



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL DE POLIETILENGLICOL**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

ESP. JOSÉ LUIS BARRERA BERNAL

TUTOR

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CO-TUTOR

DR. DAVID MASUOKA ITO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CIUDAD UNIVERSITARIA. CD.MX. JUNIO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme desarrollarme académica, personal y profesionalmente.

Al Laboratorio de la Dra. Piña Barba del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, en particular al Dr. David Giraldo por su ayuda para liofilizar los hidrogeles. Al Laboratorio de Análisis Térmicos del mismo Instituto por su ayuda para la realización del TGA y el DSC.

Al Laboratorio de Biomateriales Dentales de la DEPEl de la Facultad de Odontología de la UNAM, en particular al Dr. Carlos Andrés Álvarez Gayosso por permitirme realizar los ensayos mecánicos del hidrogel.

Al programa UNAM DGAPA-UNAM: PAPIIT IT203618 por el financiamiento otorgado al proyecto para la realización de esta tesis.

A los programas UAA: PIBT17-7, PISP19-1, PIBB20-8 por el financiamiento otorgado al proyecto para la realización de esta tesis.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por abrirme las puertas de su laboratorio. Y, más allá de sus enseñanzas de carácter estrictamente académico (las cuales sobra decir que fueron muchas y muy atinadas), por mostrarme que la calidez humana no está peleada con el perfil de un académico-investigador, mi eterna gratitud.

Al Dr. David Masuoka Ito, por brindarme su amistad y su conocimiento, gracias por revolucionar las cosas en mi alma máter, esa sacudida nos despertó del letargo en el que estábamos. *“Acometer las tinieblas para transfigurarlas en luz...”*.

Al Dr. Eduardo Villareal, el Dr. Fernando Suaste, la Dra. Patricia González, la Dra. Janeth Serrano, la Dra. Silvia Maldonado, y al resto de los académicos del programa, por compartir sus enseñanzas conmigo.

Al comité tutorial y al jurado de esta tesis, por sus aportaciones para enriquecer este trabajo a pesar de su apretada agenda.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a Febe, Osmar y Laurita por apoyarme en la realización de mi proyecto, por las risas, y la “carrilla” que forja el carácter.

A mis compañeros de generación Lucy, Diana, Daniela e Íñigo, por todos esos pequeños momentos que enriquecen la vida, ¡ha sido un gran viaje!

A Paola, mi compañera, mi amante, mi musa, mi eternidad, mi risa y mis plegaras, mi amor, mi estabilidad y mi delirio, gracias por decidir quedarte a mi lado.

**Dedicatoria:**

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento, por guiarme desde mis primeros pasos, por sus consejos y sus enseñanzas, por ayudarme a levantarme en los momentos difíciles, y claro, también por los buenos momentos que compartimos, ¡éste trabajo es para ustedes!

### Tabla de Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
GAGs	Glucosaminoglicanos (por sus siglas en inglés "Glycosaminoglycans")
PGs	Proteoglicanos (por sus siglas en inglés "Proteoglycans")
RGD	Motivo Arginina-Glicina-Aspartato
LM	Laminina
FN	Fibronectina
HSPG	Proteoglicano heparán sulfato
CATM	Complejo articulación temporomandibular
MEC	Matriz extra celular
PEG	Polietilenglicol
PEG-D	Polietilenglicol diaminado
PEG-PPG-PEG	Polietilenglicol-polipropilenglicol-polietilenglicol
CD	Complejo de diferenciación (por sus siglas en inglés "Cluster of differentiation")
PRP	Plasma rico en plaquetas (por sus siglas en inglés "Platelet rich plasma")
PRFC	Plasma rico en factores de crecimiento (por sus siglas en inglés "growth factors rich plasma")
GFs	Factores de crecimiento (por sus siglas en inglés "Growth factors")
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ (por sus siglas en inglés "Transforming growth factor $\beta$ ")
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (por sus siglas en inglés "Platelet derived growth factor")

IGF	Factor de crecimiento insulínico (por sus siglas en inglés "Insulinic growth factor")
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial (por sus siglas en inglés "Vascular endothelial growth factor")
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés "Fibroblastic growth factor")
PLA	Poliácido láctico
PCL	Policaprolactona
PVA	Polivinilalcohol
PAA	Poliácido acrílico
PAAm	Poliacrilamida
MPa	Mega Pascales
N	Newtons
Nm	Nanómetros
BCA	Ácido bicinconínico
SDS/PAGE	Sodio dodecil sulfato, poliacrilamida gel electroforesis
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
SEM	Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en inglés "scanning electron microscopy")
TGA	Análisis termogravimétrico por sus siglas en inglés "Thermogravimetric analysis")
DSC	Calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés "differential scanning calorimetry")
BSA	Albúmina bovina sérica (por sus siglas en inglés "bovine serum albumin")
TCP	Plato de cultivo (por sus siglas en inglés "tissue culture plate")

## Índice:

1.- Resumen.....	9
2.- Abstract.....	11
3.- Introducción.....	12
4.- Marco teórico.....	13
4.1.- Cartílago.....	12
4.1.1.- Células.....	14
4.1.2.- Fibras.....	14
4.1.3.- Sustancia Fundamental.....	16
4.1.4.- Propiedades Mecánicas del Cartílago.....	16
4.1.5.- Cartílago en Enfermedad.....	17
4.1.6.- Enfoques Regenerativos Para Cartílago.....	18
4.2.-Ingeniería de Tejidos.....	19
4.2.1.- Células.....	19
4.2.2.- Moléculas.....	20
4.2.2.1.- Plasma Rico en Factores de Crecimiento.....	21
4.2.3.- Andamios.....	23
4.3.- Hidrogeles.....	24
4.3.1.- Hidrogeles Naturales.....	25
4.3.2.- Hidrogeles Sintéticos.....	25
4.3.2.1.- Polietilenglicol.....	26
4.3.2.2.- Polietilenglicol Diaminado.....	28
4.3.2.3.- Polietilenglicol-Polipropilenglicol-Polietilenglicol.....	29

5.- Antecedentes.....	30
6.- Planteamiento del Problema.....	31
7.- Justificación.....	33
8.- Hipótesis.....	34
9.- Objetivo General.....	35
9.1.- Objetivos Específicos.....	35
10.- Metodología y diseño de estudio.....	36
11.1- Diseño de estudio.....	36
11.1.1.- Tipo de estudio.....	36
11.1.2.- Diseño de estudio.....	36
11.2.- Universo de estudio.....	36
11.3.- Variables dependientes.....	36
11.4.- Variables independientes.....	36
11.4.- Criterios de inclusión.....	36
11.5.- Criterios de exclusión.....	36
11.6.- Criterios de eliminación.....	36
12.- Materiales y Métodos.....	37
12.1.- Obtención del PRFC.....	37
12.2.- Caracterización del PRFC.....	37
12.2.1.- Cuantificación de Proteínas.....	37
12.2.2.- Electroforesis SDS-PAGE.....	38
12.2.3.- Análisis Mediante FTIR.....	39
12.3.- Síntesis del Hidrogel.....	40
12.4.- Caracterización Físico Química del Hidrogel.....	41
12.4.1.- FTIR.....	41
12.4.2.- TGA.....	41



12.4.3.- DSC.....	42
12.4.4.- SEM.....	42
12.4.5.- Equilibrio en Rango de Hinchamiento.....	43
12.4.6.- Hinchamiento.....	43
12.4.7.- Ensayo Mecánico Compresión.....	44
12.4.8.- Ensayo Mecánico de Tracción.....	44
12.5.- Caracterización Biológica.....	45
12.5.1.- Adhesión.....	45
12.5.2.- Viabilidad.....	46
12.6.- Análisis Estadístico.....	46
13.- Resultados.....	47
13.1.- Caracterización del PRFC.....	47
13.1.1.- Cuantificación de Proteínas.....	47
13.1.2.- Electroforesis SDS-PAGE.....	49
13.1.3.- Análisis Mediante FTIR.....	49
13.2.- Caracterización Físico Química del Hidrogel.....	50
13.2.1.- FTIR.....	50
13.2.2.- TGA.....	53
13.2.3.- DSC.....	54
13.2.4.- SEM.....	55
13.2.5.- Equilibrio en Rango de Hinchamiento.....	55
13.2.6.- Hinchamiento.....	56
13.2.7.- Propiedades Mecánicas.....	57
13.4.- Caracterización Biológica del Hidrogel.....	62

13.4.1.- Adhesión.....	62
13.4.2.- Viabilidad.....	63
14.- Discusión.....	64
15.- Conclusiones.....	69
16.- Referencias Bibliográficas.....	71

## 1.- Resumen

El cartílago es un tejido conectivo especializado con características únicas, el cartílago articular tiene como objetivo revestir las superficies óseas y amortiguar las cargas mecánicas a las que la articulación está sometida. Diversos procesos patológicos afectan al cartílago articular y hasta la fecha no se ha encontrado un método eficiente para regenerarlo. Dentro de los enfoques que buscan regenerar cartílago, se ha propuesto emplear biomateriales, ya sean naturales o sintéticos, que sirvan como andamios para dar cabida a células que, mediante una interconexión porosa adecuada, permitan la formación de nuevo tejido cartilaginoso. Se ha sugerido a los hidrogeles de Polietilenglicol (PEG) debido a sus propiedades deseables ya que son biocompatibles, no tóxicos, no generan respuesta inmunológica, son hidrofílicos y bioinertes ya que no interactúan de forma inespecífica con otras moléculas, además son suaves, y tienen propiedades mecánicas parecidas a las del cartílago. Sin embargo, su principal desventaja es que no permiten controlar su ganancia de agua, lo cual impide que las células se adhieran sobre él, el hinchamiento excesivo también afecta sus propiedades mecánicas de forma dramática. El objetivo de este trabajo fue sintetizar, y caracterizar las propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas de un andamio de PEG-PPG-PEG con gelatina tipo A utilizando glutaraldehído como entrecruzante y funcionalizado con PRFC. Se logró sintetizar los andamios funcionalizados con PRFC con un grado de porosidad adecuado, los hidrogeles se caracterizaron mediante FTIR, TGA, DSC, ensayos mecánicos compresivos y de tracción, y se realizó un ensayo para evaluar la adhesión celular y la viabilidad con células troncales mesenquimales de encía humanas (hGMSCs). Los resultados muestran que el hidrogel de PEG-PPG-PEG logra controlar la ganancia de agua con respecto al PEG-D y la gelatina, lo cual mejora sus propiedades mecánicas. Además, se demostró que someter los hidrogeles al proceso de liofilización no afecta sus propiedades mecánicas, haciendo de éste, un método factible para facilitar su posterior distribución y almacenamiento. Por lo tanto, se concluye que estos hidrogeles tienen un gran potencial para emplearse en el área de ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago o en defectos osteocondrales.

## 2.- Abstract

The cartilage is a specialized connective tissue with characteristics that makes it very valuable, the function of the articular cartilage is absorb mechanical loads. There are many pathological processes that affect the articular cartilage and to date has not found an efficient method to regenerate it. Naturalized or synthetic biomaterials have been proposed as an alternative for cartilage regeneration, they have been used as scaffolds to harbor cells, through an adequate porous interconnection, to achieve the formation of new cartilaginous tissue. Due to its desirable properties, it has suggested polyethylene glycol (PEG) hydrogels as an alternative for this purpose, which are in general biocompatible, non-toxic, they do not generate immune responses, are hydrophilic and bioinert and do not interact non-specifically with other molecules, in addition to being soft, and having mechanical properties similar to those of cartilage. However, its main disadvantage is that they don't allow control the quantity of water that they uptake, therefore, they have an excessive swelling, that inhibit the capacity of the cells to adhere on the hydrogel, the swelling also affects its mechanical properties dramatically. The aim of this thesis work was to synthesize and characterize the physicochemical, mechanical and biological properties of a PEG-PPG-PEG scaffold with type A gelatin, and glutaraldehyde as cross-linking agent, and functionalized with plasma rich in growth factors (PRGF). It was possible to synthesize scaffolds functionalized with PRGF with a suitable degree of porosity, hydrogels were characterized by FTIR, TGA, DSC, mechanical, compressive and tensile tests, and an assay was performed to evaluate cell adhesion and viability with human gingival mesenchymal stem cells (hGMSCs). The results show that the PEG-PPG-PEG hydrogel allows to control the water uptake with respect to PEG-D and gelatin hydrogels, and therefore control the excessive swelling, which improves its mechanical properties. In addition, it was shown that lyophilization of hydrogels does not affect their mechanical properties, making it a feasible method to facilitate their subsequent distribution and storage. Therefore, it is concluded that these hydrogels have a great potential to be used in tissue engineering for the regeneration of cartilage or osteochondral defects.

