrease in TGF- β 1 and myofibroblast differentiation,» *The EMBO Journal*, pp. 3400-3410, 2005.
- [24] M. Kapoor, T. Nomiyama, D. Bruemmer, F. Kojima y L. Crofford, «Growth Factors and cytokines: Emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis,» *Current Anaesthesia & Critical Care*, vol. 17, pp. 13-20, 2006.
- [25] G. Henry y W. L. Garner, «Inflammatory mediators in wound healing,» *Surgical Clinics of North America*, vol. 83, p. 483–507, 2003.

REFERENCIAS

- [26] S. J. Leibovich y R. Ross, «The Role of the Macrophage in Wound Repair,» *American Journal of Pathology*, pp. 71-92, 1975.
- [27] T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Müller, A. Roers y S. A. Eming, «Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair,» *The Journal of Immunology*, vol. 184, n° 7, pp. 3964-3977, 2010.
- [28] R. Mirza, L. A. DiPietro y T. J. Koh, «Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice,» *The American Journal of Pathology*, vol. 175, n° 6, pp. 2454-2462, 2009.
- [29] M. P. Rodero y K. Khosrotehran, «Skin wound healing modulation by macrophages,» *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, vol. 3, n° 7, pp. 643-653, 2010.
- [30] I. Goren, N. Allmann, N. Yogev, C. Schurmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter y S. Frank, «A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion Effects of Diphtheria Toxin-Driven Lysozyme M-Specific Cell Lineage Ablation on Wound Inflammatory, Angiogenic, and Contractive Processes,» *The American Journal of Pathology*, Vol. 175, No. 1, July 2009, vol. 175, n° 1, pp. 132-147, 2009.
- [31] S. Werner y R. Grose, «Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines,» *Physiological Reviews*, vol. 83, p. 835–870, 2003.
- [32] A. W. Thomson y M. T. Lotze , *The Cytokine Handbook*, 4 ed., vol. 2, Londres: Academic Press Limited, 2003, pp. Sección C, D, E, F, G.
- [33] S. E. Gill y W. C. Parks, «Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing,» *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 40, pp. 1334-1347, 2008.
- [34] A. F. Karamysheva, «Mechanisms of Angiogenesis,» *Biochemistry*, vol. 73, pp. 751-762, 2008.
- [35] M. M. Santoro y G. Gaudino, «Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing,» *Experimental Cell Research*, vol. 304, p. 274–286, 2005.
- [36] M. Pakyari, A. Farrokhi, M. Khosravi Maharlooei y A. Ghahary, «Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing,» *Advances in Wound Care*, vol. 2, n° 5, pp. 215-224, 2013.
- [37] I. A. Darby y T. D. Hewitson, «Fibroblast Differentiation in wound healing and fibrosis,»

- International Review of Cytology*, vol. 257, pp. 143-179, 2007.
- [38] G. Gabbiani, «The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases,» *Journal of Pathology*, vol. 200, pp. 500-503, 2003.
- [39] B. Hinz, «Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, p. 526–537, 2007.
- [40] B. Li y J. H. Wang, «Fibroblasts and myofibroblasts ind wound healing force generation and measurement,» *Journal of Tissue Viability*, vol. 20, pp. 108-120, 2011.
- [41] M. Shah, D. M. Foreman y M. W. J. Ferguson, «Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring,» *Journal of Cell Science*, vol. 108, pp. 985-1002, 1995.
- [42] J. W. Penn, A. O. Grobbelaar y K. J. Rolfe, «The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review,» *Int J Burn Trauma*, vol. 1, pp. 18-28, 2012.
- [43] K. Rolfe y A. Grobbelaar, «A Review of Fetal Scarless Healing,» *International Scholarly Research Network Dermatology*, vol. 2012, pp. 1-9, 2012.
- [44] J. V. Cordeiro y A. Jacinto , «The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing,» *Molecular Cell Biology*, vol. 14, pp. 249-262, 2013.
- [45] J. P. Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*. (Remington Farmacia), 20a ed., vol. 2, A. R. Gennaro, Ed., Ed. Médica Panamericana, 2003, pp. 2217-2221.
- [46] A. Tarig y H. Newton, «Wound dressings: principles and practice,» *Surgery (Oxford)*, vol. 29, nº 10, p. 491–495, 2011.
- [47] N. Romero y E. Domínguez, «Eleccion de apósitos,» *Estar Bien (Revista de la asociación piel de mariposa)*, nº 42, 2012.
- [48] G. Dan Mogosanu y A. Mihai Grumezescu, «Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 463, nº 2, p. 127–136, 2014.
- [49] I. Kim, M. Yoo , J. Seo, S. Park, H. Na, H. Lee, C. Kim y C. Cho, «Evaluation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer for wound dressing application,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 341, nº 1-2, p. 35–43, 2007.
- [50] A. S. Hoffman, «Hydrogels for biomedical applications,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, nº 1, pp. 3-12, 2002.

REFERENCIAS

- [51] N. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. Ward y J. Zhang, «Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in Medicine and Biology.,» *Annual Review of biomedical engineering.*, pp. 9-29, 2000.
- [52] E. Caló y V. V. Khutoryanskiy, «Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products,» *European Polymer Journal*, 2014.
- [53] T. Kojarunchitt, S. Baldursdott, Y.-D. Dong, B. J. Boyd, T. Rades y S. Hook, «Modified thermoresponsive Pluronic 407 and chitosan sol-gels as potential sustained-release vaccine delivery systems,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 89, pp. 74-81, 2015.
- [54] L. Klouda y A. G. Mikos, «Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 68, pp. 34-45, 2008.
- [55] V. Kant, A. Gopal, D. Kumar, A. Gopalkrishnan, N. N. Pathak, N. P. Kurade, S. K. Tandan y D. Kumar, «Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats,» *Acta Histochemica*, vol. 116, pp. 5-13, 2014.
- [56] H. R. Patel, R. P. Patel y M. Patel, «Pluronic: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors,» *International Journal of PharmTech Research*, vol. 1, nº 2, pp. 299-303, 2009.
- [57] A. M. Lizándara Enrich y J. M. Suñé Negre, Catálogo de apósitos estériles modernos, Barcelona: Publicacions Universitat de Barcelona, 2000, pp. 19-21.
- [58] V. Tormo Maicas y I. Julián Rochina , «Cura fisiológica,» [En línea]. Available: http://www.uv.es/curafisiologica/documentos/publicaciones/muestra_web_antisepticos.pdf f. [Último acceso: 2 Junio 2015].
- [59] T. Welch Fossum, Cirugía en pequeños animales, Tercera ed., Madrid: Elsevier Imprint, 2009, p. 170.
- [60] K. Becker y et. al.. [En línea]. Available: http://www.woundsinternational.com/media/issues/468/files/content_9921.pdf. [Último acceso: 2 Junio 2015].
- [61] G. Völgyi, E. Baka, K. J. Box, J. E. Comer y K. Takács-Novák, «Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 673, pp. 40-46, 2010.
- [62] C. Avendaño López, Introducción a la Química Farmacéutica, segunda ed., España: McGraw-Hill, 2001.

REFERENCIAS

- [63] M. d. P. Cañizares Macías y G. A. Duarte Lisci, Fundamentos de química analítica, 2 ed., México: Facultad de Química. UNAM, 2009, p. 300.
- [64] J. Renau-Piqueras y M. Faura. [En línea]. Available: http://ruc.udc.es/bitstream/2183/9313/1/CC-011_art_5.pdf. [Último acceso: 14 Mayo 2014].
- [65] S. Swapp, «Integrating Research and Education,» [En línea]. Available: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html. [Último acceso: 14 Mayo 2015].
- [66] SEM2, «Serveis Tècnics d' investigació,» 04 Noviembre 2012. [En línea]. Available: <http://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/sem-sesion-12-de-noviembre.pdf>. [Último acceso: 14 Mayo 2015].
- [67] DSC1. [En línea]. Available: http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/practicas-2/Practicas_de_DSC.pdf. [Último acceso: 4 Junio 2015].
- [68] A. Sandoval Aldana , E. Rodriguez Sandoval y A. Fernandez Quintero, 15 Octubre 2004. [En línea]. Available: http://unvirtual.medellin.unal.edu.co/pluginfile.php/59895/mod_resource/content/1/Sandoval%20DSC%20en%20almidon.pdf. [Último acceso: 4 Junio 2015].
- [69] S. Suriñach, M. Baro, S. Bordans, N. Clavaguera y M. Clavaguera-Mora, 1992. [En línea]. Available: <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/65456/1/098218.pdf>. [Último acceso: 5 Junio 2015].
- [70] T. Hatakeyama y F. Quinn, Thermal Analysis. Fundamentals and Applications to Polymer Science, Segunda ed., West Sussex: John Wiley & Sons, 1999, pp. 11-12.
- [71] T. M. López Goerne. [En línea]. Available: http://www.labnanomed.org.mx/libro%201/zzz-01_Nanotecnologia.pdf. [Último acceso: 10 Junio 2015].
- [72] A. T. Florence y D. Attwood, Physicochemical Principles of Pharmacy, Fourth Edition ed., London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2006.
- [73] A. Ponton, S. Barboux-Doeuff y C. Sánchez, «Rheology of titanium oxide based gels: determination of gelation time versus temperature,» *Colloids and Surfaces*, vol. 162, pp. 177-192, 1999.
- [74] L. Mayol, F. Quaglia, A. Borzacchiello, L. Ambrosio y M. I. La Rotonda, «A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties,» *European Journal of Pharmaceutics and*

REFERENCIAS

- Biopharmaceutics*, vol. 70, pp. 199-206, 2008.
- [75] B. Jeong, S. Wan Kim y Y. Han Bae, «Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, n° 54, pp. 37-51, 2002.
- [76] E. Ruel-Gariépy y J.-C. Leroux, «In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n° 58, p. 409–426, 2004.
- [77] R. G. Kretser, D. V. Boger y P. J. Scales , «COMPRESSIVE RHEOLOGY : AN OVERVIEW,» 2003.
- [78] F. W. Billmeyer, *Ciencia de los polímeros*, Reverté, S.A., 1975.
- [79] O. Rojas, M. I. Briceño y J. Avendaño, «Fundamentos de Reología,» 2012.
- [80] R. G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, 1998.
- [81] P. J. Sinko y Y. Singh, *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical science*, sixth ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [82] M. Treiser, S. Abramson, R. Langer y J. Kohn, «Degradable and Reasorbable Biomaterials,» de *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, Third ed., Elsevier Inc., 2013, pp. 179-195.
- [83] S. Calne y et, al. , «Identificación de los criterios de infeccion en heridas,» Medical Education Partnership LTD., 2005.
- [84] «Instituto de Salud Pública,» [En línea]. Available: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_suscep.pdf. [Último acceso: 15 Junio 2015].
- [85] S. J. Cavalieri. [En línea]. Available: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=. [Último acceso: 15 Junio 2015].
- [86] D. López Tagle, M. Hernández Ferrer, T. Saldivar Arias, T. Sotolongo Hernández y O. Valdés Dupeyrón, «Infección de la herida quirúrgica. Aspectos epidemiológicos,» *Revista Cubana de Medicina Militar*, vol. 36, n° 2, 2007.
- [87] M. N. Ravi Kumar, «A review of chitin and chitosan applications,» *Reactive & Functional Polymers*, vol. 46, pp. 1-27, 2000.
- [88] T. Dai, M. Tanaka, Y.-Y. Huang y M. R. Hamblin, «Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects,» *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 9, n° 7, p. 857–879, 2011.

REFERENCIAS

- [89] «KEGG Compound,» 01 Octubre 2012. [En línea]. Available: <http://www.genome.jp/kegg/compound/>. [Último acceso: 17 Mayo 2015].
- [90] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. Sudheesh Kumar, S. Nair y H. Tamura, «Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 322-337, 2011.
- [91] R. C. Goy, D. de Britto y O. B. G. Ass, «A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan,» *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 19, nº 3, pp. 241-247, 2009.
- [92] M. Á. Ramírez, A. T. Rodríguez, L. Alfonso y C. Peniche, «Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications,» *Biotecnología Aplicada*, vol. 27, pp. 270-276, 2010.
- [93] K. S. Matsumoto, «Producción de quitina y quitosano,» 2011.
- [94] M. Dash, F. Chiellini, R. Ottenbriteb y E. Chiellini, «Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical,» *Progress in Polymer Science*, vol. 36, p. 981–1014, 2011.
- [95] Y.-W. Cho, J. Jang, C. R. Park y S.-W. Ko, «Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins,» *Biomacromolecules*, vol. 1, pp. 609-614, 2000.
- [96] D. R. Gouda Fouad, Chitosan as an antimicrobial compound: Modes of action and resistance mechanisms, Bonn: Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität, 2008.
- [97] E. A. El-Hefian, E. S. Elgannoudi, A. Mainal y A. H. Yahaya, «Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies,» *Turkish Journal of Chemistry*, pp. 47-56, 2010.
- [98] W. Wang y D. Xu, «Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 16, nº 3, pp. 149-152, 1994.
- [99] S. M. Lim, D. K. Song, S. H. Oh, D. S. Lee-Yoon, E. H. Bae y J. H. Lee, «In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads,» *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 19, nº 4, pp. 453-466, 2008.
- [100] H. Zhang y S. H. Neau, «In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation,» *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1653-1658, 2001.
- [101] C. Chatelet, O. Damour y A. Domard, «Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films,» *Biomaterials*, vol. 22, pp. 261-268, 2001.