### 3.- Introducción

El cartílago es un tejido conectivo especializado complejo, que se regenera con dificultad debido a que carece de irrigación sanguínea, además gracias a su macro y microestructura, el cartílago articular presenta propiedades mecánicas únicas que le permiten soportar las complejas fuerzas a las que está sometido, por lo tanto, representa un verdadero reto buscar su regeneración.

Para ello se han probado diferentes enfoques cada uno con ventajas y desventajas propias. Si bien los autoinjertos evitan respuestas inmunes innecesarias, no siempre hay tejido donador suficiente en buen estado, además este procedimiento deja un nuevo defecto y puede requerir una segunda herida quirúrgica, si no está en la misma zona del defecto. Los aloinjertos y xenoinjertos pueden producir respuestas inflamatorias o inmunes. Por lo tanto, se ha propuesto la utilización de diversos biomateriales que busquen no solo sustituir, sino además regenerar el cartílago dañado o perdido, enmarcados en el enfoque de la bioingeniería de tejidos

En ese sentido, debido a sus características, es decir, que son biocompatibles, que son biodegradables, su ausencia de toxicidad, su suavidad, y que son hidrofílicos, los hidrogeles se postulan como un candidato ideal para regenerar tejido cartilaginoso. Desafortunadamente los hidrogeles presentan una gran desventaja, ya que, al no controlar su ganancia excesiva de agua, se hinchan en exceso, lo cual afecta drásticamente sus propiedades mecánicas y biológicas.

Razón por la cual se ha buscado controlar la ganancia excesiva de agua desde diferentes enfoques, uno de los más novedosos es el uso de agentes que gracias a su estructura química presentan un comportamiento anfipático, tal es el caso del polietilenglicol-polipropilenglicol-polietilenglicol, que en su parte intermedia contiene un grupo metilo, el cual reduce significativamente su afinidad por el agua.

## 4.- Marco teórico

### 4.1.- Cartílago

El cartílago es un tejido conectivo especializado de sostén avascular y no innervado, que está formado por células, fibras y sustancia fundamental. Posee una matriz extracelular flexible y firme, cuya consistencia le permite resistir tensiones mecánicas sin que se distorsione de manera permanente. Presenta un pericondrio, que es una membrana formada por fibras colágenas que rodea al cartílago, y es responsable de la formación de la matriz cartilaginosa. Dentro de sus funciones se encuentran dar soporte para órganos (tráquea, bronquios, etc.), revestir superficies articulares, y además es importante para la formación, desarrollo y crecimiento de los huesos (osificación endocondral). Junto con el tejido óseo participa en el sostén del cuerpo, porque están íntimamente asociados en el sistema locomotor(1).

Existen tres tipos de cartílago: hialino, elástico y fibroso.

1. Hialino: es el tipo de cartílago más abundante, (vías respiratorias, superficies articulares, cartílago en crecimiento de huesos, esqueleto en feto).  
Está compuesto por una matriz cartilaginosa transparente debido a que la sustancia intercelular amorfa y en las fibras de colágena (tipo II) tienen casi el mismo índice de refracción.
2. Elástico: este tipo de cartílago se localiza en la oreja, pared del canal auditivo, epiglotis. El cartílago elástico es casi idéntico al hialino con excepción de que además de la colágena tipo II, tiene fibras elásticas, lo que da un color amarillento.
3. Fibroso: se localiza en discos intervertebrales, sitios de inserción de algunos ligamentos, sínfisis del pubis. Se asocia siempre con tejido conectivo denso regular. Los condrocitos se encuentran en hileras entre abundantes fibras colágenas (tipo I), la sustancia amorfa es poco abundante. Las fibras colágenas se disponen en forma regular por lo que es difícil identificar el pericondrio.

El cartílago crece por medio de dos mecanismos, intersticial y por aposición.

1. Crecimiento intersticial: se logra mediante la síntesis de matriz cartilaginosa por parte de los condrocitos.
2. Crecimiento por aposición: se obtiene mediante la síntesis de matriz cartilaginosa a partir de los condrocitos que se localizan en el pericondrio.

#### **4.1.1.- Células**

El tejido cartilaginoso está compuesto por tres células principales que son:

- a) Células condrogénicas: derivadas de células mesenquimales, son precursores de los condroblastos y producen la matriz extracelular del cartílago.
- b) Condroblastos: localizados en la superficie cartilaginosa (pericondrio), al dividirse dan origen a los condrocitos. Son células redondas muy activas metabólicamente, con un núcleo de gran tamaño y una alta concentración de nucleolos, su citoplasma es basófilo y contiene abundantes mitocondrias.
- c) Condrocitos: localizados en espacios (lagunas) de la matriz cartilaginosa llamadas condroplasmas o condroceles, se originan a partir de los condroblastos cuando estos sintetizan sustancia intercelular, son más pequeños que los condroblastos y de forma ovoidea, son poco activos metabólicamente(1).

#### **4.1.2.- Fibras**

Algunos autores consideran a las fibras como parte de la sustancia fundamental por ser un elemento extracelular que brinda soporte a las células, pero a diferencia de ésta, cuenta con una estructura bien formada, ya sea que se acepte esta clasificación o que se les considere como un componente por separado, las fibras son indispensables para brindarle al cartílago sus propiedades. Existen principalmente tres tipos de fibras que conforman el cartílago, las fibras de colágena, las fibras elásticas y las fibras reticulares, siendo las primeras las más abundantes y por lo tanto las más estudiadas.

La proteína más abundante en mamíferos (colágena), provee la resistencia a la tensión de la matriz extracelular (MEC), mientras que otras proteínas, tales como elastina, dan a la MEC su elasticidad. Dos terceras partes del componente fibrilar está formado por colágena, principalmente la colágena tipo II, pero en el cartílago maduro además se encuentran los tipos III, VI, IX, X, XI, XII y XIV. En el cartílago en desarrollo se observan principalmente los tipos II, IX y XI(2).

La colágena tiene múltiples dominios que favorecen la adhesión, tal es el caso del motivo Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocido por integrinas de superficie celular. La colágena contiene los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, que pueden funcionar como marcadores específicos para ésta proteína, además las fibras colágenas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno y puentes de pirodinolina, entre las hidroxilisinis y la lisina(3).

Las células se unen a la MEC principalmente a través de proteínas de adhesión como la laminina (LM) y fibronectina (FN). La laminina tiene un trímero estructural en forma de cruz que contiene cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , es la proteína adhesiva en la lámina basal con sitios de unión para receptores de membrana celular y colágena tipo IV, proteoglicano heparán sulfato (HSPG) y entacina. La Fibronectina está relacionada evolutivamente al fibrinógeno. La fibronectina es un dímero en forma de V con varios dominios de unión para mediar la conexión entre la MEC y membrana celular, y se une a una variedad de proteínas como colágena y fibrina, así como receptores de superficie celular como integrinas y sindecano(4).

Los componentes de la MEC se someten a auto ensamblaje, así como a ensamblaje dirigido por células para formar redes 3D organizadas y complejas. Los receptores celulares se unen a vías de señalización tanto solubles como atadas, provenientes del entorno de la MEC. Las interacciones de ligandos desencadenan cascadas complejas de reacciones enzimáticas intracelulares que regulan la expresión de genes y proteínas y definen el destino de una célula en un tejido. Simultáneamente, las células envían señales para construir y degradar activamente su microambiente. Por lo tanto, la MEC actúa no sólo como un simple relleno de espacio y un andamio mecánico para las células, sino también como un medio bioactivo y dinámico que media funciones celulares.



#### **4.1.3.- Sustancia Fundamental**

También llamada matriz cartilaginosa, conforma junto a las fibras la matriz extracelular del cartílago, es similar a la sustancia intercelular amorfa de otros tejidos conectivos, es sintetizada por los condroblastos y condrocitos. Dependiendo de la zona y del tipo de cartílago, su concentración varía entre 60-80%. Sus principales componentes son los glucosaminoglicanos como el ácido hialurónico, condroitín 4 y 6 sulfato, además del queratán sulfato. Glicoproteínas como la condronectina y proteoglicanos como el agregano. La función principal de la sustancia amorfa es servir como amortiguador para soportar cargas mecánicas importantes(1).

Las proteínas de la MEC están embebidas en sustancias de altas cargas negativas, ricas en polisacáridos, de suelo gelatinoso llamadas glicanos, que incluyen a los glucosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos (PGs). Los GAGs son polímeros lineales de repeticiones derivadas de disacáridos con dos tipos, no sulfatadas como el ácido hialurónico (HA) y sulfatadas como el condroitín, queratán, dermatán y queratán sulfato. Las GAGs sulfatadas pueden unirse a proteínas ricas en serina para formar proteoglicanos (PGs) tales como agreganos y heparán sulfato. Tanto las GAGs como las PGs se hinchan en los espacios acuosos entre las proteínas fibrilares, absorbiendo cargas compresivas, limitando el colapso de tejidos bajo presión. Los glicanos además permiten a los tejidos difundir nutrientes y proveer un reservorio para moléculas de señalización(4).

#### **4.1.4.- Propiedades Mecánicas del Cartílago**

El cartílago es un tejido complejo formado por varios componentes que hacen difícil dilucidar su comportamiento mecánico, además sus propiedades cambian cuando entra en un estado patológico. Al igual que el hueso, el cartílago es un material anisotrópico, por lo tanto, dependiendo de la zona a estudiar manifiesta un comportamiento mecánico diferente. Por ejemplo, al cartílago que recubre las superficies óseas del complejo articular temporomandibular (CATM) se divide en 4 zonas, la zona más superficial o externa se caracteriza por tener condrocitos aplanados y fibras de colágena acomodadas de forma paralela al hueso que

recubre, la zona subsiguiente se caracteriza por tener condrocitos redondos, fibras colágenas dispuestas de forma irregular y una alta concentración de proteoglicanos, en la zona siguiente las fibras están de forma perpendicular a la superficie ósea y finalmente se encuentra una zona parcialmente mineralizada que está en contacto con tejido óseo propiamente dicho. Cada zona manifiesta propiedades mecánicas diferentes.

En un estudio realizado por Singh y Detamore encontraron un módulo elástico de 24 MPa en sentido antero-posterior, y 10 MPa en sentido medio-lateral en la zona superficial de cartílago de condilar porcino, además mediante microscopía de luz polarizada observaron la orientación de las fibras de colágena de dicho tejido, las cuales se encontraron mayoritariamente dispuestas de forma paralela a la superficie, pero en sentido anteroposterior, lo cual explica dicho comportamiento mecánico(5).

En general se ha descrito que los niños pueden alcanzar hasta 10 N de fuerza sobre el cartílago articular del complejo de la articulación temporomandibular (CATM) durante los procesos masticatorios, mientras que los adultos pueden aplicar hasta 150 N(1).

Otro factor importante a considerar es el contenido líquido que entra y sale del tejido cartilaginoso a través de poros, cuando se aplica una carga compresiva el líquido sale del tejido, funcionando como un mecanismo de disipación de la energía. Además, entre mayor concentración de proteoglicanos, éstos funcionan como lubricante de las superficies articulares. La concentración de líquido no cambia con la edad, pero si se ve afectada con procesos patológicos. Los materiales diseñados como andamios para la regeneración de cartílago, además de cumplir con los requisitos de carácter biológico, deben asemejarse a las propiedades mecánicas del tejido a restituir, especialmente cuando estarán sometidos a constantes cargas mecánicas.

#### **4.1.5.- Cartílago en Enfermedad**

Existen diversos tipos de patologías o afecciones que dañan al cartílago, desde traumatismos hasta alteraciones en el desarrollo, por ejemplo, mutaciones de los

genes de colágena IX y XI producen condrodisplasia que se caracteriza por alteraciones en la formación de cartílago que puede producir extremidades cortas y baja estatura. Sin embargo, la principal afección del cartílago es la osteoartritis, un padecimiento crónico degenerativo en el cual se da una destrucción gradual del tejido que recubre las superficies articulares, y por lo tanto produce dolor, deformidad y finalmente incapacidad funcional. El cartílago se destruye por desgaste mecánico, y en dicho proceso influyen factores como el sobrepeso y la edad del paciente, además esta patología se ve favorecida por la actividad enzimática de metaloproteasas y agrecanasas que degradan la matriz extracelular. Si tal como se mencionó previamente, el cartílago sufre daño a nivel estructural, sus propiedades mecánicas también se ven afectadas. En un estudio realizado por Robinson y colaboradores, se identificó una correlación entre el daño a nivel histológico y la disminución de la rigidez del tejido, es decir, a medida que se incrementa el daño del tejido, su módulo elástico disminuye (6, 7).