REFERENCIAS

- [102] I. Helander, E.-L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades y S. Roller, «Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, p. 235–244, 2001.
- [103] X. F. Liu, Y. L. Guan, D. Z. Yang, Z. Li y K. De Yao, «Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 79, p. 1324–1335, 2001.
- [104] I. Bano, M. A. Ghauri, T. Yasin, Q. Huang y A. D'Souza Palaparathi, «Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol),» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 65, p. 81–88, 2014.
- [105] S. B. Rao y C. P. Sharma, «Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 34, p. 21–28, 1997.
- [106] M. P. Ribeiro, A. Espiga, D. Silva, P. Baptista, J. Henriques, C. Ferreira, J. C. Silva, J. P. Borges, E. Pires, P. Chaves y I. J. Correia, «Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing,» *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, p. 817–824, 2009.
- [107] I. A. Alsarra, «Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 45, p. 16–21, 2009.
- [108] J. Hoon Sung, M.-R. Hwang, J. Oh Kim, J. Hoon Leea, Y. Il Kim, J. Hoon Lee, S. Woo Chang, S. Giu Jin, J. Ae Kim, W. Seok Lyoo, S. Soo Han, S. Kwang Ku, C. Soon Yong y H.-G. Choi, «Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 392, p. 232–240, 2010.
- [109] S. R. Chakavala, N. G. Patel, . N. V. Pate, V. T. Thakkar, K. V. Patel y T. R. Gandhi, «Development and in vivo evaluation of silver sulfadiazine loaded hydrogel consisting polyvinyl alcohol and chitosan for severe burns,» *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 4, pp. 54-56, 2012.
- [110] S. Moein Moghimi y A. Christy Hunter, «Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine,» *Trends in Biotechnology*, vol. 18, n° 10, pp. 412-420, 2000.
- [111] H. Park y K. Park, «Biocompatibility Issues of Implantable Drug Delivery Systems,» *Pharmaceutical Research*, vol. 13, n° 12, pp. 1770-1776, 1996.
- [112] BASF, «Hoja de seguridad. Lutrol* F 127,» BASF. The Chemical Company, 2005.
- [113] M. S. Hamid Akash y K. Rehman, «Recent progress in biomedical applications of

REFERENCIAS

- Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives,» *Journal of Controlled Release*, vol. 209, pp. 120-138, 2015.
- [114] M. Vandenhoute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, E. Mendes y P. Dubruel, «Cross-linkable, thermo-responsive Pluronic, building blocks for biomedical applications: Synthesis and physico-chemical evaluation,» *European Polymer Journal*, vol. 53, pp. 126-138, 2014.
- [115] M. Boodhwani, J. Feng, S. Mieno, B. Ramlawi, N. Sodha, R. Clements y F. W. Sellke, «Effects of purified poloxamer 407 gel on vascular occlusion and the coronary endothelium,» *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, nº 29, pp. 736-741, 2006.
- [116] J. B. Rodgers, S. Friday y W. J. Bochenek, «Absorption and excretion of the hydrophobic surfactant. 14C-Poloxalene 2930, in the rat,» *Drug Metabolism & Disposition*, vol. 12, nº 5, pp. 631-634, 1984.
- [117] A. A. Khan, S. K. Fullerton-Shirey y S. S. Howard, «Easily prepared ruthenium-complex nanomicelle probes for two-photon quantitative imaging of oxygen in aqueous media,» *Royal Society of Chemistry Advances*, vol. 5, pp. 291-300, 2015.
- [118] M. M. Jansen, J. M. Verzijl, D. M. Burger y Y. A. Hekster, «Controlled release of morphine from a poloxamer 407 gel,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 452, pp. 266-269, 2013.
- [119] R. M. Nalbandian, R. L. Henry, K. W. Balko, D. V. Adams y N. R. Neuman, «Pluronic F-127 gel preparations as an artificial skin in the treatment of third degree burns in pigs.,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 21, nº 9, pp. 1135-1148, 1987.
- [120] L. Du, L. Tong, Y. Jin, J. Jia, Y. Liu, C. Su, S. Yu y X. Li, «A multifunctional in situ-forming hydrogel for wound healing,» *Wound Repair and Regeneration*, 2012.
- [121] A. Bhattacharya, «Radiation and industrial polymers,» *Progress in Polymer Science*, vol. 25, p. 371-401, 2000.
- [122] J. Ortega Escalona, «Irradiación Gamma,» 09 Marzo 2015. [En línea]. Available: http://www.inin.gob.mx/Transparencia/irradiacion_gamma.cfm. [Último acceso: 17 Junio 2015].
- [123] F. Jiang, X. Wang, C. He, S. Saricilar y H. Wang, «Mechanical properties of tough hydrogels synthesized with a facile simultaneous radiation polymerization and cross-linking method,» *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 106, p. 7-15, 2015.
- [124] W. Rangel Urrea, «Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares,» [En línea].

REFERENCIAS

- Available: <http://www.inin.gob.mx/>. [Último acceso: 2015].
- [125] A. B. Lugao y S. M. Malmonge, «Use of radiation in the production of hydrogels,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, vol. 185, pp. 37-42, 2001.
- [126] X. Huang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Xu, X. Chenc y S. Wei, «Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing,» *Materials Science and Engineering*, vol. C33, p. 4816–4824, 2013.
- [127] V. Rao, «Radiation processing of polymers. From macro to nano scales,» de *Advances in Polymer Processing*, Firts ed., Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, pp. 402-437.
- [128] A. Henglein, «Crosslinking of polymers in solution under the influence of gamma-Radiation,» *Journal of Polymer Science*, vol. 29, pp. 1852-1858, 1959.
- [129] S. Rouif, «Radiation cross-linked polymers: Recent developments and new applications,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, vol. 236, p. 68–72, 2005.
- [130] A. N. Khodja, M. Mahlous, D. Tahtat, S. Benamer, S. L. Youcef, H. Chader, L. Mouhoub, M. Sedgelmaci, N. Ammib, M. B. Mansouri y S. Mameri, «Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests,» *burns*, vol. 39, p. 98–104, 2013.
- [131] Physical properties of glycerine and its solutions, Glycerine Producers' Association, 1963, p. 28.
- [132] A. Sánchez B, M. Sibaja B, J. Vega-Baudrit y S. Madrigal C, «Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas,» *Revista iberoamericana de Polímeros*, pp. 1-27, 2007.
- [133] Antibodies: Antibody Resource Guide, 3ra edición ed., New Jersey: PeproTech Inc., 2012, pp. 49-51.
- [134] D. Harrington, «Tissue Processing in Histology: Tissue Dehydration,» 2001. [En línea]. Available: https://www.medialabinc.net/spg572641/tissue_dehydration.aspx. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [135] K. Suvarna, C. Layton y J. D. Bancroft, «The hematoxylin and eosin & Connective tissues and stains,» de *Bancroft's Theory and practice of histological techniques*, 7 edición ed., Churchill Livingstone Elsevier, 2013, pp. 173-237.

REFERENCIAS

- [136] P. Held, «Hematoxylin and Eosin Stained Tissue,» 13 Octubre 2014. [En línea]. Available:<http://www.biotek.com/resources/articles/hematoxylin-and-eosin-stained-tissue.html>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [137] A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose y R. Zeller, «Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections,» *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008.
- [138] A. M. P. Fitzgerald, J. J. R. Kirkpatrick, I. T. H. Fool y I. L. Naylor, «Human skin histology as demonstrated by Herovici's stain: a guide for the improvement of dermal substitutes for use with cultured keratinocytes?,» *Burns*, vol. 22, nº 3, pp. 200-202, 1996.
- [139] R. Lillie, R. Tracy, P. Pizzolato, P. Donaldson y C. Reynolds, «Differential Staining of Collagen Types in Paraffin Sections: A Color Change in Degraded Forms,» *Virchows Archive A: Pathological Anatomy and Histology*, vol. 386, pp. 153-159, 1980.
- [140] C. Herovici, «A polychrome stain for differentiating precollagen from collagen,» *Stain Technology*, vol. 38, pp. 204-205, 1963.
- [141] C. Sarasquete y M. Gutiérrez, «New Tetrachromic VOF Stain (Type III-G.S) for Normal and Pathological Fish Tissues,» *European Journal of Histochemistry*, vol. 49, nº 2, pp. 105-114, 2005 .
- [142] C. T. N., «Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, pp. 541-550, 2006.
- [143] J. Schindelin y I. & F. Arganda-Carreras, «Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,» *Nature methods*, vol. 9, nº 7, pp. 676-682, 2012.
- [144] «Anti-F4/80 antibody,» 2015. [En línea]. Available: <http://www.abcam.com/F480-antibody-CIA3-1-ab6640.htm>. [Último acceso: 3 Julio 2015].
- [145] T. K. van den Berg y G. Kraal, «A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction,» *Trends in Immunology*, vol. 26, nº 10, pp. 506-509, 2005.
- [146] S. Gordon , J. Hamann, H.-H. Lin y M. Stacey, «F4/80 and the related adhesion-GPCRs,» *European Journal of Immunology*, vol. 41, p. 2470–2525, 2011.
- [147] M. E. Martínez Pardo, R. Benavides Cantú y H. Carrasco Ábrego, «Efecto de la radiación ionizante en polímeros,» Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 2010.
- [148] W. G. & Co.-Conn., «Triethanolamine Acetate Product Stewardship Summary,» W.R. Grace & Co.-Conn. .
- [149] R. Riva, H. Ragelle, A. de Rieux, N. Duhem, C. Jérôme y V. Préat, «Chitosan and

REFERENCIAS

- Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering,» *Adv Polym Sci*, nº 244, pp. 19-44, 2011.
- [150] I. Yong Kim, M. Kyong Yoo, B. Chol Kim, S. Kwon Kim, H. Chun Lee y C. Su Cho, «Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 38, pp. 51-58, 2006.
- [151] E. A. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin y E.-R. S. Kenawy, «Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers.,» *Arabian Journal of Chemistry*, nº 8, pp. 1-14, 2015.
- [152] A. Nacer Khodja, M. Mahlous, D. Tahtat, S. Benamer y S. Larbi Youcef, «Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests,» *Burns*, nº 39, pp. 98-104, 2013.
- [153] D. S. Jones, A. F. Brown y A. D. Woolfson, «Solute and Solvent Effects on the Thermorheological Properties of Poly(oxyethylene)–Poly(oxypropylene) Block Copolymers: Implications for Pharmaceutical Dosage Form Design,» 2002.
- [154] E. Guibal, «Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review,» *Separation and Purification Technology*, nº 38, pp. 43-74, 2004.
- [155] M. Nazari, M. Kurdi y H. Heerklotz, «Classifying Surfactants with Respect to Their Effect on Lipid Membrane Order,» *Biophysical Journal*, vol. 102, p. 498–506, 2012.
- [156] I. Sebti, A. Martial-Gros, A. Carnet-Pantiez, S. Grelier y V. Coma, «Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination,» *Journal of Food Science*, vol. 70, nº 2, pp. M100-104, 2005.
- [157] A. Pena, N. Silvia Sanchez y M. Calahorra, «Effects of Chitosan on *Candida Albicans*: Conditions for its Antifungal Activity,» *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1-15, 2013.
- [158] G. Winter, «Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig.,» *Nature*, vol. 193, pp. 293-294, 1962.
- [159] D. Okan, K. Woo, E. A. Ayello y R. G. Sibbald, «The Role of Moisture Balance in Wound Healing,» *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 20, pp. 39-53, 2007.
- [160] C. Lim, N. Yaacob, Z. Ismail y A. Halim, «In vitro biocompatibility of chitosan porous skin regenerating templates (PSRTs) using primary human skin keratinocytes,» *Toxicology in Vitro*, vol. 24, p. 721–727, 2010.

REFERENCIAS

- [161] F. Berthod, L. Germain, H. Li, W. Xu, O. Damour y F. A. Auger, «Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice,» *Matrix Biology*, vol. 20, n° 7, p. 463–473, 2001.
- [162] Y. Hong, M. Zhengwei, H. Wang, C. Gao y J. Shen, «Covalently crosslinked chitosan hydrogel formed at neutral pH and body temperature,» *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 79A, n° 4, p. 913–922, 2006.
- [163] G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosio, D. Calabró, B. Avallone y G. Balsamo, «Chitosan-mediated stimulation of macrophage function,» *Biomaterials*, vol. 15, n° 15, pp. 1215-1220, 1994.
- [164] B. J. Crider, G. M. Risinger Jr, C. J. Haaksma y . E. W. Howard, «Myocardin-Related Transcription Factors A and B Are Key Regulators of TGF- β 1-Induced Fibroblast to Myofibroblast Differentiation,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 131, p. 2378–2385, 2011.
- [165] M. Le, R. Naridze, J. Morrison, L. C. Biggs, L. Rhea, B. C. Schutte, V. Kaartinen y M. Dunnwald, «Transforming Growth Factor Beta 3 Is Required for Excisional Wound Repair In Vivo,» *PLOS ONE*, vol. 7, n° 10, pp. 1-10, 2012.
- [166] «Ficha de datos de seguridad,» 7 Noviembre 2015. [En línea]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=es®ion=MX>. [Último acceso: 14 Julio 2015].
- [167] «Chitosan Material Safety Data Sheet,» 2015. [En línea]. Available: <http://www.mbfico.za/productfiles/downloads/Plant-Hormones-and-Resistance/Chitosan/Chitosan-MSDS.pdf>. [Último acceso: 7 Julio 2015].
- [168] «Material Safety Data Sheet,» 2014. [En línea]. Available: http://www.dunghessenviro.com/MSDS/ChitoVan_1pct_MSDS.pdf. [Último acceso: 7 Julio 2015].
- [169] «Overview of Immunohistochemistry,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [170] «Immunohistochemistry,» 2010. [En línea]. Available: <http://www.ptglab.com/Support/TechnicalSupport/LearningCenter/Immunohistochemistry.aspx>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [171] J. W. Lichtman y J.-A. Conchello, «Fluorescence microscopy,» *Nature Methods*, vol. 2, n°

REFERENCIAS

- 12, pp. 910-919, 2005.
- [172] D. E. Wolf, «Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy,» de *Methods in Cell Biology*, vol. 114 Digital Microscopy, Elsevier, 2007, pp. 69-97.
- [173] «The Molecular Probes® Handbook,» 2010. [En línea]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [174] «Texas Red® Data Sheet,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=482>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [175] «Fluorescein (FITC),» 2015. [En línea]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [176] «Alexa Fluor® 488 dye,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-488.html>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [177] «VECTASHIELD® Mounting Media Data Sheet,» Enero 2015. [En línea]. Available: <https://www.vectorlabs.com/data/protocols/H-1200.pdf>. [Último acceso: 2 Julio 2015].
- [178] E. S. & A. madrid.
- [179] SEM1, «Tecnológico de Monterrey,» [En línea]. Available: http://www.mty.itesm.mx/dia/deptos/im/m00-862/Lecturas/SEM_ICP.pdf. [Último acceso: 13 Mayo 2015].
- [180] SEM3, «Centro de Investigación en Materiales Avanzados.,» [En línea]. Available: <http://mty.cimav.edu.mx/sem/>. [Último acceso: 13 Junio 2015].
- [181] . M. Sadqi, «Estudio termodinámico de los estados parcialmente plegados del dominio SH3 de alpha-espectrina.,» 2000.
- [182] J. D. Sabín Fernández, Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas, Santiago de Compostela: Facultad de Física, 2007, pp. 75-81.
- [183] R. Mackenzie, «Métodos térmicos,» [En línea]. Available: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-15/31.html. [Último acceso: 9 Junio 2015].
- [184] P. V. Kathryn Vowden, «Wound dressings: principles and practice,» *Surgery (Oxford)*, vol. 32, n° 9, p. 462–467, 2014.
- [185] M. P. P. S. K. S. N. H. T. R. Jayakumar, «Biomaterials based on chitin and chitosan in

REFERENCIAS

wound dressing applications,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 322-337, 2011.

- [186] G. Rosales Rivera y L. M. Guzmán Arellano, *Los polímeros sintéticos en el siglo XX*, Fondo de Cultura Económica, 1999.

XI. ANEXOS

ANEXO I. Información adicional del quitosano

1. Composición/Información sobre los componentes

1.1 Sustancias

Sinónimos : Poli(D-glucosamina)
Quitina desacetilada

2. Propiedades Físicas y Químicas

2.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- a) Aspecto Forma: polvo o escamas de color blanco- amarillo pálido
- b) Olor: en solución presenta ligero olor a alga
- c) Umbral olfativo: Sin datos disponibles
- d) pH: 3.9-4.1 (1% en ácido acético)
- e) Punto de fusión/ punto de congelación: Sin datos disponible
- f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición: 211 °F
- g) Inflamabilidad (sólido, gas): No inflamable
- h) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos: No explosivo
- i) Solubilidad en agua: Insoluble, completamente soluble en agua a pH < 6.5 y precipita a pH > 6.5
- j) Temperatura de autoinflamación: No inflamable
- k) Temperatura de descomposición: Sin datos disponibles
- l) Viscosidad: 200 - 800 cps (1% en ácido acético)
- m) Propiedades explosivas: No explosivo
- n) Propiedades comburentes: En solución acuosa, no hay peligro de fuego
- o) Temperatura de transición vítrea: 203 °C

3. Estabilidad y Reactividad

3.1 Reactividad

Sin datos disponibles

3.2 Estabilidad química

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

3.5 Materiales incompatibles

Agentes oxidantes fuertes

4. Información Toxicológica

4.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda

DL50 Oral - Rata - > 10,000 mg/kg

Inhalación: Sin datos disponibles

Cutáneo: Sin datos disponibles

Tóxico para los organismos acuáticos.

Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Tabla 19. Ficha de datos de seguridad del quitosano, modificada de [166] [167] [168]

ANEXO II. Propiedades fisicoquímicas y biológicas del Poloxámero 407

Propiedad física/química	Descripción
Estado físico	polvo, granulado grueso, céreo
Color	blanco
Olor	ligero olor neutro propio, (no hay una descripción específica)
Valor pH	6 – 9 (50 g/l)
Intervalo de fusión	53 - 57 °C
Punto de inflamación	> 150 °C
Temperatura de ignición	> 250 °C
Peso específico	aprox. 500 kg/m ³
Solubilidad en agua	> 175 g/l (23 °C)
Peso molecular	9840-14600 Da
CMC	950-1000ppm (~25°C)

Tabla 20. Propiedades físicas y químicas del Poloxámero 407. Información obtenida de: [56], [112] [110], [113], [54], [53], [75] [114].

- Informaciones toxicológicas

Los datos toxicológicos disponibles DL50 para el poloxámero 407 se basa en la administración oral y dérmica, y está a menos de 5 g/ kg peso corporal.

Parámetro	Información
DL50/oral/rata	> 10.000 mg/kg
DL50/dérmica/conejo	> 5.000 mg/kg
Irritación primaria en piel/conejo	no irritante (Test Draize)
Irritación primaria en mucosa/conejo	no irritante (Test Draize)

Tabla 21. Información toxicológica del Poloxámero 407. Información obtenida de: [56], [112] [110].

Speed RPM	Temperature °C	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Promedio	DE
50	7.10	0.90	0.75	0.45	0.70	0.229
50	7.10	0.90	0.90	0.75	0.85	0.087
50	7.50	0.90	0.90	0.90	0.90	0.000
50	8.40	1.05	1.05	1.05	1.05	0.000
50	9.40	1.05	1.05	1.20	1.10	0.087
50	10.30	1.20	1.20	1.35	1.25	0.087
50	11.30	1.35	1.35	1.50	1.40	0.087
50	12.30	1.80	1.65	1.95	1.80	0.150
50	13.20	2.40	2.25	2.55	2.40	0.150
50	14.20	3.00	2.70	2.70	2.80	0.173
50	15.10	2.70	2.40	2.25	2.45	0.229
50	16.10	2.70	2.40	2.40	2.50	0.173
50	17.00	2.85	2.55	2.40	2.60	0.229
50	18.00	2.85	2.70	2.40	2.65	0.229
50	19.00	3.00	2.85	2.55	2.80	0.229
50	19.90	3.00	3.00	2.55	2.85	0.260
50	20.90	3.00	3.00	2.70	2.90	0.173
50	21.90	3.00	3.00	2.70	2.90	0.173
50	22.80	3.00	3.15	2.70	2.95	0.229
50	23.80	3.00	3.15	2.70	2.95	0.229
50	24.80	3.00	3.15	2.70	2.95	0.229
50	25.80	3.15	3.00	2.55	2.90	0.312
50	26.80	3.00	3.15	2.70	2.95	0.229
50	27.80	3.00	3.00	2.70	2.90	0.173
50	28.80	3.00	3.00	2.70	2.90	0.173
50	29.80	2.85	3.00	2.70	2.85	0.150

Tabla 22. Resultados de la temperatura y la viscosidad de P-407 para calcular la temperatura de gelación.

Speed RPM	Temperature °C	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Promedio	DE
50	7.10	1.50	1.65	1.95	1.70	0.229
50	7.10	1.50	1.65	2.10	1.75	0.312
50	7.50	1.50	1.80	2.10	1.80	0.300
50	8.40	2.10	2.55	3.30	2.65	0.606
50	9.40	2.70	3.15	3.90	3.25	0.606
50	10.30	3.45	3.90	4.65	4.00	0.606
50	11.30	4.20	4.50	5.25	4.65	0.541
50	12.30	4.35	4.65	3.90	4.30	0.377
50	13.20	3.60	3.60	3.30	3.50	0.173
50	14.20	3.30	3.60	3.45	3.45	0.150
50	15.10	3.30	3.75	3.45	3.50	0.229
50	16.10	3.30	3.75	3.45	3.50	0.229
50	17.00	3.45	3.75	3.45	3.55	0.173
50	18.00	3.45	3.60	3.45	3.50	0.087
50	19.00	3.30	3.60	3.45	3.45	0.150
50	19.90	3.30	3.60	3.45	3.45	0.150
50	20.90	3.30	3.60	3.45	3.45	0.150
50	21.90	3.15	3.45	3.45	3.35	0.173
50	22.80	3.15	3.45	3.45	3.35	0.173
50	23.80	3.00	3.45	3.45	3.30	0.260
50	24.80	3.00	3.45	3.45	3.30	0.260
50	25.80	3.00	3.45	3.30	3.25	0.229
50	26.80	3.00	3.45	3.30	3.25	0.229
50	27.80	2.85	3.45	3.15	3.15	0.300
50	28.80	2.85	3.45	3.15	3.15	0.300
50	29.80	2.70	3.45	3.15	3.10	0.377

Tabla 23. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH+P para calcular la temperatura de gelación.

Speed RPM	Temperature °C	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Promedio	DE
50	7.10	0.75	0.90	0.90	0.85	0.087
50	7.10	0.90	0.75	1.05	0.90	0.150
50	7.50	1.05	0.90	1.20	1.05	0.150
50	8.40	1.20	1.20	1.50	1.30	0.173
50	9.40	1.50	1.65	1.80	1.65	0.150
50	10.30	1.65	1.95	2.10	1.90	0.229
50	11.30	2.10	2.25	2.70	2.35	0.312
50	12.30	2.70	3.15	3.45	3.10	0.377
50	13.20	3.30	3.90	4.50	3.90	0.600
50	14.20	4.20	4.80	5.40	4.80	0.600
50	15.10	4.80	5.40	6.15	5.45	0.676
50	16.10	5.55	6.15	6.60	6.10	0.527
50	17.00	6.15	6.45	7.05	6.55	0.458
50	18.00	6.45	6.90	7.35	6.90	0.450
50	19.00	6.75	7.20	7.50	7.15	0.377
50	19.90	6.90	7.35	7.50	7.25	0.312
50	20.90	7.05	7.50	7.35	7.30	0.229
50	21.90	7.05	7.50	7.20	7.25	0.229
50	22.80	7.05	7.50	7.05	7.20	0.260
50	23.80	7.05	7.05	6.75	6.95	0.173
50	24.80	7.05	7.05	6.75	6.95	0.173
50	25.80	6.90	7.20	6.45	6.85	0.377
50	26.80	6.75	6.75	6.45	6.65	0.173
50	27.80	6.45	6.60	6.15	6.40	0.229
50	28.80	6.30	6.60	5.85	6.25	0.377
50	29.80	6.30	6.45	5.55	6.10	0.482

Tabla 24. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH-P 4 para calcular la temperatura de gelación.

Speed RPM	Temperature °C	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Promedio	DE
50	7.10	1.20	1.35	1.20	1.25	0.087
50	7.10	1.20	1.65	1.20	1.35	0.260
50	7.50	1.35	1.95	1.20	1.50	0.397
50	8.40	1.65	2.25	1.95	1.95	0.300
50	9.40	2.10	2.85	2.55	2.50	0.377
50	10.30	2.55	3.60	3.45	3.20	0.568
50	11.30	3.30	4.65	3.90	3.95	0.676
50	12.30	4.35	5.70	5.25	5.10	0.687
50	13.20	5.25	6.45	6.15	5.95	0.624
50	14.20	6.15	7.20	6.90	6.75	0.541
50	15.10	6.75	7.80	7.50	7.35	0.541
50	16.10	7.20	8.25	7.95	7.80	0.541
50	17.00	7.50	8.55	8.25	8.10	0.541
50	18.00	7.65	8.70	8.40	8.25	0.541
50	19.00	7.80	8.55	8.40	8.25	0.397
50	19.90	7.65	8.25	8.10	8.00	0.312
50	20.90	7.50	8.10	7.95	7.85	0.312
50	21.90	7.20	7.65	7.65	7.50	0.260
50	22.80	7.20	7.50	7.35	7.35	0.150
50	23.80	7.05	7.35	7.05	7.15	0.173
50	24.80	6.75	7.20	6.90	6.95	0.229
50	25.80	6.60	6.60	6.45	6.55	0.087
50	26.80	6.45	6.75	6.30	6.50	0.229
50	27.80	6.15	6.60	6.00	6.25	0.312
50	28.80	6.00	6.30	5.85	6.05	0.229
50	29.80	5.85	6.15	5.70	5.90	0.229

Tabla 25. Resultados de la temperatura y la viscosidad de CH-P 7 para calcular la temperatura de gelación.

ANEXO III
Tablas de pruebas fisicoquímicas

Temperatura (°C)				Tiempo (seg)			
P407	CH+P	CH-P 4	CH-P 7	P407	CH+P	CH-P 4	CH-P 7
12.75	9.65	13.65	12.65	101.42	67.58	115.69	100.80
12.75	9.60	13.65	11.65	81.94	65.79	131.64	87.89
12.75	9.15	13.20	11.75	94.50	64.34	108.80	90.70

Tabla 26. Datos del tiempo y temperatura de gelación obtenidos para las distintas muestras.