#### **4.1.6.- Enfoques Regenerativos Para Cartílago**

La regeneración del cartílago de forma natural por parte del organismo es compleja y se lleva a cabo con dificultad y de forma incompleta, con excepción de los niños, ya que como se mencionó previamente, el cartílago carece de irrigación e inervación, por lo tanto, depende del pericondrio como fuente de nutrientes para que los condroblastos sintetizen nueva matriz extracelular. En el caso del cartílago articular, cuando se da un proceso regenerativo en lugar del cartílago hialino que normalmente recubre las superficies articulares, el nuevo tejido formado suele ser fibrocartílago, el cual es más menos resistente mecánicamente.

Dentro de los enfoques regenerativos, el estándar de oro es el injerto autólogo osteocondral, obtenido de la misma articulación que se desea reparar, pero de una zona sin carga mecánica. Su principal ventaja es que evita el rechazo y la respuesta inflamatoria generada por partículas producto del desgaste de materiales empleados como sustitutos, ya sean metálicos o poliméricos. Entre sus desventajas se encuentran: (i) crea nuevos defectos, (ii) no está indicada en defectos de gran tamaño, especialmente en pacientes con osteoartritis donde probablemente no hay

cartílago normal disponible, (iii) y no se une al cartílago adyacente, lo que produce inestabilidad en el injerto a largo plazo(8).

En ese sentido, se ha propuesto que los hidrogeles sintéticos pudieran ser una alternativa para promover la regeneración de cartílago, aprovechando las propiedades de estos materiales, como su biocompatibilidad, y sus propiedades mecánicas que se asemejan a la de dicho tejido. Una de las propuestas más novedosas incluye el uso de hidrogeles de forma inyectable, lo que permitiría depositar el material en zonas de difícil acceso sin necesidad de realizar un procedimiento quirúrgico y por lo tanto reduciendo procesos inflamatorios y el tiempo de recuperación. El hidrogel funcionaría como andamio proveyendo a las células de una matriz sintética, que además de cabida a la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante una interconexión porosa adecuada.

## **4.2.-Ingeniería de Tejidos**

La ingeniería de tejidos es un campo emergente en la ciencia, que se enfoca en la creación de condiciones para buscar la regeneración de tejidos que han sido dañados o perdidos ya sea por trauma, o por diversos procesos patológicos, y que ha contribuido a mejorar la calidad de vida de las personas. Representa un mercado con fuertes ganancias y altas expectativas de crecimiento a futuro. Se define como la aplicación de principios científicos para el diseño, la construcción, modificación, el crecimiento y mantenimiento de los tejidos vivos. Por lo tanto, es una ciencia multidisciplinaria donde convergen la medicina, la biología, la ingeniería, la biología molecular, la ciencia de materiales, la odontología, la inmunología, entre otras. Para lograr su objetivo se apoya en tres pilares fundamentales conocidos como la triada de la bioingeniería de tejidos, que son: células, moléculas de señalización y andamiajes, los cuales se desarrollarán a continuación(9).

### **4.2.1.- Células**

Como se mencionó previamente, cuando un grupo de células tienen la misma diferenciación morfológica y las mismas funciones conforman los tejidos, y por lo tanto, son una parte fundamental para buscar la regeneración de éstos, además son

las encargadas de secretar la matriz extracelular, la cual funge como el soporte estructural de las células, en los diferentes tejidos que se desea regenerar, el caso del cartílago es paradigmático en ese sentido, ya que además de dar soporte a las células, en gran parte las propiedades mecánicas del tejido dependen de la MEC. Históricamente se han empleado células troncales en el campo de la bioingeniería de tejidos, aprovechando sus características únicas, es decir, por su capacidad de diferenciarse hacia un linaje celular específico dependiendo de su potencialidad, su habilidad de proliferar, y de autorrenovarse(10).

Para cumplir con sus funciones necesitan de nichos celulares, es decir, microambientes que les permitan adherirse, proliferar y mantenerse en un estado indiferenciado hasta que llegue una señal adecuada que les indique hacia qué fenotipo diferenciarse(11).

Las células troncales mesenquimales son células multipotentes derivadas del mesoderma, y que tienen la capacidad de diferenciarse en varios linajes específicos (osteoblastos, adipocitos, condroblastos, fibroblastos, entre otros). Para ser consideradas células troncales mesenquimales deben ser capaces de migrar, adherirse, proliferar, dividirse, y diferenciarse hacia el linaje celular buscado, además, deben presentar más del 95% de los marcadores CD105, CD75 y CD90, y menos del 2% de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19b(12–15).

Existe cierta controversia acerca de si es más efectivo aplicar células previamente diferenciadas o células troncales indiferenciadas conjuntamente con los andamios, además existen enfoques acelulares en la regeneración de tejidos, aunque no con mucho éxito. Quizá un de las propuestas más novedosos es la impresión de células dentro de un material, usualmente polimérico, ya sea natural o sintético (biotinta), proceso conocido como bioimpresión(16).

#### **4.2.2.- Moléculas**

Existen señales (térmicas, eléctricas, mecánicas, proteínas, péptidos, etc.) que pueden inducir respuestas celulares específicas. Usualmente dichas proteínas se unen a receptores específicos de membrana y mediante una serie de procesos

donde se activan (por ejemplo, mediante fosforilación) diversos componentes, se desencadena lo que se conoce como vías de señalización, cuyo objetivo final es llegar hasta el núcleo y ahí favorecer la síntesis de una proteína implicada con algún proceso celular. Mediante este mecanismo se puede favorecer el crecimiento, diferenciación, proliferación, y migración celular, etc.

Las vías de señalización son complejas y están multi relacionadas entre sí, haciendo el proceso de su estudio algo complejo. Entre las proteínas que pueden desencadenar vías de señalización se encuentran los factores de crecimiento, un ejemplo de ello sería el factor de crecimiento insulínico, que se une a receptores tirosín cinasa para activar la vía mTOR implicada en proliferación, apoptosis, metabolismo de lípidos y regeneración ósea, entre otros procesos(17,18).

#### **4.2.2.1.- Plasma Rico en Factores de Crecimiento**

Los factores de crecimiento (GFs) son polipéptidos que transmiten señales para modular las actividades celulares mediante la activación de diversas vías de señalización. Se ha descrito un gran número de proteínas, pero las más estudiadas son (4):

- Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ): implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión y tras el crecimiento normal y remodelación, además inhibe la formación de osteoclastos. Está presente en la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células mesenquimales y en la síntesis de colágeno por osteoblastos.
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF): promueve la amelogénesis a través de los macrófagos, por quimiotaxis, facilita la formación de fibroblastos formadores de colágeno tipo I. Tiene un efecto mitógeno de células mesenquimales que estimula el crecimiento de tejido conectivo.
- Factor de crecimiento insulínico (IGF): Actúa en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento, también en síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I por osteoblastos.

- Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF): Participa en la quimiotaxis y proliferación de células endoteliales y por lo tanto en la formación de los vasos sanguíneos.
- Factor de crecimiento fibroblástico (FGF): son dos miembros, el FGF1 y el FGF2 básico, ambos son proteínas que se unen a la heparina y ejercen sus efectos mitogénicos sobre las células de origen mesodérmico y neuro dérmico que estimulan la formación ósea, inhibe a los osteoclastos, y favorece la proliferación y diferenciación de osteoblastos, proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina(19).

Las plaquetas son un reservorio natural para los factores de crecimiento, por lo tanto, éstos se pueden obtener ya sea del plasma rico en plaquetas (PRP) o del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC), ambos son agregados plaquetarios. Se encuentran en forma de sobrenadante tras la centrifugación de sangre anticoagulada. Cuando las plaquetas están fisiológicamente activadas, sus gránulos  $\alpha$  gradualmente segregan factores de crecimiento. Sin embargo, la activación de plaquetas por trombina o  $Ca^{+}$  provoca completa liberación no orquestada de factores de crecimiento dentro de las primeras horas, limitando su biodisponibilidad.(20)

Como se mencionó previamente, los GFs inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de las células blanco y necesitan unirse a moléculas de matriz para tener actividad y estabilizarse debido a su vida media corta en forma libre o en la circulación. La mayoría de los GFs están unidos a proteoglucanos, los cuales además modulan su liberación de las cadenas sulfatadas GAG, para guiar las funciones celulares y formación de tejidos.

Los GFs purificados son altamente sensibles a la degradación proteolítica en formas solubles, razón por la cual deben ser liberados de forma sostenida y prolongada, o de otro modo serán degradados y no podrán ejercer su función. Para ello se han empleado diversos vehículos, uno de ellos son los hidrogeles de PEG, debido a que a medida que se van degradando, permiten su liberación de forma controlada.

La manera más fácil de incorporar GFs a hidrogeles de PEG es cargarlos directamente durante la síntesis del material; sin embargo, este método de carga directa normalmente muestra un rápido rompimiento durante la formación del hidrogel. Ya que la tasa de liberación de proteínas es generalmente controlada por difusión a través de canales acuosos dentro del hidrogel, es un gran reto para el método de liberación directa, controlar la liberación de factores de crecimiento durante un largo tiempo sin la liberación de subproductos indeseados.

#### **4.2.3.- Andamios**

Un andamio es un modelo tridimensional que imita a la matriz extracelular, con el objetivo de ser colocado como injerto para regenerar tejidos perdidos o dañados. Los andamios están hechos de biomateriales, considerando como biomaterial, a cualquier material ya sea natural o sintético que debe reunir ciertas características, como no generar una respuesta adversa, inmunogénica o de rechazo, y al mismo tiempo se espera que generen una respuesta celular específica regenerativa. Por lo tanto, tal como reportan Triplett y colaboradores, un andamio debe cumplir ciertos requisitos(9):

1. Ser biocompatible, incluyendo degradación de productos y evitar respuesta inflamatoria.
2. No ser citotóxico, incluyendo al material y sus subproductos.
3. No ser carcinogénico.
4. Que sea esterilizable.
5. Propiedades predecibles físico mecánicas apropiadas para los tejidos que intenta sustituir.
6. Propiedades favorables de manipulación quirúrgica, incluyendo sutura, como requieren los tejidos blandos.
7. Porosidad de al menos 100-200 $\mu$ m para permitir migración celular y vascularización.
8. Histoconductividad: que guíe y estimule proliferación de células progenitoras autógenas que migren de tejidos que rodean al andamio.



9. Histoinductividad: que induzca proliferación y diferenciación de células progenitoras autógenas que migren de tejidos que rodeen al andamio.
10. Tener lugares para unión celular, así como liberación de drogas *in vivo* incluyendo factores de crecimiento y genes.

Desde un punto de vista histórico, los biomateriales han evolucionado por varias generaciones, desde materiales bioinertes, es decir, que no generaban respuestas inmunológicas o tóxicas al organismo, pasando por biomateriales bioactivos y biodegradables, que debían ser capaces de interactuar con diversos tejidos integrándose a éstos, hasta finalmente los biomateriales actuales, que son capaces de inducir respuestas celulares específicas enmarcados en el campo de la bioingeniería de tejidos. Los enfoques más novedosos estudian como algunas de las características de superficie de los biomateriales como la rugosidad o la dureza, pueden desencadenar vías de señalización y/o mediar respuestas inmunológicas.

#### **4.3.- Hidrogeles**

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas tridimensionales de naturaleza altamente hidrofílica. Se emplean en diversas industrias como la química, médica, alimenticia, farmacéutica e incluso agroindustrial. Debido a sus propiedades como biocompatibilidad, no inmunogénicos, y alta absorción de agua, se asemejan a tejidos de consistencia suave, por lo tanto, en bioingeniería de tejidos se han empleado como andamios para regenerar tejido nervioso, vasos sanguíneos, cartílago y piel, entre otros. También se emplean como biotintas, ya que su suavidad ayuda a no estresar demasiado a las células durante la bioimpresión. En general tienen poca resistencia mecánica y módulos de Young bajos, es decir, son muy elásticos. Además, como se mencionó previamente, debido a su alta captación de agua suelen tener un alto hinchamiento, lo cual también produce un detrimento en sus propiedades mecánicas. Existe una clasificación general que divide a los hidrogeles en dos tipos, los naturales y los sintéticos, de acuerdo a su origen y composición. Ambos tipos tienen características únicas que les brindan propiedades diferentes, las cuales se resumen en la tabla 1(21,22).

#### **4.3.1.- Hidrogeles Naturales**

Los hidrogeles naturales están hechos principalmente de materiales a base de polímeros naturales, tales como proteínas (por ejemplo, colágeno, gelatina y fibrina), y polisacáridos (por ejemplo, alginato de quitosano, ácido hialurónico, dextrano) (21).

Los hidrogeles naturales tienen la ventaja de que se degradan fácilmente, y son biocompatibles, además tienen una mejor interacción con las células, no provocan respuestas inmunes ni dañan los tejidos aledaños.

Por otro lado, tienen propiedades mecánicas inferiores a los sintéticos, y además no se puede modificar su estructura química, ni permiten añadir grupos funcionales o proteínas con funciones específicas. Si bien no se puede controlar su grado de porosidad a nivel del entrecruzamiento, si se pueden agregar agentes porógenos como el cloruro de sodio para aumentar su porosidad(22).