Pruebas estadísticas para la comparación entre los datos obtenidos del tiempo y temperatura de gelación de los distintos hidrogeles, en el cual si $F < F_{crítica}$ hay una diferencia significativa, y si $F > F_{crítica}$ no la hay.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P407	3	38.25	12.75	0
CH+P	3	28.4	9.466666667	0.075833333

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	16.17041667	1	16.17041667	426.4725275	3.24796E-05	7.708647421
Dentro de los grupos	0.151666667	4	0.037916667			
Total	16.32208333	5				

Tabla 27. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH+P.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P407	3	38.25	12.75	0
CH-P 4	3	40.5	13.5	0.0675

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.84375	1	0.84375	25	0.007490434	7.708647421
Dentro de los grupos	0.135	4	0.03375			
Total	0.97875	5				

Tabla 28. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH-P 4.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
P407	3	38.25	12.75	0
CH-P 7	3	36.05	12.01666667	0.303333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.806666667	1	0.806666667	5.318681319	0.082373119	7.708647421
Dentro de los grupos	0.606666667	4	0.151666667			
Total	1.413333333	5				

Tabla 29. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre P-407 y CH-P 7.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH+P	3	28.4	9.466666667	0.075833333
CH-P 4	3	40.5	13.5	0.0675

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	24.40166667	1	24.40166667	340.4883721	5.07564E-05	7.708647421
Dentro de los grupos	0.286666667	4	0.071666667			
Total	24.68833333	5				

Tabla 30. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P y CH-P 4.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH+P	3	28.4	9.46666667	0.075833333
CH-P7	3	36.05	12.01666667	0.303333333

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9.75375	1	9.75375	51.44835165	0.002000452	7.708647421
Dentro de los grupos	0.758333333	4	0.189583333			
Total	10.51208333	5				

Tabla 31. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P y CH-P 7.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH-P 4	3	40.5	13.5	0.0675
CH-P 7	3	36.05	12.01666667	0.303333333

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3.300416667	1	3.300416667	17.8	0.013488351	7.708647421
Dentro de los grupos	0.741666667	4	0.185416667			
Total	4.042083333	5				

Tabla 32. ANOVA de un factor entre los datos de la temperatura de gelación entre CH+P 4 y CH-P 7.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
P407	3	277.8554762	92.61849206	97.469323
CH+P	3	197.7128263	65.90427542	2.6269127

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1070.474056	1	1070.474056	21.388897	0.009845451	7.708647421
Dentro de los grupos	200.1924723	4	50.04811807			
Total	1270.666528	5				

Tabla 33. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH+P.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
P407	3	277.8554762	92.61849206	97.469323
CH-P 4	3	356.1265493	118.7088498	137.29184

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1021.060148	1	1021.060148	8.6987142	0.041996153	7.708647421
Dentro de los grupos	469.5223352	4	117.3805838			
Total	1490.582483	5				

Tabla 34. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH-P 4.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
P407	3	277.8554762	92.61849206	97.469323
CH-P 7	3	279.3900609	93.13002032	46.064437

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.392491729	1	0.392491729	0.005469	0.944598683	7.708647421
Dentro de los grupos	287.067521	4	71.76688025			
Total	287.4600127	5				

Tabla 35. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre P-407 y CH-P 7.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH+P	3	197.7128263	65.90427542	2.6269127
CH-P 4	3	356.1265493	118.7088498	137.29184

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4182.484607	1	4182.484607	59.784474	0.001506723	7.708647421
Dentro de los grupos	279.8375135	4	69.95937838			
Total	4462.322121	5				

Tabla 36. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH+P y CH-P 4.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH+P	3	197.7128263	65.90427542	2.6269127
CH-P 7	3	279.3900609	93.13002032	46.064437

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1111.861777	1	1111.861777	45.669787	0.002500428	7.708647421
Dentro de los grupos	97.38269932	4	24.34567483			
Total	1209.244477	5				

Tabla 37. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH+-P y CH-P 7.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CH-P 4	3	356.1265493	118.7088498	137.29184
CH-P 7	3	279.3900609	93.13002032	46.064437

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	981.414774	1	981.414774	10.705003	0.030735563	7.708647421
Dentro de los grupos	366.7125622	4	91.67814056			
Total	1348.127336	5				

Tabla 38. ANOVA de un factor entre los datos del tiempo de gelación entre CH-P 4 y CH-P 7.

ANEXO III
Tablas de pruebas fisicoquímicas

Speed	Viscosity	Viscosity	Viscosity	Promedio	DE
RPM	Poise	Poise	Poise		
120	4.063	4.125	4.188	4.125	0.063
140	3.857	4.125	4.446	4.143	0.295
160	3.656	3.75	3.656	3.687	0.054
180	3.417	3.458	3.042	3.306	0.229
200	3.188	3.188	2.663	3.013	0.303
220	2.966	2.966	2.42	2.784	0.315
240	2.813	2.594	2.219	2.542	0.300
260	2.625	2.192	2.135	2.317	0.268
280	2.143	1.955	2.036	2.045	0.094
300	1.85	1.725	1.875	1.817	0.080
320	1.664	1.57	1.641	1.625	0.049
340	1.566	1.368	1.434	1.456	0.101
360	1.292	1.208	1.312	1.271	0.055
380	1.066	1.007	1.066	1.046	0.034
400	0.9	0.844	1.05	0.931	0.107
420	0.821	0.786	0.946	0.851	0.084
440	0.835	0.733	0.835	0.801	0.059
460	0.75	0.685	0.75	0.728	0.038
480	0.734	0.688	0.734	0.719	0.027
500	0.75	0.63	0.705	0.695	0.061
520	0.678	0.591	0.721	0.663	0.066
540	0.667	0.653	0.667	0.662	0.008
560	0.643	0.656	0.656	0.652	0.008
580	0.634	0.608	0.621	0.621	0.013
600	0.638	0.625	0.6	0.621	0.019
580	0.724	0.647	0.634	0.668	0.049
560	0.696	0.723	0.67	0.696	0.027
540	0.736	0.694	0.694	0.708	0.024
520	0.736	0.75	0.736	0.741	0.008
500	0.72	0.81	0.735	0.755	0.048
480	0.813	0.828	0.813	0.818	0.009
460	0.799	0.848	0.864	0.837	0.034
440	0.852	0.852	0.869	0.858	0.010
420	0.911	0.911	0.911	0.911	0.000
400	0.938	0.938	0.881	0.919	0.033
380	0.928	0.947	0.967	0.947	0.020
360	1.021	0.979	1.042	1.014	0.032
340	1.037	1.125	1.015	1.059	0.058
320	1.008	1.055	1.031	1.031	0.024
300	1.025	1.075	1.1	1.067	0.038
280	1.071	1.098	1.152	1.107	0.041
260	1.125	1.125	1.298	1.183	0.100
240	1.188	1.281	1.438	1.302	0.126
220	1.193	1.364	1.534	1.364	0.171
200	1.238	1.425	1.688	1.450	0.226
180	1.458	1.542	1.792	1.597	0.174
160	1.547	1.688	1.969	1.735	0.215
140	1.661	1.875	2.089	1.875	0.214
120	1.938	2.313	2.438	2.230	0.260

Tabla 39. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el P-407.

Speed	Viscosity	Viscosity	Viscosity	Promedio	DE
RPM	Poise	Poise	Poise		
120	5.313	5.125	5.5	5.313	0.188
140	5.196	4.875	5.196	5.089	0.185
160	4.828	4.5	4.172	4.500	0.328
180	4.417	4.208	3.792	4.139	0.318
200	2.888	4.05	3.675	3.538	0.593
220	2.182	3.852	3.682	3.239	0.919
240	1.656	3.125	3.563	2.781	0.999
260	1.298	2.192	3.317	2.269	1.012
280	1.125	1.661	2.036	1.607	0.458
300	1	1.375	1.425	1.267	0.232
320	0.891	1.125	1.055	1.024	0.120
340	0.926	0.993	0.816	0.912	0.089
360	0.812	0.917	0.708	0.812	0.105
380	0.691	0.691	0.671	0.684	0.012
400	0.656	0.731	0.6	0.662	0.066
420	0.589	0.625	0.643	0.619	0.027
440	0.614	0.597	0.562	0.591	0.027
460	0.538	0.554	0.571	0.554	0.017
480	0.5	0.531	0.516	0.516	0.016
500	0.51	0.54	0.525	0.525	0.015
520	0.476	0.548	0.534	0.519	0.038
540	0.486	0.5	0.514	0.500	0.014
560	0.482	0.509	0.496	0.496	0.014
580	0.491	0.491	0.401	0.461	0.052
600	0.463	0.45	0.475	0.463	0.013
580	0.478	0.375	0.491	0.448	0.064
560	0.469	0.496	0.509	0.491	0.020
540	0.528	0.528	0.5	0.519	0.016
520	0.534	0.562	0.534	0.543	0.016
500	0.525	0.555	0.585	0.555	0.030
480	0.547	0.641	0.563	0.584	0.050
460	0.636	0.636	0.636	0.636	0.000
440	0.665	0.665	0.631	0.654	0.020
420	0.679	0.679	0.607	0.655	0.042
400	0.731	0.694	0.713	0.713	0.019
380	0.711	0.711	0.711	0.711	0.000
360	0.812	0.875	0.75	0.812	0.063
340	0.64	0.926	0.904	0.823	0.159
320	0.867	0.867	0.867	0.867	0.000
300	0.925	0.925	0.875	0.908	0.029
280	0.911	0.964	0.964	0.946	0.031
260	0.981	1.038	1.038	1.019	0.033
240	1.094	1.156	1.156	1.135	0.036
220	1.261	1.193	1.227	1.227	0.034
200	1.35	1.35	1.35	1.350	0.000
180	1.458	1.583	1.5	1.514	0.064
160	1.641	1.734	1.734	1.703	0.054
140	1.929	1.929	1.929	1.929	0.000
120	2.375	2.313	2.5	2.396	0.095

Tabla 40. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH+P.

Speed RPM	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Viscosity Poise	Promedio	DE
120	8.813	9.313	10.063	9.396	0.629
140	8.357	7.982	9.321	8.553	0.691
160	7.547	7.172	8.203	7.641	0.522
180	6.875	6.833	7.667	7.125	0.470
200	6.375	6.675	7.2	6.750	0.418
220	6	6.307	6.784	6.364	0.395
240	5.688	6.031	6.406	6.042	0.359
260	5.481	5.769	6.115	5.788	0.317
280	5.277	5.491	5.839	5.536	0.284
300	5.05	5.275	5.625	5.317	0.290
320	4.852	5.133	5.414	5.133	0.281
340	4.677	4.963	5.25	4.963	0.287
360	4.521	4.792	5.125	4.813	0.303
380	4.362	4.638	4.934	4.645	0.286
400	4.238	4.519	4.763	4.507	0.263
420	4.107	4.375	4.643	4.375	0.268
440	3.971	4.244	4.517	4.244	0.273
460	3.864	4.076	4.386	4.109	0.263
480	3.766	3.922	4.25	3.979	0.247
500	3.675	3.75	4.095	3.840	0.224
520	3.591	3.346	3.966	3.634	0.312
540	3.528	3.069	3.847	3.481	0.391
560	3.455	2.853	3.683	3.330	0.429
580	3.388	2.728	3.414	3.177	0.389
600	3.313	2.65	3.075	3.013	0.336
580	3.388	2.677	3.013	3.026	0.356
560	3.482	2.746	3.013	3.080	0.373
540	3.542	2.778	3.014	3.111	0.391
520	3.606	2.841	3.058	3.168	0.394
500	3.66	2.91	3.135	3.235	0.385
480	3.734	2.969	3.172	3.292	0.396
460	3.75	3.049	3.277	3.359	0.358
440	3.818	3.153	3.375	3.449	0.339
420	3.911	3.268	3.482	3.554	0.327
400	4.013	3.356	3.581	3.650	0.334
380	4.105	3.454	3.671	3.743	0.331
360	4.208	3.583	3.812	3.868	0.316
340	4.368	3.75	3.949	4.022	0.315
320	4.5	3.891	4.102	4.164	0.309
300	4.7	4.025	4.3	4.342	0.339
280	4.929	4.205	4.527	4.554	0.363
260	5.192	4.413	4.731	4.779	0.392
240	5.5	4.656	5	5.052	0.424
220	5.864	4.977	5.318	5.386	0.447
200	6.263	5.325	5.7	5.763	0.472
180	6.75	5.708	6.167	6.208	0.522
160	7.359	6.281	6.75	6.797	0.541
140	8.143	6.857	7.393	7.464	0.646
120	8.875	7.25	8.063	8.062667	0.8125

Tabla 41. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH-P 4.

ANEXO III
Tablas de pruebas fisicoquímicas

Speed	Viscosity	Viscosity	Viscosity	Promedio	DE
RPM	Poise	Poise	Poise		
120	9.5	9.125	9.688	9.438	0.287
140	8.411	8.464	7.821	8.232	0.357
160	7.359	7.828	6.938	7.375	0.445
180	6.792	7.292	6.458	6.847	0.420
200	6.563	6.675	6.113	6.450	0.297
220	6.205	6.239	5.761	6.068	0.267
240	5.875	5.813	5.438	5.709	0.236
260	5.625	5.452	5.135	5.404	0.249
280	5.411	5.17	4.875	5.152	0.268
300	5.225	4.95	4.65	4.942	0.288
320	5.039	4.734	4.453	4.742	0.293
340	4.875	4.544	4.257	4.559	0.309
360	4.75	4.354	4.083	4.396	0.335
380	4.618	4.145	3.928	4.230	0.353
400	4.481	4.013	3.806	4.100	0.346
420	4.375	3.875	3.679	3.976	0.359
440	4.244	3.716	3.579	3.846	0.351
460	4.158	3.587	3.473	3.739	0.367
480	4.047	3.438	3.375	3.620	0.371
500	3.945	3.345	3.315	3.535	0.355
520	3.808	3.231	3.231	3.423	0.333
540	3.653	3.153	3.167	3.324	0.285
560	3.563	3.067	3.107	3.246	0.276
580	3.504	2.974	3.039	3.172	0.289
600	3.313	2.9	2.975	3.063	0.220
580	3.181	2.948	3.026	3.052	0.119
560	3.107	3	3.107	3.071	0.062
540	3.097	3.042	3.181	3.107	0.070
520	3.13	3.231	3.26	3.207	0.068
500	3.21	3.375	3.36	3.315	0.091
480	3.281	3.422	3.469	3.391	0.098
460	3.359	3.505	3.571	3.478	0.108
440	3.426	3.579	3.699	3.568	0.137
420	3.5	3.661	3.821	3.661	0.161
400	3.619	3.769	3.956	3.781	0.169
380	3.711	3.868	4.105	3.895	0.198
360	3.833	3.979	4.271	4.028	0.223
340	3.971	4.147	4.434	4.184	0.234
320	4.125	4.313	4.617	4.352	0.248
300	4.3	4.475	4.85	4.542	0.281
280	4.527	4.714	5.089	4.777	0.286
260	4.731	4.933	5.337	5.000	0.309
240	5.031	5.188	5.656	5.292	0.325
220	5.386	5.523	6.034	5.648	0.342
200	5.775	6	6.488	6.088	0.364
180	6.25	6.542	7	6.597	0.378
160	6.797	7.172	7.641	7.203	0.423
140	7.554	7.929	8.571	8.018	0.514
120	8.688	9.063	9.875	9.209	0.607

Tabla 42. Resultados obtenidos de la prueba de viscosidad para el CH-P 7.