#### **4.3.2.- Hidrogeles Sintéticos**

Los hidrogeles sintéticos están hechos a base de polímeros sintéticos, tales como poliácido acrílico (PAA), polietilenglicol (PEG), polivinilalcohol (PVA), poliacrilamida (PAAm), etc. Los hidrogeles sintéticos tienen algunas ventajas sobre los naturales, tales como la habilidad de ser fotopolimerizables, lo cual permite un control conveniente de la arquitectura del andamiaje, el grado de porosidad y de sus propiedades mecánicas(4).

Además, tienen una composición química ajustable, esta versatilidad les permite agregar moléculas de interés, y por lo tanto se puede controlar su capacidad de degradación, e incluso sus interacciones biológicas, ya que algunos polímeros sintéticos son inertes biológicamente. Pueden ser diseñados para aplicaciones específicas, y sus propiedades de transporte pueden además ser personalizadas aumentando la longitud de las cadenas del polímero y su densidad, lo que les permite tener una liberación controlada de fármacos, principios bioactivos, proteínas, y péptidos, entre otros(21).

Ventajas	Desventajas
Biocompatibilidad	Baja actividad biológica
Biodegradabilidad	Baja resistencia mecánica (naturales)
No tóxicos	Se hinchan en exceso con agua
Hidrofílicos	
Flexibilidad	
Buenas propiedades mecánicas (sintéticos)	
Versatilidad (sintéticos)	
Fotopolimerizables (sintéticos)	

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de hidrogeles naturales y sintéticos. Fuente: Zhu J. Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. Biomaterials. 2011;31(17):4639–56.

#### 4.3.2.1.- Polietilenglicol (PEG)

El PEG es un tipo de polímero sintético hidrofílico usado en aplicaciones biomédicas, que permite la modificación de su molécula, lo cual facilita su unión con otros polímeros. Se ha empleado como vehículo en farmacología por su capacidad de tener una liberación controlada, además se emplea en ingeniería de tejidos, por sus propiedades, tales como biocompatibilidad, no generar respuesta inmune, puede fotopolimerizarse en cualquier forma, tiene capacidad para inyectarse y reparar tejidos, y resistencia a la adsorción de proteínas(23).

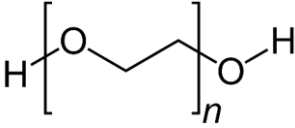
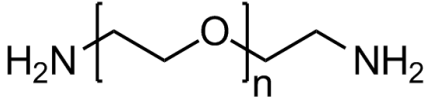
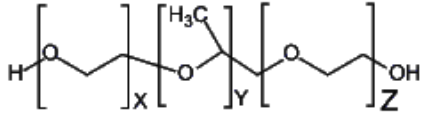
El PEG tiene estructuras lineales y ramificadas (multibrazo o estrella). La estructura básica del PEG es PEG diol con dos grupos hidroxilos terminales (tabla 2), que pueden convertirse en otros grupos funcionales, tales como metiloxilo, carboxilo, amino, tiol, azido, vinilsulfona, acetileno y acrilato. Los dos grupos funcionales terminales pueden ser iguales (simétricos) o diferentes (asimétricos), los cuales son versátiles para la formación de hidrogeles o para conjugarse con biomoléculas(4).

Los hidrogeles de PEG no se degradan naturalmente, pero pueden ser alterados para mejorar su degradación incorporándoles segmentos degradables, tales como poliéster, poli propileno fumarato, acetal y disulfuro. Una selección conveniente de bloques hidrolíticamente degradables son los polihidroxiácidos, que incluyen al poliácido láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y policaprolactona (PCL). Los polímeros tribloque, PLA-PEG-PLA y PGA-PEG-PGA han sido sintetizados por polimerización por ruptura de anillos, terminada con acrilatos para generar PLA-PEG-PLA diacrilato y PGA-PEG-PGA diacrilato respectivamente.

Estos hidrogeles exhiben mínima o nula actividad biológica intrínseca debido a la naturaleza no adhesiva de las cadenas de PEG. Esto se da porque el hidrogel forma una superficie hidratada que inhibe la adsorción de proteínas específicas de adhesión tales como integrinas, y cadherinas(4,24).

Es por ello que se ha buscado funcionalizarlos, al agregarles diversas proteínas de interés buscando promover funciones celulares específicas. El hecho de no interactuar intrínsecamente con proteínas se ha aprovechado para emplearlos como plataforma en diversas aplicaciones biomédicas, desde vehículo para cargar y liberar fármacos, hasta presentar a células troncales moléculas pequeñas, como péptidos o mRNA reduciendo al mínimo las interacciones no específicas con otras moléculas biológicas.

Los hidrogeles de PEG y otras redes inertes de alginato y agarosa han servido como plataformas adaptables para estudiar los efectos de señales derivadas de MEC en el comportamiento de cultivos 3D de células mesenquimales. Sin embargo, aún permanece como un reto identificar eficientemente los ambientes y vías de señalización óptima que mejoren la viabilidad de células madre, y diferenciación hacia líneas celulares específicas y formación de nuevo tejido, especialmente cuando intervienen múltiples vías de señalización, debido a que el enfoque tradicional se basa en estudiar dichos factores por separado o en pequeños grupos. Un reto particular que enfrentan los cultivos celulares 3D es el amplio número de señalizaciones y combinaciones entre estas derivadas de la MEC que pueden influir en el fenotipo celular(25).

Nombre	Molécula
Polietilenglicol (PEG)	
Polietilenglicol Diaminado (PEG-D)	
Polietilenglicol Polipropilenglicol polietilenglicol (PEG-PPG-PEG)	

**Tabla 2.** Nombres, abreviaciones y moléculas de 3 monómeros de polietilenglicol. Fuente: Zhu J. Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. Biomaterials. 2011;31(17):4639–56.

#### 4.3.2.2.- Polietilenglicol Diaminado (PEG-D)

Como se mencionó previamente, los grupos hidroxilo ubicados en los extremos de la molécula de polietilenglicol se pueden sustituir por diversos grupos funcionales, tal es el caso del polietilenglicol diaminado, en el cual se intercambian por dos grupos amino, ubicados de forma simétrica a cada extremo de la molécula (tabla 2). Mediante el empleo de un agente entrecruzante se puede lograr la reticulación de dichos grupos aminos. El glutaraldehído es un agente reticulante ampliamente empleado para entrecruzar cadenas poliméricas. Durante la reticulación se da una interacción entre los grupos amino de la gelatina y el PEG-D, con el carbonilo del glutaraldehído, lo cual implica la formación de un grupo imino, es decir, un doble enlace C=N, la llamada base de Schiff, que se caracteriza por un cambio de coloración conocido como reacción de Millard(26–28).

Recientemente se propuso por Obando y colaboradores el empleo del polietilenglicol diaminado para la elaboración de un hidrogel con aplicación en bioingeniería de tejidos para la reparación de lesiones periapicales. Martín del Campo y colaboradores desarrollaron un hidrogel de PEG-D utilizando glutaraldehído como entrecruzante con potencial para lograr regeneración ósea(29,30).

#### **4.3.2.3.- Polietilenglicol-Polipropilenglicol-Polietilenglicol (PEG-PPG-PEG)**

Los “Poloxámeros”, también conocidos como “Synperincs” o “Pluronics” son un grupo de copolímeros tribloque simétricos que se caracterizan por su naturaleza anfipática, ya que presentan en cada extremo una molécula hidrofílica, mientras que en el centro se ubica una molécula hidrofóbica, ello permite que se comporten como surfactantes. Existen diferentes tipos de poloxámeros debido a la variación en la longitud de sus cadenas, todos ellos con propiedades diferentes.

Los agentes poloxámeros se emplean en diversas aplicaciones dentro de la industria farmacéutica y cosmética aprovechando sus propiedades surfactantes, por ejemplo, para aumentar la solubilidad de aceites o compuestos hidrofóbicos, o para aumentar la miscibilidad de sustancias con diferente hidrofobicidad, además se usan como limpiadores de superficies, como desespumantes en revestimientos y tratamiento de aguas, para lubricar metales, como diluyente para poliésteres y poliuretanos lineales y reticulados, etc.

El Polietilenglicol-Polipropilenglicol-Polietilenglicol con nombre comercial “Pluronic® P123” de peso molecular de 5800 g/mol, pertenece a los poloxámeros ya que al igual que estos, es simétrico y de naturaleza anfipática, pues presenta en los extremos dos moléculas de polietilenglicol (PEG) hidrofílicas, mientras que en el centro se encuentra el polipropilenglicol (PPG) que contiene un grupo metilo de naturaleza hidrofóbica. El bloque de PPG le brinda propiedades termoresponsivas, ya que muestra hidrofobicidad a temperaturas superiores a 14.85°C y solubilidad en agua a temperaturas inferiores a 14.85°C, donde la formación de micelas de copolímeros tribloque PEG-PPG-PEG se ve favorecida por sus características surfactantes(31).

En el área biológica se han aplicado con éxito para realizar transfecciones de material genético, también se ha usado para sintetizar cerámicas mesoporosas como la SBA-15, gracias a sus propiedades como surfactante que le permiten formar micelas que servirán como base para la formación de las cerámicas(32–34).

## 5.- Antecedentes

Se ha propuesto que el copolímero PEG-PPG-PEG pudiera tener potencial para controlar la ganancia excesiva de agua en los hidrogeles gracias a su naturaleza anfipática, ya que, como se mencionó previamente, un hinchamiento excesivo conlleva un detrimento en sus propiedades mecánicas, haciendo al biomaterial más flexible y menos resistente, propiedades importantes si se planea usar para regenerar cartílago articular, el cual estará sometido a cargas mecánicas importantes.

Únicamente existe un estudio previo en la literatura realizado por Truong y colaboradores en el cual se utilizó el copolímero PEG-PPG-PEG sin embargo, ellos propusieron un enfoque en el cual emplearon el agente Pluronic® P123 como entrecruzante, sustituyendo sus grupos funcionales OH por grupos SH (sulfidrilos o tiol) mediante química click, para controlar la ganancia excesiva de agua(31).

Si bien, en dicho estudio lograron resultados prometedores para controlar el hinchamiento y la ganancia excesiva de agua, sus resultados biológicos no fueron satisfactorios, además no realizaron ensayos mecánicos más allá de determinar el módulo de pérdida y el módulo de ganancia de los hidrogeles.

Por lo tanto, se requiere más investigación acerca de cómo mejorar las interacciones biológicas al modificar las concentraciones del Pluronic®, y al intercambiar el agente entrecruzante. Además, se requiere realizar un ensayo mecánico completo donde se analicen las diversas propiedades mecánicas encontradas en la gráfica esfuerzo – deformación, tanto en el rango elástico, como en el plástico.

En este trabajo proponemos un enfoque novedoso en el cual tanto el agente Pluronic® como la gelatina tipo A, se encuentren entrecruzados por el glutaraldehído. Se realizó además la caracterización físico-química, mecánica y biológica del hidrogel.

## 6.- Planteamiento del Problema

Debido al aumento en la esperanza de vida, uno de los principales problemas a nivel mundial es que los pacientes requieren cada vez más servicios de salud, aunado a esto, el incremento en la prevalencia de las enfermedades crónico degenerativas que tienen un efecto nocivo en diferentes órganos y tejidos, conlleva un alto gasto para el sector público por los servicios de atención brindados a estos pacientes. Como se mencionó previamente, el cartílago hialino es fundamental para el correcto funcionamiento de las articulaciones en el cuerpo humano. Debido a su alta prevalencia a nivel mundial, se considera a la osteoartritis como un verdadero problema de salud pública. Se ha establecido que la padece al menos 15% de la población mundial, y es la principal causa de dolor y discapacidad en Estados Unidos(35).

La regeneración de cartílago articular es compleja considerando las propiedades de dicho tejido, en la actualidad se han buscado diferentes alternativas para lograr dicho objetivo, el estándar de oro es el autoinjerto, sin embargo, esta alternativa genera nuevos defectos, y no siempre hay tejido donador disponible. Los biomateriales juegan un rol importante en ese sentido, pues intentan regenerar tejidos u órganos dañados, siempre buscando mejorar la calidad de vida de los pacientes. La industria de los biomateriales está en constante ascenso, debido a que el número de enfermedades y accidentes que requieren sustituir o reemplazar tejidos u órganos aumenta año con año, lo cual ha incrementado tanto la inversión como la investigación en este campo.

Los hidrogeles empleados como andamios han adquirido notoriedad recientemente en el campo de la ingeniería de tejidos, sin embargo, su principal desventaja es su excesiva ganancia de agua, ya que, esto puede producir una disminución en sus propiedades mecánicas, además un excesivo hinchamiento produce una mayor separación de las redes poliméricas, lo que genera una liberación de fármacos o moléculas precargadas de forma poco controlada, el hinchamiento también puede presionar y dañar tejidos aledaños, además de ocluir el flujo de líquidos, y finalmente enviar señales mecánicas indeseadas a las células(31).



Por otro lado, una alta concentración de agua en la superficie del hidrogel genera una pobre interacción biológica, al impedir que se adhieran sobre su superficie proteínas de interés, como las integrinas, necesarias para que las células se unan a la matriz extracelular, o en este caso al andamio que sustituye a la matriz(4).

Por lo tanto, surge la pregunta de investigación ¿Es factible sintetizar un hidrogel de polietilenglicol-polipropilenglicol-polietilenglicol (PEG-PPG-PEG) con gelatina tipo A utilizando glutaraldehído como entrecruzante y funcionalizado con PRFC para fabricar andamios 3D reticulados en rangos micro/nanoestructurados, que permitan controlar la ganancia excesiva de agua?

## 7.- Justificación

Los hidrogeles son biomateriales que podrían emplearse para la regeneración de cartílago debido a sus propiedades deseables, ya que, en general no generan respuesta inmunológica, son biocompatibles, y suaves, además sus propiedades mecánicas se asemejan a las de dicho tejido. De entre ellos, los elaborados a partir de PEG han adquirido recientemente gran interés debido a que se pueden modificar sus OH por otros grupos funcionales, dándole de esta forma nuevas e interesantes propiedades, con ello se puede controlar su reticulación y por consiguiente su capacidad de liberación controlada y sus propiedades mecánicas. Sin embargo, como se mencionó previamente, su principal desventaja es su ganancia de agua, e hinchamiento excesivo. Con la realización de este estudio se espera desarrollar una fórmula a base del copolímero PEG-PPG-PEG y gelatina tipo A, empleando glutaraldehído como entrecruzante, para sintetizar un hidrogel que funcione como andamio, con una reticulación y porosidad que puedan ir desde rangos micro- hasta nano- métricos, desde 100 nm hasta 200  $\mu\text{m}$ , que permita controlar la ganancia de agua de forma excesiva y, por ende, controlar su hinchamiento, mejorar sus propiedades mecánicas, mantener su capacidad de liberación controlada al ser funcionalizado con PRFC, y mejorar sus interacciones biológicas, ello pensando en sus aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos, específicamente para buscar la regeneración de cartílago al aplicarse de forma inyectable, lo cual permitiría alcanzar defectos cartilagosos sin necesidad de realizar una herida quirúrgica y por lo tanto disminuyendo el tiempo de recuperación por parte del paciente.

## **8.- Hipótesis**

La síntesis y liofilización del hidrogel de PEG-PPG-PEG con gelatina tipo A utilizando glutaraldehído como entrecruzante y funcionalizado con PRFC permitirá limitar la ganancia excesiva de agua, y mejorará las propiedades mecánicas y la respuesta celular, lo cual eventualmente permitirá su empleo como andamio para favorecer la regeneración de tejido cartilaginoso.

## **9.- Objetivo General**

Sintetizar, y caracterizar las propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas de un andamio de PEG-PPG-PEG con gelatina tipo A utilizando glutaraldehído como entrecruzante y funcionalizado con PRFC.

### **9.1.- Objetivos Específicos**

1. Caracterizar PRFC por BCR, SDS-PAGE y FTIR.
2. Sintetizar hidrogeles de PEG-PPG-PEG con una interconexión porosa controlada empleando glutaraldehído como entrecruzante.
3. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas del hidrogel de PEG-PPG-PEG mediante SEM, TGA, DSC y FT-IR.
4. Evaluar las propiedades mecánicas y la capacidad de absorción del hidrogel.
5. Determinar la viabilidad y adhesión celular con cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de encía dental en el hidrogel de PEG-PPG-PEG.

## **10.- Metodología y diseño de estudio**

### **10.1- Diseño de estudio**

#### **10.1.1.- Tipo de estudio**

Experimental *in vitro*

#### **10.1.2.- Diseño de estudio**

Puro, descriptivo, prospectivo, y comparativo.

### **10.2.- Universo de estudio**

- a) Hidrogel de gelatina
- b) Hidrogel de PEG-D
- c) Hidrogel de PEG-PPG-PEG
- d) Tipo de muestra no probabilística

### **10.3.- Variables dependientes**

- a) Propiedades mecánicas: módulo elástico, deformación elástica, resiliencia, esfuerzo máximo, resistencia, tenacidad, etc.
- b) Propiedades biológicas: adhesión viabilidad.

### **10.4.- Variables independientes**

- a) Polímero: PEG-D y PEG-PPG-PEG
- b) Concentración de los componentes

### **10.5.- Criterios de inclusión**

- a) Probetas de hidrogeles rectangulares de 1cm de ancho por 12cm de largo.
- b) Probetas de hidrogeles cilíndricas de 1cm de alto por 1.4cm de diámetro.

### **10.6.- Criterios de exclusión**

- a) Hidrogeles desecados o contaminados.

### **8.6.- Criterios de eliminación**

- a) Hidrogeles con burbujas
- b) Hidrogeles con fracturas

## **11.- Materiales y Métodos**

### **11.1.- Obtención del PRFC**

El plasma rico en factores de crecimiento fue donado por la clínica de periodoncia del posgrado de odontología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) perteneciente a la Facultad de Odontología de la UNAM. Brevemente, se extrajo la sangre del paciente donador y se centrifugó a 5600 rpm. Del sobrenadante se extrajo la zona rica en factores de crecimiento, la cual se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó en un equipo LABCONCO® por 24h al alcanzar una temperatura de  $-47^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.057mBar. Una vez liofilizado el PRFC fue molido en un mortero de ágata para poder ser diluido en agua según se especifique.

### **11.2.- Caracterización del PRFC**

Para caracterizar el PRFC se emplearon 3 métodos, primero se realizó cuantificación de proteínas por el método BCA, posteriormente se llevó a cabo una separación de proteínas por su cociente carga/masa en geles de acrilamida mediante electroforesis SDS/PAGE, y finalmente se identificaron las principales bandas de absorción de enlaces y grupos funcionales de las proteínas presentes en el PRFC por medio de FTIR.

#### **11.2.1.- Cuantificación de Proteínas**

Se realizó cuantificación de proteínas mediante la técnica colorimétrica BCA que se basa en el principio de la detección por parte del ácido bicinconínico (BCA) de  $\text{Cu}^{+2}$  reducido a  $\text{Cu}^{+1}$  por proteínas en ambiente alcalino, la quelación de dos moléculas de BCA con un ion  $\text{Cu}^{+1}$  reacciona para producir un color púrpura que se puede leer a una absorbancia de 545nm, y por lo tanto es directamente proporcional a la concentración de proteínas medidas en la muestra. Brevemente, se prepararon diluciones tanto de BSA como de PRFC para posteriormente graficar con éstas, dos regresiones lineales a partir de las cuales interpolar la concentración del PRFC con respecto a la absorbancia leída con el espectrofotómetro. Primeramente, se diluyeron 10mg/mL de PRFC y de BSA, de esas soluciones se tomaron 2 $\mu\text{l}$  y se colocó agua desionizada hasta completar 150 $\mu\text{l}$ , después se agregaron 150 $\mu\text{l}$  de la

solución de trabajo del kit Micro BCA™ Protein Assay Reagent 23235, y se dejó incubar por 2 horas a 37°C en un plato de 96 pozos. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 545nm en el espectrofotómetro y se graficó la regresión lineal para el BSA y para el PRFC, considerando una  $R^2 > 92$  adecuada. Para determinar la concentración de proteínas, se midió la absorbancia de diversas diluciones de PRFC por duplicado y se obtuvo un promedio que, sumado al coeficiente de posición, es decir, el punto donde la recta corta el eje “y”, y dividido por la pendiente de la recta, arrojó el valor de “x” es decir, la concentración de proteínas del PRFC para ese valor de absorbancia.

### **11.2.2.- Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis SDS-PAGE es una técnica empleada para separar proteínas cargadas en un campo eléctrico a medida que se van desplazando en un tamiz molecular (geles de acrilamida) en relación a su cociente carga/masa. Primeramente, se agrega el dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual se une a las proteínas, las desnaturaliza y les da carga negativa. Las proteínas ahora con carga negativa por efecto del SDS, migrarán buscando la carga positiva situada en la parte inferior de la cámara de electroforesis. El grado de porosidad del gel depende de la concentración de acrilamida-bisacrilamida, y determinará el tamaño de las proteínas que atrapa y las que deja pasar. Finalmente se emplea el colorante azul de Coomassie el cual se une de forma no covalente a los grupos aminos de las proteínas y permite visualizarlas en el gel de acrilamida.

Brevemente, se emplearon dos geles de acrilamida prefabricados Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus de Invitrogen, en el primero se analizó el PRFC de forma nativa y en el segundo se desnaturalizó con  $\beta$ -mercaptoetanol (2ME). Primeramente, se colocó 10 $\mu$ L del marcador de peso molecular SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard, en los primeros carriles de cada gel. Después se preparó una solución de PRFC a una concentración de 10mg/ $\mu$ L, de la cual se colocaron 5 $\mu$ L en cada uno de los carriles número 2 de ambos geles, posteriormente se preparó una nueva dilución colocando 5 $\mu$ L de la solución de PRFC y 145 $\mu$ L de agua desionizada, a partir de ahí se tomaron 20 $\mu$ L para cada uno de los carriles número 3, y 10 $\mu$ L para

cada uno de los carriles número 4, además se completó el contenido de cada carril con el buffer de carga 4x (indicador de avance), el 2ME y H<sub>2</sub>O desionizada, tal como se resume en la tabla 3. Previo a la colocación en los geles, los reactivos se incubaron a 70°C por 10 minutos en baño seco. Se rellenó la cámara con buffer 1x, se cerró el sistema y se deja correr por 30 minutos a un voltaje de 100V. Una vez transcurridos los 30 minutos, se apagó el equipo y se retiró el buffer, se recuperaron los geles, se colocaron en un recipiente junto a 100mL de agua, se calentó en el microondas por 30 segundos sin dejar que el agua hirviera y se colocó en un agitador por 15 minutos, acción que se repitió dos veces para retirar cualquier resto del buffer, después se dejó remojando en el azul de Coomassie por 12 horas, finalmente se lavaron los geles con agua abundante, y se incubaron dentro de la solución decolorante para retirar cualquier tinción que haya quedado sobre el gel que no se uniera a las proteínas.

Reactivo Carril	PRFC nativo				PRFC desnaturalizado			
	1	2	3	4	1	2	3	4
PRFC	-	5µL	20µL	10µL	-	5µL	20µL	10µL
Buffer 4x	-	10µL	10µL	10µL	-	10µL	10µL	10µL
2ME	-	-	-	-	-	4µL	4µL	4µL
H <sub>2</sub> O	-	25µL	10µL	20µL	-	21µL	6µL	16µL
Marcador de peso molecular	10µL	-	-	-	10µL	-	-	-
Total	10µL	40µL	40µL	40µL	10µL	40µL	40µL	40µL

**Tabla 3.** Componentes de las soluciones colocadas en los carriles del gel de electroforesis. Fuente: propia.

### 11.2.3.- Análisis Mediante FTIR

El FTIR es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. La espectrometría infrarroja se basa en el principio de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que



corresponden a los niveles de energéticos de la molécula, y al irradiar la muestra con el espectro infrarrojo se producirá una absorción y una transmitancia en relación a la longitud de onda donde se dé dicha absorción para finalmente obtener la gráfica correspondiente. Estas frecuencias dependen de la energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional(36).

Para la realización de este estudio se empleó un equipo IRAffinity-1 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, SHIMADZU, haciendo 40 barridos por muestra y se realizó la lectura de 400 a 4000cm<sup>-1</sup>, donde se identificaron las principales bandas de absorción para enlaces o grupos funcionales característicos para cada molécula.

### **11.3.- Síntesis del Hidrogel**

La síntesis del hidrogel se realizó siguiendo la fórmula empleada por Martín del Campo y colaboradores, con una modificación, se sustituyó el PEG-D por el PEG-PPG-PEG (P123), se presenta en la tabla 4 una lista de los componentes empleados, además se funcionalizó el hidrogel con el plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) previamente descrito(30).

Brevemente, se pesaron 0.035g / 0.07g del P123 y se colocaron junto a 7.8ml de PBS en un vaso de precipitado de 50ml, con ayuda de un termo agitador magnético se mezclaron por 24 horas a temperatura ambiente, después se calentó la mezcla a 50°C por 10 minutos, posteriormente se añadió la gelatina tipo A y se mezcló con ayuda de un vórtice Maxi Mix II, finalmente se añadió el glutaraldehído al 2% para calentar nuevamente a 50°C por una hora.