Glicerol %p/v	%HR	Tapas vacías (g)	Tapa + gel	Tapa+ gel a las 6 hrs	Peso inicial (g)	Peso final(g)	Diferencia de pesos	%Agua eliminada por el gel	Promedio	DS
92	20	3.413	7.407	6.972	3.994	3.559	0.44	10.89	10.68	0.20
		3.35	7.245	6.836	3.895	3.486	0.41	10.50		
		3.274	7.279	6.853	4.005	3.579	0.43	10.64		
89	30	3.339	7.435	7.04	4.096	3.701	0.40	9.64	9.93	0.40
		3.339	7.248	6.842	3.909	3.503	0.41	10.39		
		3.355	7.494	7.09	4.139	3.735	0.40	9.76		
84	40	3.206	7.196	6.798	3.990	3.592	0.40	9.97	9.39	0.51
		3.339	7.818	7.414	4.479	4.075	0.40	9.02		
		3.204	7.637	7.23	4.433	4.026	0.41	9.18		
79	50	3.225	7.224	6.844	3.999	3.619	0.38	9.50	9.01	0.43
		3.232	7.343	6.981	4.111	3.749	0.36	8.81		
		3.412	7.706	7.332	4.294	3.92	0.37	8.71		
72	60	3.235	7.643	7.31	4.408	4.075	0.33	7.55	7.89	0.30
		3.349	7.494	7.163	4.145	3.814	0.33	7.99		
		3.345	7.268	6.949	3.923	3.604	0.32	8.13		
64	70	3.379	6.689	6.481	3.310	3.102	0.21	6.28	6.26	0.07
		3.411	6.743	6.537	3.332	3.126	0.21	6.18		
		3.205	6.488	6.281	3.283	3.076	0.21	6.31		
51	80	3.339	7.228	6.989	3.889	3.65	0.24	6.15	6.11	1.94
		3.435	7.725	7.547	4.290	4.112	0.18	4.15		
		3.345	7.583	7.243	4.238	3.898	0.34	8.02		
33	90	3.425	7.200	7.048	3.775	3.623	0.15	4.03	3.46	0.51
		3.463	7.366	7.236	3.903	3.773	0.13	3.33		
		3.458	7.477	7.355	4.019	3.897	0.12	3.04		

Tabla 43. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el P-407.

Glicerol %p/v	%HR	Tapas vacías (g)	Tapa + gel	Tapa+ gel a las 6 hrs	Peso inicial (g)	Peso final(g)	Diferencia de pesos	%Agua eliminada por el gel	Promedio	DS
92	20	3.349	8.264	7.836	4.915	4.487	0.43	8.71	9.42	0.62
		3.367	7.556	7.15	4.189	3.783	0.41	9.69		
		3.214	7.334	6.928	4.120	3.714	0.41	9.85		
89	30	3.407	7.795	7.367	4.388	3.96	0.43	9.75	9.54	0.18
		3.267	7.774	7.35	4.507	4.083	0.42	9.41		
		3.232	7.467	7.066	4.235	3.834	0.40	9.47		
84	40	3.217	7.229	6.862	4.012	3.645	0.37	9.15	8.42	0.65
		3.213	7.875	7.491	4.662	4.278	0.38	8.24		
		3.283	7.848	7.488	4.565	4.205	0.36	7.89		
79	50	3.228	7.165	6.813	3.937	3.585	0.35	8.94	8.29	0.56
		3.344	7.702	7.353	4.358	4.009	0.35	8.01		
		3.345	7.583	7.247	4.238	3.902	0.34	7.93		
72	60	3.344	7.475	7.167	4.131	3.823	0.31	7.46	7.05	0.48
		3.426	7.795	7.51	4.369	4.084	0.29	6.52		
		3.358	7.437	7.145	4.079	3.787	0.29	7.16		
64	70	3.219	7.684	7.428	4.465	4.209	0.26	5.73	5.97	0.20
		3.402	7.792	7.526	4.390	4.124	0.27	6.06		
		3.351	7.675	7.411	4.324	4.06	0.26	6.11		
51	80	3.43	7.586	7.371	4.156	3.941	0.22	5.17	5.82	1.19
		3.408	7.713	7.403	4.305	3.995	0.31	7.20		
		3.219	7.497	7.279	4.278	4.06	0.22	5.10		
33	90	3.231	7.329	7.215	4.098	3.984	0.11	2.78	2.73	0.11
		3.419	7.483	7.369	4.064	3.95	0.11	2.81		
		3.343	7.496	7.388	4.153	4.045	0.11	2.60		

Tabla 44. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH+P.

Glicerol %p/v	%HR	Tapas vacías (g)	Tapa + gel	Tapa+ gel a las 6 hrs	Peso inicial (g)	Peso final(g)	Diferencia de pesos	%Agua eliminada por el gel	Promedio	DS
92	20	3.348	8.083	7.656	4.735	4.308	0.43	9.02	9.34	0.68
		3.367	7.942	7.536	4.575	4.169	0.41	8.87		
		3.215	7.069	6.679	3.854	3.464	0.39	10.12		
89	30	3.407	7.923	7.461	4.516	4.054	0.46	10.23	9.95	0.37
		3.268	7.48	7.055	4.212	3.787	0.43	10.09		
		3.23	7.414	7.015	4.184	3.785	0.40	9.54		
84	40	3.215	7.307	6.918	4.092	3.703	0.39	9.51	9.01	0.44
		3.214	7.688	7.299	4.474	4.085	0.39	8.69		
		3.282	7.349	6.99	4.067	3.708	0.36	8.83		
79	50	3.227	7.36	7.007	4.133	3.78	0.35	8.54	8.54	0.05
		3.344	7.489	7.133	4.145	3.789	0.36	8.59		
		3.344	7.68	7.312	4.336	3.968	0.37	8.49		
72	60	3.349	7.446	7.127	4.097	3.778	0.32	7.79	7.83	0.04
		3.426	7.665	7.332	4.239	3.906	0.33	7.86		
		3.359	7.433	7.113	4.074	3.754	0.32	7.85		
64	70	3.219	7.485	7.205	4.266	3.986	0.28	6.56	6.55	0.01
		3.443	7.712	7.432	4.269	3.989	0.28	6.56		
		3.352	7.449	7.181	4.097	3.829	0.27	6.54		
51	80	3.43	7.440	7.248	4.010	3.818	0.19	4.79	5.45	1.19
		3.409	7.704	7.411	4.295	4.002	0.29	6.82		
		3.22	7.353	7.157	4.133	3.937	0.20	4.74		
33	90	3.232	7.435	7.316	4.203	4.084	0.12	2.83	3.00	0.19
		3.449	7.452	7.324	4.003	3.875	0.13	3.20		
		3.345	7.287	7.17	3.942	3.825	0.12	2.97		

Tabla 45. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH-P 4.

Glicerol %p/v	%HR	Tapas vacias (g)	Tapa + gel	Tapa+ gel a las 6 hrs	Peso inicial (g)	Peso final(g)	Diferencia de pesos	%Agua eliminada por el gel	Promedio	DS
92	20	3.306	7.66	7.23	4.354	3.924	0.43	9.88	10.26	0.60
		3.392	7.589	7.171	4.197	3.779	0.42	9.96		
		3.361	7.195	6.775	3.834	3.414	0.42	10.95		
89	30	3.288	7.318	6.93	4.030	3.642	0.39	9.63	9.86	0.24
		3.365	7.435	7.034	4.070	3.669	0.40	9.85		
		3.276	7.266	6.863	3.990	3.587	0.40	10.10		
84	40	3.205	7.075	6.72	3.870	3.515	0.36	9.17	8.60	0.64
		3.339	7.697	7.352	4.358	4.013	0.35	7.92		
		3.203	7.292	6.936	4.089	3.733	0.36	8.71		
79	50	3.224	7.129	6.788	3.905	3.564	0.34	8.73	8.55	0.19
		3.231	7.314	6.973	4.083	3.742	0.34	8.35		
		3.41	7.594	7.235	4.184	3.825	0.36	8.58		
72	60	3.236	7.357	7.042	4.121	3.806	0.32	7.64	7.49	0.21
		3.35	7.599	7.291	4.249	3.941	0.31	7.25		
		3.346	7.376	7.071	4.030	3.725	0.31	7.57		
64	70	3.289	7.208	6.96	3.919	3.671	0.25	6.33	6.05	0.24
		3.362	7.675	7.421	4.313	4.059	0.25	5.89		
		3.379	7.532	7.286	4.153	3.907	0.25	5.92		
51	80	3.337	7.079	6.894	3.742	3.557	0.19	4.94	4.75	0.34
		3.433	7.661	7.477	4.228	4.044	0.18	4.35		
		3.283	7.403	7.199	4.120	3.916	0.20	4.95		
33	90	3.411	7.464	7.356	4.053	3.945	0.11	2.66	2.81	0.16
		3.402	7.335	7.226	3.933	3.824	0.11	2.77		
		3.356	7.178	7.064	3.822	3.708	0.11	2.98		

Tabla 46. Resultados obtenidos de la prueba de porcentaje de humedad relativa para el CH-P 7.

Tiempo (hrs)	P407		CH+P		CH-P 4		CH-P7	
	promedios % erosión	SD	promedios % erosión	SD	promedios % erosión	SD	promedios % erosión	SD
2	2.39	1.305	0.972	3.053	-2.868	1.127	1.366	0.955
4	1.56	1.272	-1.101	3.433	-8.058	1.709	0.493	0.845
6	2.11	0.503	-2.542	0.990	-6.974	3.462	-0.706	2.544
8	6.26	2.241	-3.690	4.867	-8.779	1.590	-3.668	1.494
10	5.70	3.687	-7.478	3.370	-11.130	2.491	-7.755	2.495
12	6.54	0.350	5.982	2.926	-10.230	4.354	-11.957	1.428
15	1.05	0.768	3.646	3.424	-12.469	5.213	-13.772	3.007
18	1.91	0.533	17.795	6.149	-12.650	5.829	-14.252	0.428
21	2.57	1.215	35.969	8.150	-7.049	2.972	-18.708	2.398
24	9.71	4.298	66.589	5.764	-12.027	7.428	-20.213	2.187

Tabla 47. Resultados obtenidos de la prueba de bioerosión/hinchamiento para las distintas muestras.

- Prueba estadística entre los datos de viscosidad al aplicar un esfuerzo cortante y al cesar el esfuerzo.

P-407

Paired t test	120 rpm aplicar vs 120 rpm cesar
P value	0.0036
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 48. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	360 rpm aplicar vs 360 rpm cesar
P value	0.0027
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 49. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	580 rpm aplicar vs 580 rpm cesar
P value	0.1714
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 50. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de P-407 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

CH+P

Paired t test	120 rpm aplicar vs 120 rpm cesar
P value	0.0003
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 51. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	360 rpm aplicar vs 360 rpm cesar
P value	> 0.9999
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 52. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	580 rpm aplicar vs 580 rpm cesar
P value	0.8472
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 53. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH+P a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

CH-P 4

Paired t test	120 rpm aplicar vs 120 rpm cesar
P value	0.1979
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 54. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	360 rpm aplicar vs 360 rpm cesar
P value	0.0977
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 55. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	580 rpm aplicar vs 580 rpm cesar
P value	0.3544
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 56. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 4 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

CH-P 7

Paired t test	120 rpm aplicar vs 120 rpm cesar
P value	0.5229
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 57. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 120 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	360 rpm aplicar vs 360 rpm cesar
P value	0.371
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 58. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 360 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

Paired t test	580 rpm aplicar vs 580 rpm cesar
P value	0.3555
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Tabla 59. Resultados de la prueba estadística (t-pareada) entre los datos de viscosidad del hidrogel de CH-P 7 a una velocidad de cizallamiento de 580 rpm al aplicar el esfuerzo cortante y al cesar dicho esfuerzo.

- **Prueba estadística entre los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a diferentes valores de humedades relativas.**

ANOVA summary	
F	4.138
P value	0.048
P value summary	*
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 60. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 20% (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 20 vs. CH+P 20	ns	0.092
P-407 20 vs. CH-P 4 20	ns	0.0717
P-407 20 vs. CH-P 7 20	ns	0.801
CH+P 20 vs. CH-P 4 20	ns	0.9979
CH+P 20 vs. CH-P 7 20	ns	0.3148
CH-P 4 20 vs. CH-P 7 20	ns	0.2515

Tabla 61. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 20%.

ANOVA summary	
F	1.126
P value	0.3945
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 62. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 30% (P>0.05).

ANOVA summary	
F	1.754
P value	0.2333
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 63. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 40% (P>0.05).

ANOVA summary	
F	1.967
P value	0.1977
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 64. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 50% (P>0.05).

ANOVA summary	
F	4.934
P value	0.0316
P value summary	*
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 65. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 60% (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 60 vs. CH+P 60	*	0.0373
P-407 60 vs. CH-P 4 60	ns	0.9954
P-407 60 vs. CH-P 7 60	ns	0.4149
CH+P 60 vs. CH-P 4 60	ns	0.0515
CH+P 60 vs. CH-P 7 60	ns	0.3482
CH-P 4 60 vs. CH-P 7 60	ns	0.5318

Tabla 66. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 60%.