También se liofilizaron algunas muestras de los hidrogeles con la misma composición y misma metodología para realizar los estudios de SEM, hinchamiento, equilibrio en rango de hinchamiento y las propiedades mecánicas del material liofilizado y posterior a ser liofilizado. Para ello las muestras se congelaron a -40°C y se liofilizaron en un equipo LABCONCO® a -47°C y una presión de 0.057mBar por 24 horas.

Componente	Dosis	Información técnica y comercial	CAS	Peso molecular (g/mol)	Lote	pH
<b>PBS</b>	7.8 ml	Phosphate buffered saline 101866950, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)	P4417	-	SLB S422 3	7.4 a 25°C
<b>Gelatina</b>	1.8 g	Type A, MP Biomedicals, LLC, 1Kg. Fuente: piel de cerdo. Tipo: A (hidrólisis ácida del colágeno)	9000-70-8	50,000 - 100,000	Q368 4	4.5 - 5.9
<b>PEG-PPGPEG (P123)</b>	0.035g 0.070g	Poly (ethylene glycol)-block-poly (propylene glycol)-block-poly (ethylene glycol) Pluronic® P-123, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA, 435465-1L	9003-11-6	5,800	MKB J222 1V	-
<b>GA</b>	1.2 ml	Glutaraldehyde 2% Gludex, 1000ML. Equipos médicos quirúrgicos, S.A. de C.V.	111-30-8	-	130 M43	3.1 a 4.5
<b>PEG-D</b>	1.8 g	Poly (ethylene glycol) diamine. Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA.	24991-53-5	10,000	#MK CF22 48	-

**Tabla 4.** Componentes empleados para sintetizar el hidrogel. Fuente: propia.

## 11.4.- Caracterización Físico-Química del Hidrogel de PEG-PPG-PEG

### 11.4.1.- FTIR

Después de sintetizar y liofilizar los hidrogeles, se cortaron muestras hasta tener una masa constante en promedio de  $2.5 \pm 1$  mg. Se empleó un equipo IRAffinity-1 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, SHIMADZU con reflectancia total atenuada (ATR), y se realizó la lectura de 400 a  $4000\text{cm}^{-1}$  para buscar las principales bandas de absorción de enlaces y grupos funcionales presentes en el hidrogel.

### 11.4.2.- TGA

La termogravimetría (TGA) es un análisis que evalúa el comportamiento de la masa de una muestra al incrementar su temperatura. Brevemente, una vez sintetizado el andamio como se describió previamente, se pesaron 3 muestras hasta lograr una

masa constante en promedio de  $2.5 \pm 1$  mg. Se utilizó el equipo “Instrument TGA Q5000 V3.17 Build 265” en un ambiente de vacío con nitrógeno, para la prueba se seleccionó un ambiente de aire, las muestras se colocaron en un pozo de platino. Se seleccionó una tasa de calentamiento de  $10.00$  °C/min iniciando a temperatura ambiente hasta alcanzar  $600$  °C

#### **11.4.3.- DSC**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis calorimétrico donde la muestra a estudiar y una muestra de referencia se colocan en recipientes especiales en el instrumento. Los calentadores suben la temperatura a una tasa especificada, por ejemplo,  $5$  °C /min o bien, mantienen la calorimetría de barrido diferencial a una temperatura determinada. El instrumento mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia. Brevemente, una vez elaboradas las muestras como se describió previamente, se pesaron hasta lograr  $5.1 \pm 1$  mg de masa constante. Se utilizó el equipo “Instrument DSC Q2000 V24.11 Build 124” en un ambiente de vacío generado por nitrógeno. Las muestras se colocaron en platinas de aluminio desechables y se generó una rampa de calentamiento de  $20.00$  °C/min hasta alcanzar  $300.00$  °C con rangos de temperatura de  $87.62$  °C a  $498.08$  °C con  $9.99$  °C/min de enfriamiento generado por un flujo de masa de  $50.00$  mL/min. El equipo se equilibró a  $-50.00$  °C

#### **11.4.4.- SEM**

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM, por Scanning Electron Microscopy) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Brevemente, se sintetizaron muestras del hidrogel como se mencionó previamente, debido a su alta concentración de agua las muestras se liofilizaron para ser observadas en el SEM. En un porta-muestras de aluminio de  $1$  cm de largo por  $1$  cm de ancho, por medio de una cinta de carbón con pegamento se colocó el hidrogel liofilizado previamente cortado en cuartos de  $1$  mm por  $1$  mm y se colocó

una cubierta de oro, para ser llevados a un microscopio electrónico de barrido JOEL JSM 7600F para obtener micrografías a diferentes aumentos. Además, se obtuvo mediante el software Image J tanto el tamaño promedio de los poros, como el porcentaje de porosidad.

#### **11.4.5.- Equilibrio en Rango de Hinchamiento**

Es importante calcular el tiempo en que los hidrogeles dejan de ganar agua, para posteriormente poder calcular el porcentaje de hinchamiento definitivo. Después de sintetizar y liofilizar los hidrogeles de gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG, se cortaron y pesaron muestras de  $\pm 5$ mg, en seguida se introdujeron en agua bidestilada, el equilibrio en el rango de hinchamiento se obtuvo pesando la muestra cada 10 minutos con la siguiente fórmula:

$$\text{Equilibrio de hinchamiento} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

Donde:

$W_s$  es el estado de equilibrio de hinchamiento (peso del hidrogel c/10min)

$W_d$  es el peso seco (peso inicial).

El ensayo se repitió por triplicado, con los valores obtenidos se graficó el % de equilibrio de hinchamiento contra tiempo (minutos), hasta que los valores se estabilizaron, es decir, hasta que se alcanzó una meseta.

#### **11.4.6.- Hinchamiento**

El hinchamiento es una propiedad importante para los hidrogeles, ya que, como se mencionó previamente, un hinchamiento excesivo puede producir un detrimento en sus propiedades mecánicas. Se cortaron y pesaron muestras de  $\pm 5$ mg de los hidrogeles liofilizados de gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG. El % de hinchamiento se obtuvo con la fórmula:

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{W_e - W_d}{W_d} \times 100$$

Donde:

$W_e$  es el peso posterior a 72 horas de inmersión en agua bidestilada

$W_d$  es el peso seco constante

Con los valores obtenidos se graficó el % de hinchamiento comparando los tres grupos. El ensayo se repitió por triplicado.

#### **11.4.7.- Ensayo Mecánico Compresión**

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas en las que los materiales de estudio son sometidos a esfuerzos mediante la aplicación de una fuerza externa hasta su deformación y/o ruptura, para determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y resistencia.

En ingeniería se necesita saber cómo responden los materiales sólidos a fuerzas externas como la tensión, la compresión, la torsión, la flexión o la cizalladura. Los materiales pueden presentar deformación elástica (en la que el material vuelve a su tamaño original cuando se elimina la fuerza externa), una deformación permanente (cuando el material no vuelve a su tamaño original) o finalmente una fractura(37).

Para evaluar las propiedades mecánicas del hidrogel previo a la liofilización se prepararon muestras de forma cilíndrica de 1cm de alto por 1.4cm de diámetro. Se llevó a cabo un ensayo de compresión en la máquina de pruebas universales INSTRON® 5567 a una velocidad de 1mm/min a temperatura ambiente, y se obtuvieron las diferentes propiedades de la gráfica esfuerzo-deformación.

#### **11.4.8.- Ensayo Mecánico de Tracción**

Para evaluar las propiedades mecánicas del hidrogel posterior a ser sometido al proceso de liofilización, y determinar si éste se veía afectado por dicho proceso, se prepararon muestras rectangulares de 1cm de ancho por 12cm de largo. Se llevó a cabo un ensayo de tracción en un equipo DMA Q800 a una velocidad de 1mm/min con una fuerza máxima 18 N, a temperatura ambiente, con las gráficas obtenidas se obtuvieron las propiedades mecánicas del rango elástico.

## **11.5.- Caracterización Biológica**

Se realizó un ensayo de viabilidad celular con PrestoBlue® y se evaluó la adhesión celular sobre el hidrogel por la técnica de cristal violeta. Para la realización de ambos estudios se cultivaron células troncales mesenquimales humanas derivadas de encía (hGMSCs), las células se cultivaron en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, se les adicionó medio  $\alpha$ -MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 5mL de antibiótico-antimicóticos y 500 $\mu$ L de gentamicina, el cual fue cambiado cada tercer día.

### **11.5.1.- Ensayo de Adhesión Celular**

Para establecer el efecto de los hidrogeles de PEG-PPG-PEG sobre la adhesión celular, las células mesenquimales derivadas de encía (hGMSCs), se cultivaron sobre la superficie de los hidrogeles de PEG-PPG-PEG en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad celular de  $15 \times 10^3$  y se cultivaron durante 4 y 24 h. Las células adheridas a los hidrogeles fueron evaluadas por medio del ensayo de cristal violeta. Brevemente; las células hHGF-MSc que se expandieron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y diluidas en el medio de cultivo  $\alpha$ -MEM a la concentración especificada párrafos arriba para ser sembradas sobre los hidrogeles. Pasado el tiempo de incubación propuesto, la adherencia celular fue evaluada por medio de la cuantificación de la absorbancia del colorante (0.1% de cristal violeta) acoplado a la membrana plasmática de las células adheridas sobre los hidrogeles que fue extraída con 300 $\mu$ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100 $\mu$ L que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un espectrofotómetro usando el filtro de 545 nm (ChroMate, AWARENESS). Los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados de acuerdo a una curva estándar para determinar la cantidad de células o el porcentaje de células adheridas a los hidrogeles de PEG-PPG-PEG. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre sustratos la misma placa de cultivo (plástico).

### **11.5.2.- Ensayo de Viabilidad Celular**

El análisis de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el uso del kit PrestoBlue® se basa en el principio de la conversión por parte de células viables del agente rezaurina (azul) en resorufina (rosa fluorescente), el cual puede ser medido en un espectrofotómetro a 545 nm. Las células hHGF-MSC fueron cultivadas a una densidad celular de  $15 \times 10^3$  por triplicado por 1, 3, 5, y 7 días de cultivo. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con 20µL del reactivo PrestoBlue® a 37°C por 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 200µL que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm (ChroMate, AWARENESS). Debido a que la generación del producto resorufina es directamente proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, un aumento en los valores de absorbancia nos indica una medida de viabilidad celular y una disminución indica citotoxicidad por parte del material.

### **11.6.- Análisis Estadístico**

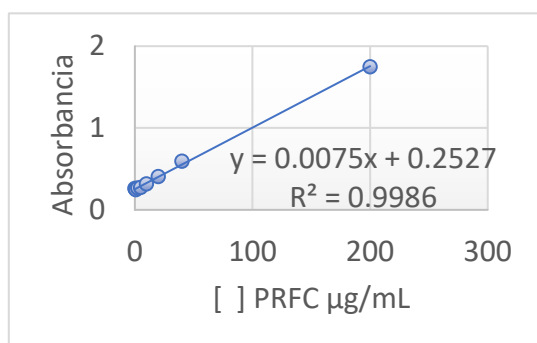
Los resultados se presentan como medias  $\pm$  error estándar. Primero, se comprobó que existiera distribución normal mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnof, una vez cumplido este requisito, los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de student en presencia de 2 grupos y ANOVA cuando hay más de 2 grupos, según se especifique; un valor de P menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo, todos los análisis se realizaron con el software R.

## 12.- Resultados

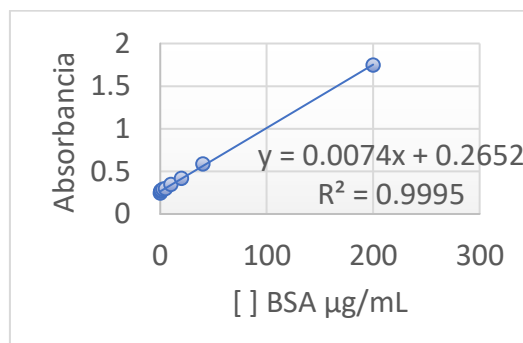
### 12.1.- Caracterización del PRFC

#### 12.1.1.- Cuantificación de Proteínas

Para medir la cuantificación de proteínas mediante la técnica BCA se realizó una curva patrón tanto de proteína albúmina (BSA), así como del mismo PRFC mediante una regresión lineal, midiendo la absorbancia de concentraciones conocidas, para que los valores de concentraciones desconocidos obtenidos mediante interpolación sean válidos, se debe obtener un coeficiente de correlación  $R^2$ , el cual debe ser  $>98\%$ .



**Figura 1.** Curva patrón con plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) a diferentes concentraciones, con un coeficiente de correlación válido (mayor a 0.98). Fuente: propia.



**Figura 2.** Curva patrón con proteína albúmina (BSA) a diferentes concentraciones, con un coeficiente de correlación válido (mayor a 0.98). Fuente: propia.



Se muestra en la tabla 5 los resultados de la técnica colorimétrica de cuantificación de proteínas BCA, adquiridos mediante interpolación de valores obtenidos por la medición de absorbancia de muestras de PRFC de concentraciones desconocidas “x”, empleando como curva patrón la realizada a partir de PRFC.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la concentración de muestras desconocidas “x” obtenidos por BCA empleando como curva patrón la realizada a partir de BSA. Comparando los valores obtenidos a partir de ambas curvas patrón, la de PRFC y la BSA, se observa una similitud entre ambas, lo cual indica la exactitud de las mediciones.

	Medición 1	Medición 2	Promedio	[X] de la muestra (µg/mL)
A	1.095	0.974	1.0345	171.62
B	2.291	2.115	2.203	327.42
C	0.207	0.193	0.2	60.36
D	3.226	3.155	3.1905	459.09
E (blanco)	0.278	0.271	0.2745	70.29

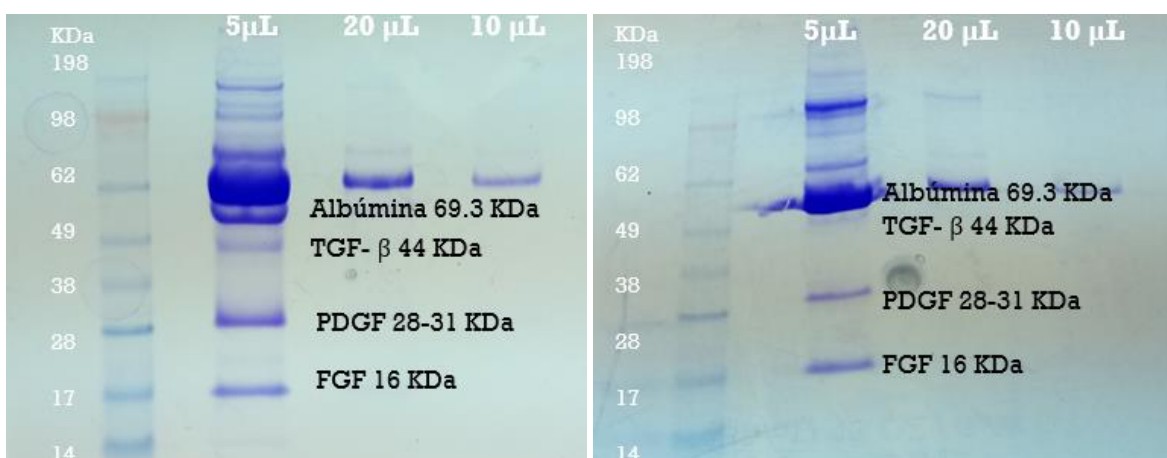
**Tabla 5.** Resultados de cuantificación por BCA obtenidos de interpolación de la gráfica de PRFC. Fuente: propia.

	Medición 1	Medición 2	Promedio	[X] de la muestra (µg/mL)
A	1.095	0.974	1.03	175.63
B	2.291	2.115	2.20	333.54
C	0.207	0.193	0.2	62.86
D	3.226	3.155	3.19	466.98
E (blanco)	0.278	0.271	0.25	72.93

**Tabla 6.** Resultados de cuantificación por BCA obtenidos de interpolación de la gráfica de BSA. Fuente: propia.

### 12.1.2.- Electroforesis SDS-PAGE

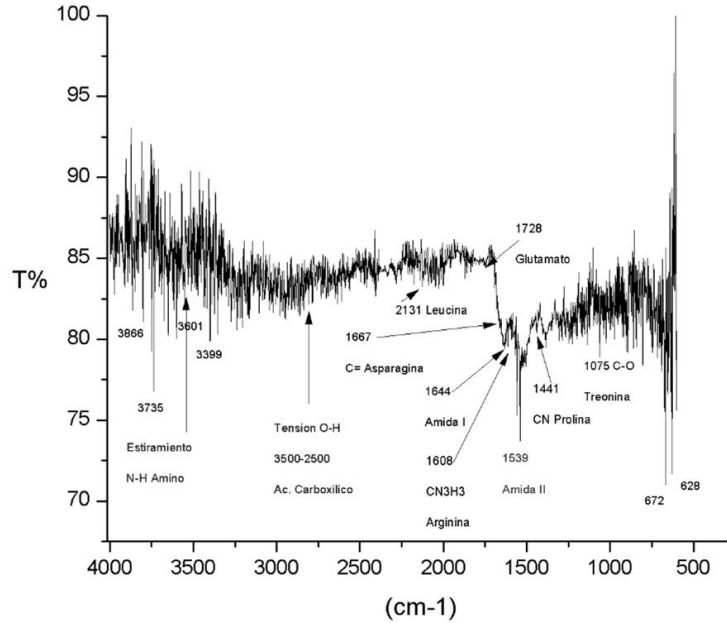
Se muestran los geles de poliacrilamida donde se realizó una SDS-PAGE del PRFC nativo y no nativo, donde se observan bandas a diferentes pesos según el patrón de referencia, en la columna dos (5 $\mu$ L) se observa una banda muy fuerte que pesa aproximadamente 62KDa. Se observan además bandas a los 198, 98, 60, 28 y 17 KDa. En las columnas tres (20  $\mu$ L) y cuatro (10  $\mu$ L) se observan bandas 62 KDa que corresponden a los diferentes factores de crecimiento según se especifica en las figuras 3 y 4 tanto para el gel con el PRFC reducido, como en el no reducido.



**Figura 3.** SDS-PAGE muestra reducida. **Figura 4.** SDS-PAGE muestra no reducida. Fuente: propia.

### 9.1.3.- Análisis Mediante FTIR

A partir del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) liofilizado, se obtuvo el espectro de FTIR, donde se observan las principales bandas relacionadas con proteínas, como amida I, amida II, y ácido carboxílico, entre otras. Identificar dichas bandas es importante para contrastarlas con el espectro del hidrogel ya sintetizado y funcionalizado con el PRFC, y así evaluar si existe un corrimiento en las mismas hacia la región más energética, lo que indicaría una unión más fuerte del PRFC al hidrogel, y por lo tanto obstaculizaría su liberación.

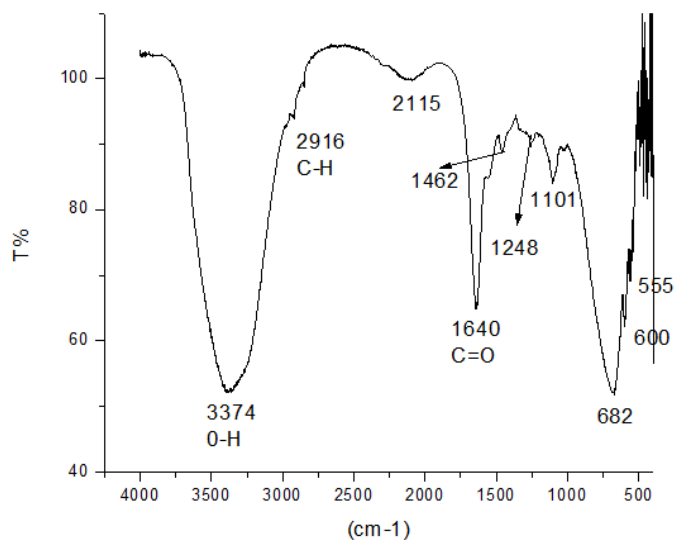


**Figura 5.** Espectro de FTIR donde se identificaron bandas características como, estiramiento amino primario N-H de 3442 a 3360  $\text{cm}^{-1}$ , amino secundario C-N a 1143  $\text{cm}^{-1}$  y la absorción O-H de 2500 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  del ácido carboxílico. Fuente: propia.

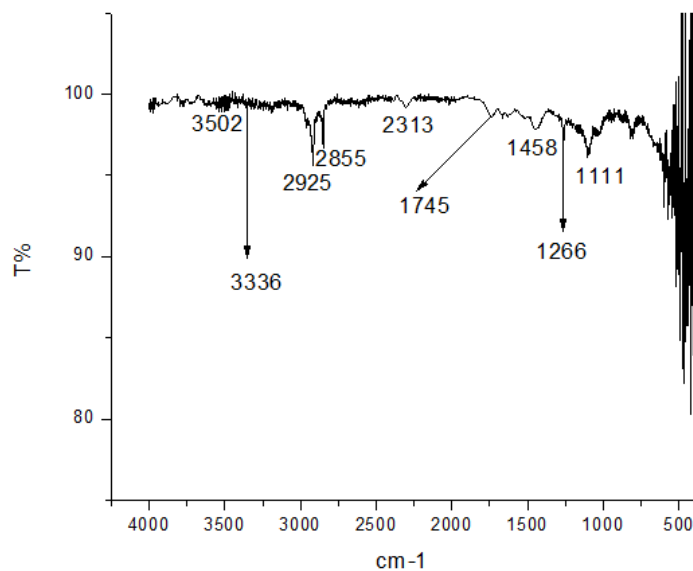
## 12.2.- Caracterización Físico-Química del Hidrogel

### 12.2.1.- FTIR

Se identificaron las bandas de absorción en el espectro infrarrojo. En la figura 6 se observa una banda ancha de los 3200 a los 3350  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento del enlace O-H del agua debido a la alta concentración de ésta en la muestra del hidrogel, en los 1640  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda que corresponde al estiramiento del enlace C=O y en 2916  $\text{cm}^{-1}$  del estiramiento de C-H, ambas de la molécula del glutaraldehído, lo cual indica la presencia de grupos aldehídos libres. En la figura 7 se muestra el espectro del FTIR del hidrogel liofilizado, se observan las bandas enmascaradas en la figura anterior por la banda amplia del agua, en los 3336  $\text{cm}^{-1}$  se identificó una banda que corresponde a un estiramiento N-H unido a un hidrógeno, 2916  $\text{cm}^{-1}$  de un estiramiento asimétrico de  $\text{CH}_2$ , 1452  $\text{cm}^{-1}$  de una flexión de  $\text{CH}_2$ . Las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de C-H se asignan a los picos observados a 2925 y 2855  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Las vibraciones de flexión de  $-\text{CH}_2$  (grupo metileno) se observan a 1458 y 1398  $\text{cm}^{-1}$ .

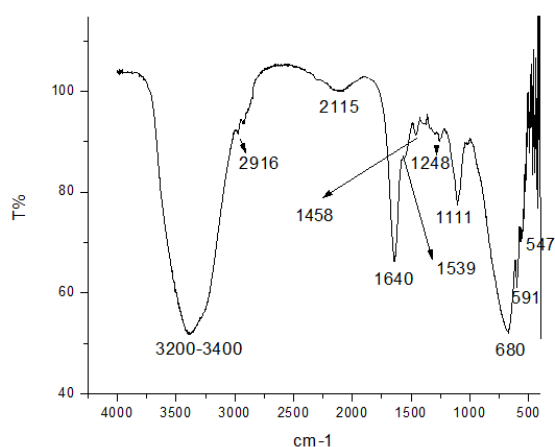


**Figura 6:** Espectro FTIR hidrogel sin liofilizar, se observa una banda en  $3374\text{cm}^{-1}$  del estiramiento del enlace O-H del agua, en los  $1640\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda del estiramiento del doble enlace C=O y en  $2916\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento de C-H, ambas de la molécula del glutaraldehído. Fuente: propia.



**Figura 7.** Espectro FTIR hidrogel liofilizado, se observan banda en los  $3336\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento N-H, en los  $2916\text{ cm}^{-1}$  de un estiramiento asimétrico de  $\text{CH}_2$ ,  $1452\text{ cm}^{-1}$  de una flexión de  $\text{CH}_2$ . Fuente: propia.

El agente reticulante vincula las cadenas de polímero con sus grupos funcionales. Por lo tanto, se buscan bandas que muestren una interacción entre el O-H de los extremos de la molécula de PEG y los grupos funcionales del glutaraldehído (entrecruzante), así como interacciones con la gelatina. El pico a  $1111\text{ cm}^{-1}$  para PEG se debe al enlace éter de PEG. La reacción entre los grupos amino y carbonilo que implica la formación de la base de Schiff se acompaña de formación de color, lo cual se conoce como reacción de Millard. En los espectros de las figuras 6 y 8 se observa un nuevo enlace a  $1648\text{ cm}^{-1}$ , esto es importante ya que indica el estiramiento vibracional C=N del grupo imino de la base de Schiff recién formado, confirmando así la reticulación del grupo amino de la gelatina con el grupo aldehídico del glutaraldehído.