ANOVA summary	
F	7.637
P value	0.0098
P value summary	**
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 67. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 70% (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 70 vs. CH+P 70	ns	0.213
P-407 70 vs. CH-P 4 70	ns	0.1993
P-407 70 vs. CH-P 7 70	ns	0.4464
CH+P 70 vs. CH-P 4 70	*	0.0101
CH+P 70 vs. CH-P 7 70	ns	0.9302
CH-P 4 70 vs. CH-P 7 70	*	0.0224

Tabla 68. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 70%.

ANOVA summary	
F	0.6206
P value	0.6212
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 69. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 80% (P>0.05).

ANOVA summary	
F	3.953
P value	0.0533
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 70. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de %agua eliminada por los hidrogeles a una humedad relativa de 90% (P>0.05).

- Prueba estadística entre los datos de % de hidrogel erosionado a diferentes tiempos.

ANOVA summary	
F	3.251
P value	0.0637
P value summary	ns
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	No

Tabla 71. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 2h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P>0.05).

ANOVA summary	
F	8.965
P value	0.0027
P value summary	**
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 72. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 4h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T4 vs. CH+P T4	ns	0.4697
P-407 T4 vs. CH-P 4 T4	**	0.0031
P-407 T4 vs. CH-P 7 T4	ns	0.952
CH+P T4 vs. CH-P 4 T4	*	0.011
CH+P T4 vs. CH-P 7 T4	ns	0.8066
CH-P 4 T4 vs. CH-P 7 T4	**	0.0073

Tabla 73. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 4h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

ANOVA summary	
F	8.851
P value	0.0064
P value summary	**
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 74. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 6h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T6 vs. CH+P T6	ns	0.1226
P-407 T6 vs. CH-P 4 T6	**	0.0046
P-407 T6 vs. CH-P 7 T6	ns	0.4532
CH+P T6 vs. CH-P 4 T6	ns	0.1448
CH+P T6 vs. CH-P 7 T6	ns	0.7467
CH-P 4 T6 vs. CH-P 7 T6	*	0.0349

Tabla 75. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 6h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

ANEXO III
Tablas de pruebas fisicoquímicas

ANOVA summary	
F	14.75
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 76. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 8h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

ANOVA summary	
F	20.83
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 78. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 10h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

ANOVA summary	
F	57.77
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 80. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 12h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T8 vs. CH+P T8	**	0.001
P-407 T8 vs. CH-P 4 T8	****	< 0.0001
P-407 T8 vs. CH-P 7 T8	**	0.001
CH+P T8 vs. CH-P 4 T8	ns	0.1476
CH+P T8 vs. CH-P 7 T8	ns	> 0.9999
CH-P 4 T8 vs. CH-P 7 T8	ns	0.1451

Tabla 77. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 8h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T10 vs. CH+P T10	***	0.0006
P-407 T10 vs. CH-P 4 T10	****	< 0.0001
P-407 T10 vs. CH-P 7 T10	***	0.0009
CH+P T10 vs. CH-P 4 T10	ns	0.3155
CH+P T10 vs. CH-P 7 T10	ns	0.9993
CH-P 4 T10 vs. CH-P 7 T10	ns	0.4463

Tabla 79. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 10h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T12 vs. CH+P T12	ns	0.9803
P-407 T12 vs. CH-P 4 T12	****	< 0.0001
P-407 T12 vs. CH-P 7 T12	****	< 0.0001
CH+P T12 vs. CH-P 4 T12	****	< 0.0001
CH+P T12 vs. CH-P 7 T12	****	< 0.0001
CH-P 4 T12 vs. CH-P 7 T12	ns	0.8217

Tabla 81. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 12h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

ANOVA summary	
F	20.07
P value	0.0004
P value summary	***
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 82. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 15h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

ANOVA summary	
F	7.099
P value	0.0064
P value summary	**
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 84. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 18h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

ANOVA summary	
F	96.51
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 86. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 21h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T15 vs. CH+P T15	ns	0.7991
P-407 T15 vs. CH-P 4 T15	**	0.0063
P-407 T15 vs. CH-P 7 T15	**	0.0036
CH+P T15 vs. CH-P 4 T15	**	0.0021
CH+P T15 vs. CH-P 7 T15	**	0.0013
CH-P 4 T15 vs. CH-P 7 T15	ns	0.9661

Tabla 83. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 15h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T18 vs. CH+P T18	ns	0.9999
P-407 T18 vs. CH-P 4 T18	*	0.0337
P-407 T18 vs. CH-P 7 T18	*	0.0465
CH+P T18 vs. CH-P 4 T18	*	0.0237
CH+P T18 vs. CH-P 7 T18	*	0.0367
CH-P 4 T18 vs. CH-P 7 T18	ns	0.9982

Tabla 85. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 18h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T21 vs. CH+P T21	****	< 0.0001
P-407 T21 vs. CH-P 4 T21	*	0.0369
P-407 T21 vs. CH-P 7 T21	***	0.0003
CH+P T21 vs. CH-P 4 T21	****	< 0.0001
CH+P T21 vs. CH-P 7 T21	****	< 0.0001
CH-P 4 T21 vs. CH-P 7 T21	*	0.0197

Tabla 87. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 21h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

ANEXO III
Tablas de pruebas fisicoquímicas

ANOVA summary	
F	153.8
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 88. Resultados de la prueba estadística (ANOVA paramétrica de un factor) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 24h de estar en contacto con el suero sanguíneo (P<0.05).

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407 T24 vs. CH+P T24	****	< 0.0001
P-407 T24 vs. CH-P 4 T24	**	0.0029
P-407 T24 vs. CH-P 7 T24	***	0.0005
CH+P T24 vs. CH-P 4 T24	****	< 0.0001
CH+P T24 vs. CH-P 7 T24	****	< 0.0001
CH-P 4 T24 vs. CH-P 7 T24	ns	0.2829

Tabla 89. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) aplicada a los datos de % gel erosionado después de 24h de estar en contacto con el suero sanguíneo.

ANEXO IV. Resultados de las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de porcentaje de cierre de las heridas.

1. Resultados de la prueba estadística KW aplicada entre los datos de cada tratamiento por día realizada con el programa GraphPrism.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4539
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 90. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 1 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5051
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 91. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 2 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0965
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 92. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 3 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1101
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 93. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 4 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2771
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 94. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 5 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5111
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 95. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 6 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.51
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 96. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 7 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9456
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 97. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 8 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.8262
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 98. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 9 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9381
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 99. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 10 (P < 0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.8845
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 100. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre entre cada tratamiento al día 11 (P < 0.05).

2. Resultados de la prueba estadística KW aplicada entre los datos de cada día por tratamiento realizada con el programa GraphPrism.

ANOVA summary	
F	36.35
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 101. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con SS a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
SSD1 vs. SSD2	ns	0.6132
SSD1 vs. SSD3	*	0.0128
SSD1 vs. SSD4	***	0.0003
SSD1 vs. SSD5	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD6	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD7	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD8	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD9	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD10	****	< 0.0001
SSD1 vs. SSD11	****	< 0.0001

Tabla 102. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con SS a los días 3, 7 y 11.

ANOVA summary	
F	8.522
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 103. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con P-407 a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407D1 vs. P-407D2	ns	> 0.9999
P-407D1 vs. P-407D3	ns	0.9881
P-407D1 vs. P-407D4	ns	0.8461
P-407D1 vs. P-407D5	ns	0.1538
P-407D1 vs. P-407D6	*	0.0254
P-407D1 vs. P-407D7	**	0.0026
P-407D1 vs. P-407D8	**	0.0057
P-407D1 vs. P-407D9	**	0.0051
P-407D1 vs. P-407D10	**	0.0026
P-407D1 vs. P-407D11	**	0.0017

Tabla 104. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con P-407 a los días 3, 7 y 11.

ANOVA summary	
F	12.25
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 105. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CHD1 vs. CHD2	ns	> 0.9999
CHD1 vs. CHD3	ns	0.9965
CHD1 vs. CHD4	ns	0.8707
CHD1 vs. CHD5	*	0.0477
CHD1 vs. CHD6	*	0.0365
CHD1 vs. CHD7	ns	0.08
CHD1 vs. CHD8	***	0.0003
CHD1 vs. CHD9	***	0.0002
CHD1 vs. CHD10	****	< 0.0001
CHD1 vs. CHD11	****	< 0.0001

Tabla 106. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH a los días 3, 7 y 11.

ANOVA summary	
F	19.42
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 107. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH+P a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH+PD1 vs. CH+PD2	ns	0.6177
CH+PD1 vs. CH+PD3	ns	0.9976
CH+PD1 vs. CH+PD4	ns	0.2517
CH+PD1 vs. CH+PD5	*	0.0178
CH+PD1 vs. CH+PD6	***	0.0003
CH+PD1 vs. CH+PD7	****	< 0.0001
CH+PD1 vs. CH+PD8	****	< 0.0001
CH+PD1 vs. CH+PD9	****	< 0.0001
CH+PD1 vs. CH+PD10	****	< 0.0001
CH+PD1 vs. CH+PD11	****	< 0.0001

Tabla 108. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH+P a los días 3, 7 y 11.

ANOVA summary	
F	28.55
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 109. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D2	ns	0.9869
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D3	**	0.008
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D4	***	0.0004
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D5	***	0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D6	****	< 0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D7	****	< 0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D8	****	< 0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D9	****	< 0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D10	****	< 0.0001
CH-P 4D1 vs. CH-P 4D11	****	< 0.0001

Tabla 110. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.

ANOVA summary	
F	7.609
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences stat. significant? (P < 0.05)	Yes

Tabla 111. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica: KW) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.

Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D2	ns	0.9963
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D3	ns	0.1992
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D4	*	0.0326
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D5	**	0.009
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D6	**	0.003
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D7	**	0.0026
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D8	**	0.0099
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D9	**	0.0064
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D10	***	0.0009
CH-P 7D1 vs. CH-P 7D11	***	0.0005

Tabla 112. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de porcentaje de cierre del grupo tratado con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.

- **Pruebas de estadística de la cuantificación de neutrófilos en la zona de lesión**

Kruskal-Wallis test	
P value	0.691
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 113. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 3 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0697
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 114. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 7(P<0.05).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
SSD7 vs. P-407D7	ns	0.4707
SSD7 vs. CHD7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CH+PD7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
P-407D7 vs. CHD7	*	0.0436
P-407D7 vs. CH+PD7	ns	0.8609
P-407D7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
P-407D7 vs. CH-P 7D7	ns	0.9576
CHD7 vs. CH+PD7	ns	> 0.9999
CHD7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
CHD7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
CH+PD7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
CH+PD7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
CH-P 4D7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999

Tabla 115. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 7.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.6752
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 116. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas al día 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3683
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 117. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.425
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 120. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0508
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 118. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1652
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 121. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.181
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 119. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1746
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 122. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de neutrófilos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

- Pruebas de estadística de la cuantificación de macrófagos en la zona de lesión

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4395
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 123. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 3 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.001
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Tabla 124. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 7 (P<0.05).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
SSD7 vs. P-407D7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CHD7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CH+PD7	ns	> 0.9999
SSD7 vs. CH-P 4D7	ns	0.4269
SSD7 vs. CH-P 7D7	*	0.0727
P-407D7 vs. CHD7	ns	> 0.9999
P-407D7 vs. CH+PD7	ns	> 0.9999
P-407D7 vs. CH-P 4D7	ns	0.7507
P-407D7 vs. CH-P 7D7	ns	0.1519
CHD7 vs. CH+PD7	ns	> 0.9999
CHD7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
CHD7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
CH+PD7 vs. CH-P 4D7	ns	> 0.9999
CH+PD7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
CH-P 4D7 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999

Tabla 125. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 7.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0558
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 126. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas al día 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0107
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3

Tabla 127. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0302
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3

Tabla 129. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0107
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3

Tabla 131. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
SSD3 vs. SSD7	ns	0.4008
SSD3 vs. SSD11	*	0.0417
SSD7 vs. SSD11	ns	0.7907

Tabla 128. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11.

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
P-407D3 vs. P-407D7	ns	> 0.9999
P-407D3 vs. P-407D11	*	0.0505
P-407D7 vs. P-407D11	ns	0.4845

Tabla 130. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11.

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CHD3 vs. CHD7	ns	0.7907
CHD3 vs. CHD11	*	0.0373
CHD7 vs. CHD11	ns	0.7907

Tabla 132. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1643
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 133. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 ($P>0.05$).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0505
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 134. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 ($P<0.05$).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 4D3 vs. CH-P 4D7	ns	0.1293
CH-P 4D3 vs. CH-P 4D11	ns	0.0918
CH-P 4D7 vs. CH-P 4D11	ns	> 0.9999

Tabla 135. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0607
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 136. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 ($P<0.05$).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 7D3 vs. CH-P 7D7	ns	0.3526
CH-P 7D3 vs. CH-P 7D11	ns	0.0908
CH-P 7D7 vs. CH-P 7D11	ns	> 0.9999

Tabla 137. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de % de macrófagos presentes en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.

- Pruebas de estadística de la cuantificación de la expresión de α -SMA en la zona de lesión

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1908
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 138. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 3 ($P>0.05$).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1638
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 139. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 7 ($P>0.05$).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1075
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 140. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas al día 11 ($P>0.05$).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0714
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 141. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 ($P<0.05$).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
SSD3 vs. SSD7	ns	> 0.9999
SSD3 vs. SSD11	ns	0.4845
SSD7 vs. SSD11	ns	0.0806

Tabla 142. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0607
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 143. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.8964
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 144. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0667
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 145. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0229
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3

Tabla 146. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 4D3 vs. CH-P 4D7	ns	0.3169
CH-P 4D3 vs. CH-P 4D11	ns	> 0.9999
CH-P 4D7 vs. CH-P 4D11	*	0.0387

Tabla 147. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0286
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3

Tabla 148. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 (P<0.05).

Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
CH-P 7D3 vs. CH-P 7D7	ns	> 0.9999
CH-P 7D3 vs. CH-P 7D11	ns	0.6147
CH-P 7D7 vs. CH-P 7D11	*	0.0675

Tabla 149. Resultados de la prueba estadística de comparación múltiple (Dunn) aplicada a los datos de área marcada por α -SMA en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11.

- **Pruebas de estadística de la cuantificación de la expresión de TGF- β_3 en la zona de lesión**

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5195
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 150. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 3 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.653
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 151. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 7 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4455
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6

Tabla 152. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas al día 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3619
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 153. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con SS a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9286
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 156. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH+P a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2205
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 154. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con P-407 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.791
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 157. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH-P 4 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4393
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 155. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

Kruskal-Wallis test	
P value	0.409
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3

Tabla 158. Resultados de la prueba estadística (ANOVA no paramétrica) aplicada a los datos de % de expresión de TGF- β_3 en las heridas tratadas con CH-P 7 a los días 3, 7 y 11 (P>0.05).

ANEXO V. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica que permite analizar la presencia específica de proteínas en tejidos; la cual, como su nombre lo dice, *Histo*= tejido e *Inmunoquímica*= reacción antígeno-anticuerpo, utiliza la interacción específica entre la proteína en estudio y su anticuerpo correspondiente para poder visualizarla en muestras biológicas complejas [133].

Los antígenos son por definición, moléculas a las que se unen los anticuerpos (formas secretadas de las proteínas conocidas como inmunoglobulinas). Todos los tipos de macromoléculas funcionan como antígenos. Cada uno de los anticuerpos es específico, ya que cada anticuerpo puede unirse a un solo antígeno o a un número pequeño de antígenos diferentes. La parte de un antígeno a la que se une un anticuerpo se llama determinante antigénico o epítopo.

La unión de los antígenos a los anticuerpos se basa solamente en fuerzas no covalentes, es decir, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van de Waals, e interacciones hidrófobas. La especificidad y la potencia de un anticuerpo contra su antígeno determinan que los anticuerpos sean reactivos útiles para detectar y cuantificar un antígeno determinado cita janeway.

Los dos métodos comunes de detección utilizados en la IHC son la inmunofluorescencia (IF) y la tinción inmunoenzimática (también llamada inmunohistoquímica). En la IF, el anticuerpo de detección se encuentra acoplado a una molécula que emite fluorescencia (ver Fundamentos de fluorescencia); mientras que en la tinción inmunoenzimática, el anticuerpo de detección está conjugado a una enzima que activa a un cromógeno como fosfatasa alcalina o peroxidasa.

Las estrategias de detección utilizadas durante la IHC se dividen en directas o indirectas. El método de detección directo utiliza un anticuerpo marcado, que tiene la capacidad de emitir fluorescencia o activar un cromógeno químico, que se une directamente a la proteína en estudio. Este método es simple; sin embargo, presenta baja especificidad en la unión. Los métodos indirectos utilizan un

anticuerpo primario que no está marcado, el cual se une inicialmente a la proteína y que es reconocido por un anticuerpo secundario que sí está acoplado a un fluoróforo o a una enzima. Este método permite amplificar la señal, lo que resulta en un incremento de la sensibilidad de la prueba.

Los pasos básicos del protocolo de una inmunohistoquímica son (Fig. 88):

1. Preparación de las laminillas con los tejidos: Deparafinar y rehidratar las muestras.
2. Recuperación del antígeno: A pesar de que la fijación es un paso crítico para mantener la integridad del tejido, usualmente enmascaran los epítomos de las proteínas al inducir modificaciones químicas, alteraciones conformacionales o agregación de proteínas. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos en IHC presentan un paso de recuperación del antígeno o exposición de epítomos. Las principales técnicas para realizarlo son por calor o aplicación de proteasas.
3. Bloqueo de sitios no específicos: Aunque los anticuerpos muestran afinidad preferencial para epítomos específicos, los anticuerpos se pueden unir parcial o débilmente a sitios no específicos en las proteínas (también llamados sitios reactivos) que son similares a los sitios de unión del antígeno blanco. En este contexto, uniones no específicas pueden enmascarar la detección del antígeno diana. Para reducir la tinción de fondo, las muestras se incuban con una solución amortiguadora que bloquea los sitios reactivos a la que los anticuerpos primarios o secundarios se pueden unir. BSA es una solución de albúmina de suero bovino al 10% de alta calidad (BSA). BSA es un agente de bloqueo comúnmente utilizado para todas las aplicaciones de inmunoensayo [169].
4. Inmunodetección: Anticuerpo primario y anticuerpo secundario.
5. Medio de montaje.
6. Observación de la muestra en el microscopio.

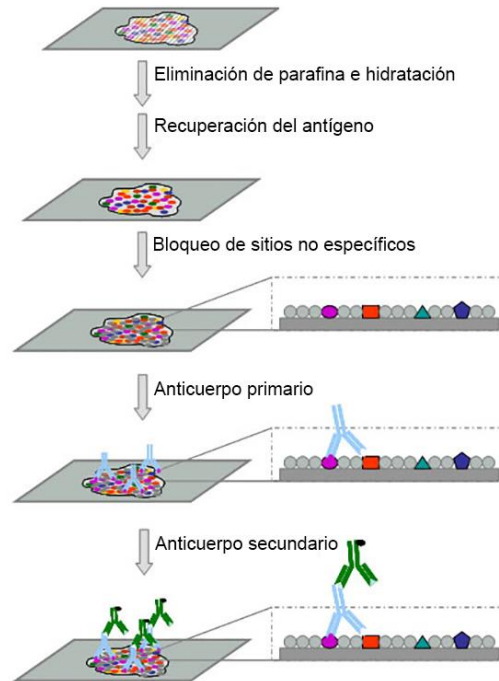


Figura 88. Diagrama que muestra los pasos básicos para realizar una inmunohistoquímica (Modificada de [170])

Inmunofluorescencia

Fundamentos de fluorescencia

La fluorescencia es, por definición, un proceso de emisión de luz espontánea que ocurre nanosegundos después de la absorción de luz (fotones) con una longitud de onda diferente. Un enfoque útil para entender el proceso de absorción/excitación y emisión es por medio de niveles de energía [171]. Los niveles de energía se identifican como S_n , donde n es el número cuántico principal y S_0 es, por supuesto, el estado fundamental del átomo. Suponiendo que es posible obtener un átomo en un estado excitado, S_n , al incidir energía de luz ($S_n - S_0$) en él. La frecuencia, ν , y longitud de onda, λ , de esta luz pueden determinarse por la ley de radiación de Planck, es decir,

$$S_n - S_0 = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

donde h es la constante de Planck. Una vez en el estado excitado, la átomo se quedará allí por un tiempo para después regresar al estado fundamental emitiendo una luz de longitud de onda idénticos que corresponde a la fluorescencia como se observa en la figura 89A [172].

Por otro lado, las moléculas orgánicas que son fluorescentes presentan muchos estados vibracionales, por lo tanto, los niveles de energía se convierten en bandas (Fig.89B). Esto hace que los espectros de absorción y emisión se amplíen. En un escenario típico, una molécula que se encuentra en el nivel más bajo de energía del estado fundamental, puede absorber luz de una longitud de onda, llevándola a un nivel vibracional del estado excitado, es decir, la energía absorbida puede mover un electrón a un orbital diferente que en promedio se encuentra más alejado del núcleo; esta transición a un estado excitado también genera vibraciones moleculares en las cuales las distancias internucleares varían con el tiempo. Eventualmente, toda la energía absorbida debe salir, y las principales formas en las que una molécula vuelve a su estado fundamental de baja energía son relajación vibracional y emisión de fluorescencia. Por último, al estar sin energía, regresa al nivel vibracional más bajo del estado fundamental.

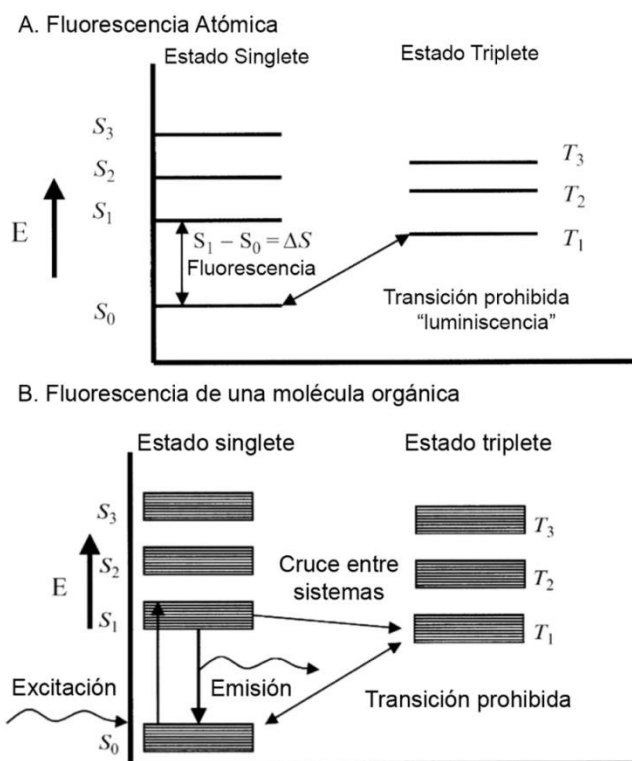


Figura 89. Diagramas de Jablonski que muestran (A) los niveles de energía de un átomo fluorescente hipotético, en donde los niveles de energía y las líneas espectrales que se producen son discretos, y (B) los niveles de energía de una molécula orgánica hipotético, que en contraste con los de la energía atómica, se amplían por el gran número de estados vibracionales que existen en la molécula (Modificada de [172]).

Además de ampliar los espectros, estos niveles vibracionales resultan en otros fenómenos interesantes. En primer lugar, la energía de emisión es menor que la de excitación, y por ende, la luz emitida tiene una longitud de onda más larga que la de excitación. Esto se conoce como el desplazamiento de Stoke (Fig. 90).

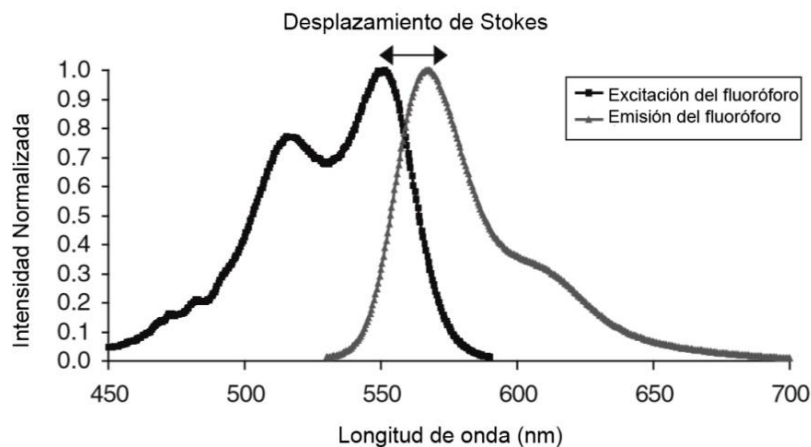


Figura 90. Espectro de fluorescencia molecular que ilustra la ampliación de las líneas espectrales debido a los niveles de energía vibracionales y el desplazamiento de Stoke entre los picos máximos de excitación (Modificada de [172]).

Y en segundo lugar, la forma del espectro de excitación refleja la distribución de los niveles vibracionales del estado excitado, mientras que la forma del espectro de emisión refleja la distribución de los niveles de energía del estado fundamental [172].

Microscopía de fluorescencia

Una vez explicado el fenómeno de la fluorescencia, es posible describir el fundamento de la microscopía, la cual requiere que el objeto de interés emita fluorescencia mediante moléculas mejor conocidas como fluoróforos. Estas moléculas presentan las siguientes propiedades espectroscópicas: espectro de excitación, absorción y emisión, coeficiente de extinción (capacidad de absorción de luz a una longitud de onda específica), rendimiento cuántico de fluorescencia (QY, número de fotones de fluorescencia emitidos por fotón de excitación absorbido), extinción (pérdida de la señal de fluorescencia debido a las interacciones de corto alcance entre el fluoróforo y el entorno molecular local, incluyendo otros fluoróforos) y fotodegradación (destrucción del fluoróforo excitado debido a la generación de ROS). El espectro de excitación de fluorescencia de

una sola especie de fluoróforo en solución diluida es generalmente idéntico a su espectro de absorción. En las mismas condiciones, el espectro de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación y su intensidad es proporcional a la amplitud del espectro de excitación de fluorescencia en la longitud de onda de excitación. Todo el proceso de fluorescencia es cíclico, por lo tanto, el mismo fluoróforo puede ser repetidamente excitado y detectado. El hecho de que un solo fluoróforo puede generar miles de fotones detectables es fundamental para la alta sensibilidad de las técnicas de detección de fluorescencia.

El principio del microscopio de fluorescencia es sencillo si se considera el desplazamiento de Stokes: iluminar la muestra con una longitud de onda determinada y filtrar la luz que regresa para solamente ver la longitud de onda de la fluorescencia [171]. En este sentido, el enfoque preferido en los microscopios de fluorescencia modernos es la epi-iluminación. En esta configuración, el objetivo del microscopio no sólo tiene la función de generar la imagen y dar aumento a la muestra, sino que también sirve como el condensador que la ilumina. La figura 91A muestra un microscopio en forma vertical con las partes que lo conforman: una fuente de luz, que envía el espectro de luz completo a la muestra por medio un cubo de fluorescencia que ilumina selectivamente la muestra.

El cubo tiene tres filtros, el filtro de excitación, el espejo dicroico y el de barrera. El espejo divisor de haz dicroico está diseñado para ser utilizado en trayectorias de luz a 45° (Fig. 91B3). En microscopios de fluorescencia ordinarios, el espejo dicroico refleja la luz de longitud de onda corta procedente de la fuente de luz y transmite la luz de longitudes de onda más largas de la fluorescencia emitida. Cada dicroico está diseñado para tener una transición de lo que se refleja a lo que se transmite que reside entre los picos de excitación y emisión del fluoróforo para el que está diseñado.

Con respecto a los dos filtros adicionales: el filtro de excitación (Fig. 91B2) preselecciona las longitudes de onda de excitación del espectro de luz enviados desde la lámpara y el filtro de barrera (Fig. 91B4) sólo permite el paso de la luz de longitud de onda más larga de vuelta al detector. Los tres tipos de filtro son

típicamente filtros de interferencia que tienen selectividad de longitud de onda muy específica [171].

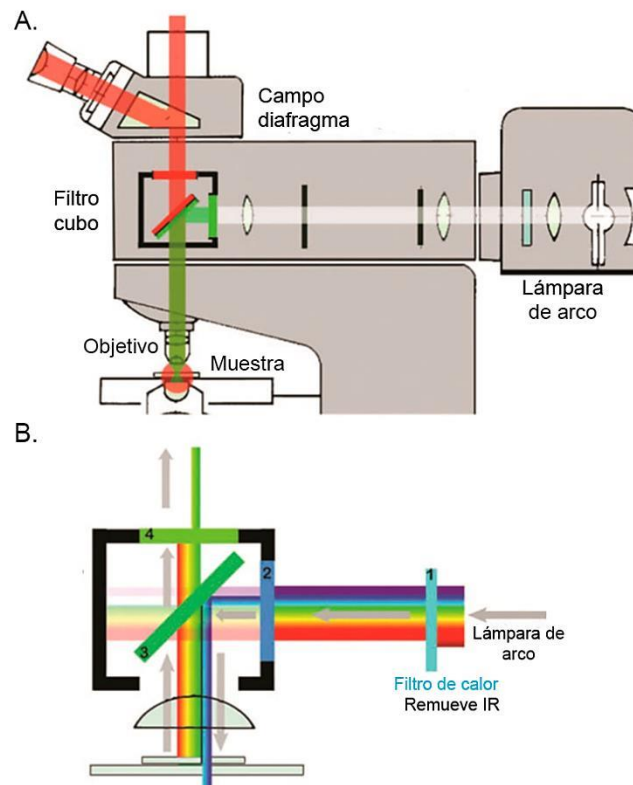


Figura 91. Elementos que componen al Microscopio de epi-iluminación. A: Fuente de luz o lámpara de arco, objetivo/condensador y filtro cubo; y B partes que integran al filtro cubo: excitación (2), el espejo dicróico (3) y barrera (4) (Modificada de [171]).

Fuentes de luz

Existen diversas estrategias para la iluminación de fluorescencia, pero comúnmente se utilizan las lámparas de arco, debido a que proveen las intensidades necesarias para una cómoda visualización o una exposición rápida de la cámara. Las lámparas de mercurio y de xenón son costosas y potencialmente peligrosas, deben mantenerse dentro de una caja especial y requieren fuentes de alimentación.

Dependiendo de las necesidades del investigador, se utilizan la de xenón o la de mercurio. La lámpara de xenón tiene la ventaja de proporcionar una cobertura de longitudes de onda a lo largo del UV, visible e IR cercano; mientras

que la de Mercurio proporciona una fuente de luz espectralmente con picos con varias líneas extremadamente intensas [171].

Fluoróforos

Los fluoróforos son utilizados actualmente como sondas fluorescentes y ofrecen una gran variedad de longitudes de onda, desplazamiento de Stokes y ancho de banda espectral para cumplir los requisitos de la instrumentación actual, mientras que permiten flexibilidad en el diseño de experimentos de marcaje multicolor [173]. Algunos ejemplos de fluoróforos y su aplicación se mencionan a continuación.

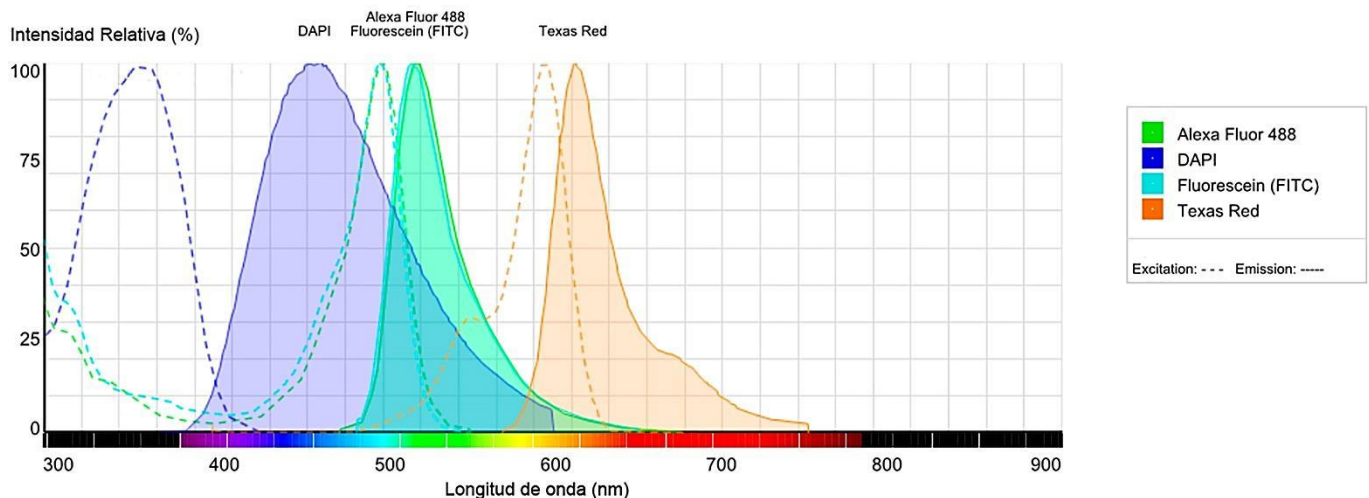


Figura 92. Espectros de excitación y emisión de diferentes fluoróforos: DAPI, Texas Red®, FITC y Alexa Fluor 488. Imagen modificada de <https://www.lifetechnologies.com/mx>

Fluoróforos amino reactivos

Los fluoróforos amino reactivos son ampliamente utilizados para modificar proteínas, péptidos, ligandos, oligonucleótidos sintéticos y otras biomoléculas. Generalmente se utilizan para preparar bioconjugados para inmunquímica, hibridación in situ fluorescente (FISH), rastreo de células, marcaje de receptores y citoquímica analógica. En estas aplicaciones, la estabilidad de la unión química entre el colorante y la biomolécula es crítica, debido a que el bioconjugado típicamente se aplica a un espécimen bioquímicamente complejo, el cual será sometido a una serie de pasos post-procesamiento, tales como lavado, permeabilización, fijación y montaje, durante los cuales debe mantenerse la

integridad del bioconjugado. Adicionalmente, el bioconjugado debe tener preferentemente una emisión alta de fluorescencia y conservar las propiedades funcionales que presentaba la biomolécula antes de ser acoplada al fluoróforo, tales como solubilidad, unión selectiva a un receptor o ácido nucleico, activación o inhibición de una enzima particular o la capacidad de incorporarse en la membrana [173].

Los residuos de lisina son los objetivos principales para la modificación de los grupos amina de las proteínas y tienen la ventaja de ser relativamente abundantes [173].

- Colorantes de Rodamina

Se encuentran entre los reactivos marcadores disponibles más fotoestables. Por otra parte, los espectros de la mayoría de estas moléculas no se ven afectados por cambios de pH entre 4 y 10, una ventaja importante sobre las fluoresceínas. Los miembros más comunes de este grupo han sido las tetrametilrodaminas y derivados como las X-rodaminas. El prefijo X, que incluye a todos los derivados de Texas Red®, se refiere a anillos de julolidina adicionales al fluoróforo. Estos anillos evitan la rotación alrededor de los átomos de nitrógeno, lo que resulta en un cambio en los espectros del fluoróforo a longitudes de onda más largas y por lo general un aumento de su rendimiento cuántico de fluorescencia.

a) Texas Red®

El fluoróforo Texas Red® emite a una longitud de onda de 606-615 nm (Fig. 92) [174] y está particularmente bien adaptado para la excitación por la línea espectral de 594 nm produciendo una fluorescencia de color rojo brillante, que a diferencia de las otras rodaminas, presenta muy poco solapamiento espectral con la fluoresceína (Fig. 92). Cuando se utilizan los conjuntos de filtros ópticos correctos, los conjugados de Texas Red® son más brillantes y tienen un fondo inferior al de los otros conjugados rojos fluorescentes comúnmente utilizados.

- Colorantes de fluoresceína

- a) FITC

La fluoresceína es un fluoróforo verde brillante que es sensible a cambios en el pH y puede fotodegradarse rápidamente a menos que se utilice un agente protector. FITC se excita a unos 490 nm, emite aproximadamente a 525 nm como se observa en el espectro de la figura 92 [175] y es soluble en soluciones acuosas que tienen un pH superior a 6.

A pesar de la disponibilidad de los derivados de fluoresceína alternativos, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) sigue siendo uno de los marcajes fluorescentes más utilizados. La síntesis de isotiocianato de fluoresceína y derivados similares produce una mezcla de isómeros en las posiciones 5 y 6 del anillo de carboxifenil de fluoresceína. Los espectros de ambos isómeros son casi indistinguibles en cuanto a la longitud de onda e intensidad; sin embargo, pueden diferir en la geometría de unión a proteínas, y los conjugados pueden eluir bajo diferentes condiciones cromatográficas o migrar de manera diferente en un gel electroforético. Por lo tanto, ciertas aplicaciones pueden requerir la preparación de un solo isómero. El 5-isómero o "isómero I" de FITC (Fig. 93), es el más ampliamente utilizado, probablemente porque es más fácil de aislar y purificar.

- b) Alexa Fluor® 488 verde fluorescente

Alexa Fluor® 488, ácido carboxílico éster tetrafluorofenilo (TPF, Fig. 93) es un sustituto superior de la fluoresceína y exhibe varias características únicas:

- i. Espectros de fluorescencia casi idénticos a los de fluoresceína (Fig. 92), con máximos de excitación/emisión a 490/525 nm [176] y una vida de la fluorescencia de 4,1 nanosegundos.
- ii. Absorción fuerte, con un coeficiente de extinción superior a 65.000 cmM^{-1} .
- iii. Mayor fotoestabilidad que la fluoresceína, lo que permite más tiempo para la observación y la captura de imágenes.
- iv. Fluorescencia poco sensible al pH (entre pH 4 y 10).
- v. Solubilidad en agua.

- vi. La emisión de fluorescencia es superior en el bioconjugado de proteína, superando a la de cualquier otra proteína marcada con fluoróforo espectralmente similar.

Tinción de ácidos nucleicos

Las tres formas de tinción de los ácidos nucleicos clásicos incluyen:

- i. Colorantes Intercalantes tales como bromuro de etidio y yoduro de propidio
- ii. Colorantes de unión al surco menor, tales como DAPI y los colorantes Hoechst.
- iii. Otros tipos de unión a ácidos nucleicos, tales como naranja de acridina e hidroxistilbamidina.

- Indoles e imidazoles: Colorantes de unión al surco menor

a) DAPI selectivo a AT

DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol; Fig. 93) muestra fluorescencia azul al unirse al DNA y puede ser excitado con una lámpara de arco de mercurio o con las líneas UV del láser de ion argón a 360 nm [177]. La coloración azul fluorescente aparentemente se debe a la asociación con el surco menor del DNA de doble cadena, preferentemente por la unión a grupos AT, aunque hay evidencia de que DAPI también puede unirse a secuencias de DNA que contienen dos pares de bases AT consecutivos. Además se cree que puede actuar como agente intercalante en RNA de forma selectiva a AU. Los complejos de DAPI-RNA presentan una mayor longitud de onda máximas de emisión de fluorescencia que los complejos DAPI-DNA (500 nm comparado con 460 nm). DAPI es muy soluble en agua, pero tiene una solubilidad limitada en PBS.

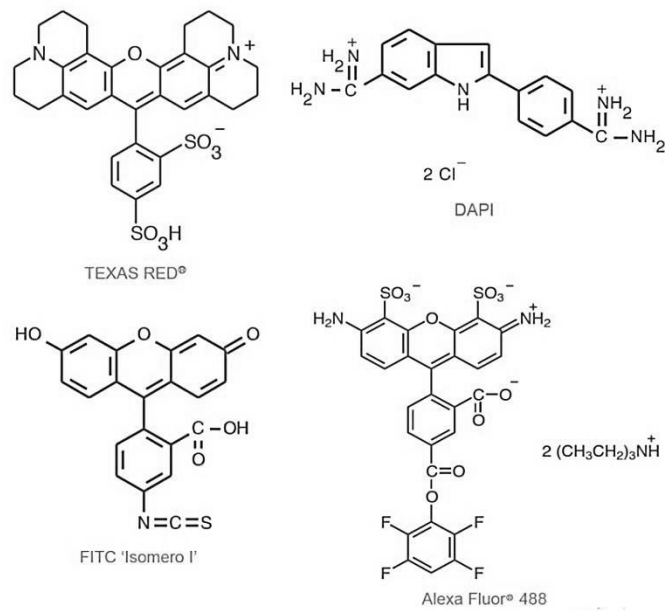


Figura 93. Estructuras de los fluoróforos Texas Red®, DAPI, FITC y Alexa Fluor® 488 (Modificada de [173])