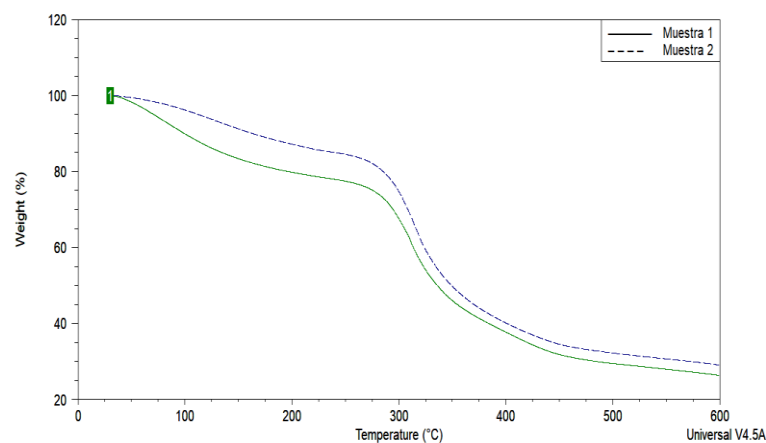


**Figura 8.** Espectro FTIR hidrogel con PRFC al 0.05%, se observa un pico a  $1111\text{ cm}^{-1}$  del enlace éter de PEG, y una banda en los  $1648\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento vibracional C=N del grupo imino de la base de Schiff recién formada. Fuente: propia.

Además, en la figura 8 se buscaron las bandas de absorción para las moléculas previamente identificadas en el plasma rico en factores de crecimiento (figura 5). Se observa una banda en los  $1539\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a una amida II,  $1640\text{ cm}^{-1}$  de una amida I,  $1458\text{ cm}^{-1}$  de una CN prolina,  $2115\text{ cm}^{-1}$  de una leucina, al identificar la persistencia de dichas bandas se confirma que no ocurrió un corrimiento hacia la región energética, y por lo tanto el PRFC puede ser liberado gradualmente.

### 12.2.2.- TGA

Se realizó un ensayo de TGA y se obtuvo las gráficas de tres muestras de PEG (figura 9). Se presentan los valores de “onset point (To)” (punto donde se inicia la máxima pérdida de masa), la muestra 1 de PEG obtuvo 359.71°C, la dos 357.33°C y la tres 112.13°C. Al mismo tiempo se observan los resultados de Tmax (temperatura donde ya se logró una mayoría en la pérdida de masa) 420.88°C para PEG 1, 412.66°C PEG 2 y 119.19°C PEG 3.



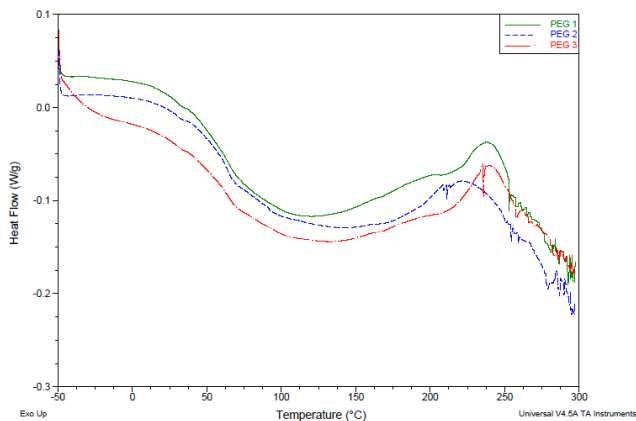
**Figura 8.** Análisis termogravimétrico, se observa el inicio de la primera gran pérdida de masa (To) a los 358°C, la cual termina a los 215°C (Tmax). Fuente: propia.

PEG	To (°C)	Tmax (°C)
1	359.71	420.88
2	357.33	412.66
P	358.52	416.77

**Tabla 7.** Resultados del TGA, se muestran los valores de To y Tmax de dos probetas y el promedio (P) entre ambas. Fuente: propia.

### 12.2.3.- DSC

En la figura 9 se muestran las gráficas de calorimetría diferencial de barrido de tres muestras de PEG. Se obtuvieron de las gráficas de DSC los datos de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), es decir la temperatura a la que se da una pseudo-transición termodinámica en materiales vítreos, para PEG1 64.9°C, 64.3°C para PEG 2, y 63.83°C para PEG3. Se extraen además los valores de temperatura de cristalización. Los resultados para las muestras de PEG fueron 238.46°C, 221.29°C y 238.83°C para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Finalmente se muestran los resultados de punto de fusión ( $T_m$ ) 282.49°C para PEG 1, 278.01°C para PEG 2 y 291.81°C para PEG 3.



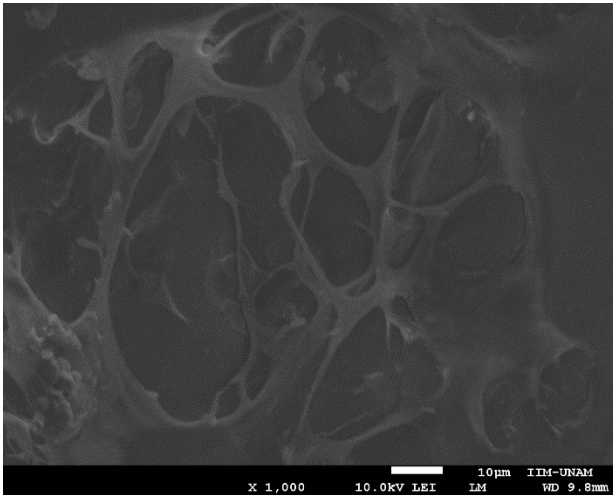
**Figura 9.** Espectro de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) donde se identifican los fenómenos de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ) y temperatura de cristalización ( $T_c$ ), que se resumen en la tabla 8. Fuente: propia.

PEG	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_c$ (°C)
1	64.9	238.46	282.49
2	64.3	221.29	278.01
3	63.83	238.83	291.81

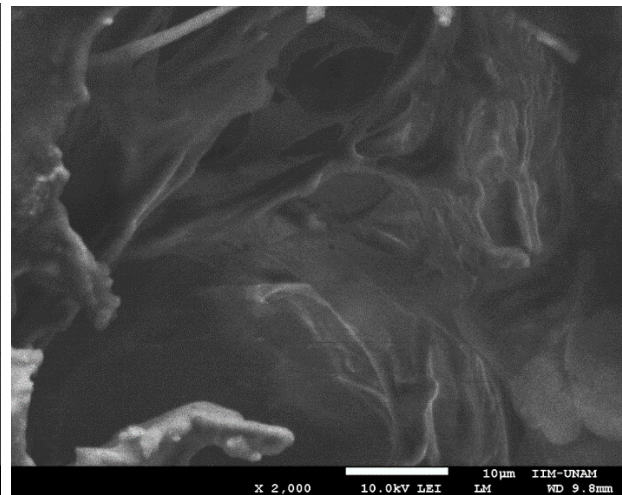
**Tabla 8.** Resultados DSC, se muestran los valores de  $T_g$ ,  $T_m$  y  $T_c$ , obtenidos de tres probetas del hidrogel, lo cual comprueba el típico comportamiento de los polímeros tanto cristalino como amorfo. Fuente: propia.

#### 12.2.4.- SEM

Se realizó microscopía electrónica de barrido del hidrogel de PEG liofilizado para mostrar la microestructura de la porosidad del andamio. Se observan en la micrografía poros en rangos desde 5 hasta 300  $\mu\text{m}$ . Particularmente se observa una interconexión porosa adecuada, que eventualmente pudiera dar cabida a nuevas células y permitir la neovascularización. Además, mediante el empleo del software image J, se obtuvo el porcentaje de porosidad de los andamios, el cual se encuentra entre 30-44%, superando el 3% de la porosidad del hidrogel de gelatina.



**Figura 10.** Micrografía de SEM del hidrogel a base de PEG-PPG-PEG, se observan poros en rangos de 5-300 $\mu\text{m}$  a 1000x. Fuente propia.

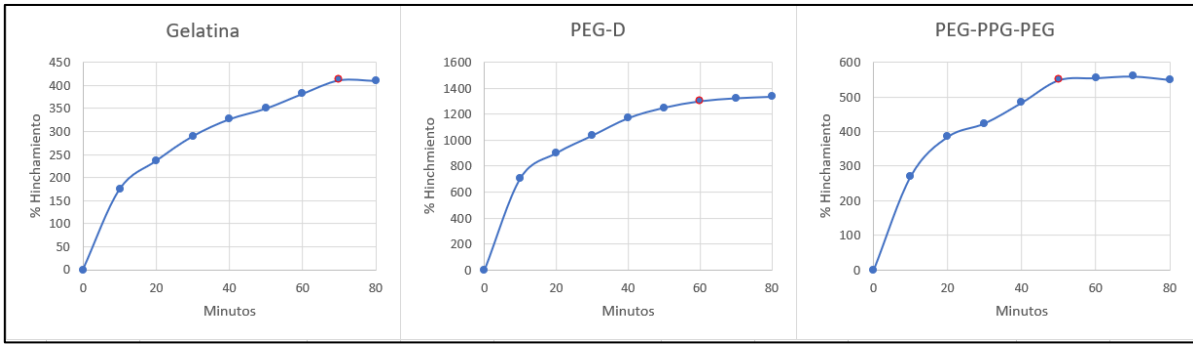


**Figura11.** Micrografía de SEM del hidrogel a 2000x de la misma zona, donde se aprecia una interconexión porosa adecuada. Fuente propia.

#### 12.2.5.- Equilibrio en Rango de Hinchamiento

En la prueba de equilibrio de hinchamiento se observó que el % de hinchamiento de la gelatina se estabiliza a los 70 minutos, el PEG-D a los 60 minutos y el PEG-PPG-PEG a los 50 minutos, como se observa en la figura 12.

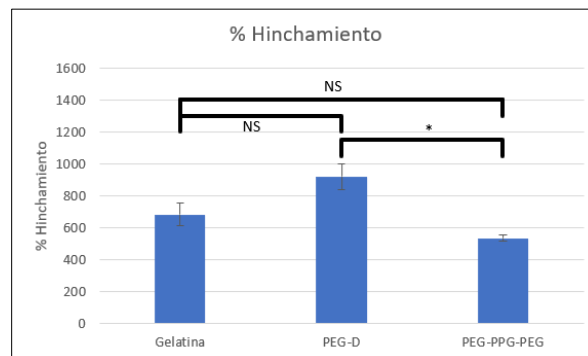




**Figura 12.** Equilibrio en rango de hinchamiento de tres hidrogeles, gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG, se observan mesetas entre los 50 y 70 minutos. Fuente: propia.

### 12.2.6.- Hinchamiento

También se evaluó la capacidad del hidrogel para captar agua después de ser liofilizado. Por diferencia de peso, se identificó que los hidrogeles pierden en promedio 85% de su masa al ser liofilizados. Posteriormente, se compararon estadísticamente los resultados, se llevó a cabo una ANOVA de una vía, obteniendo un valor de  $p=0.00651$  y una Post Hoc Tukey, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de PEG-D y el grupo PEG-PPG-PEG (figura 13), debido a que éste último es un polímero con una naturaleza anfipática al tener un grupo hidrofóbico al centro de su molécula y dos extremos hidrofílicos, demostrando que puede ser una opción viable para controlar el hinchamiento excesivo de agua del hidrogel.



**Figura 13.** Se muestra el porcentaje de hinchamiento de 3 hidrogeles, gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG, el cual muestra diferencias estadísticamente significativas con menor ganancia de agua y, por lo tanto, menor porcentaje de hinchamiento. NS: no significativo; \*:  $p < 0.05$ . Fuente: propia.

### 12.2.7.- Propiedades Mecánicas

Para evaluar las propiedades mecánicas del hidrogel previo a la liofilización se llevó a cabo un ensayo de compresión en la máquina de pruebas universales INSTRON® 5567 se obtuvieron las diferentes propiedades que se resumen en la tabla 9. Para evaluar al hidrogel posterior a la liofilización se llevó a cabo un ensayo de tracción en un equipo DMA Q800 y se obtuvieron las propiedades del rango elástico debido a que se rebasó la capacidad de carga del equipo, como se observa en la tabla 10.

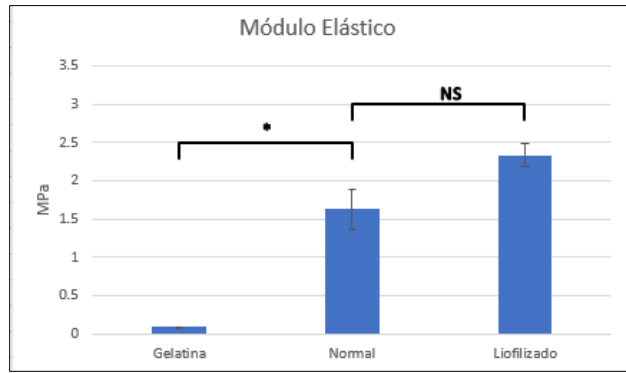
Propiedad	Valor
Módulo Elástico (MPa)	1.63
Esfuerzo de Cedencia (MPa)	0.19
Deformación de Cedencia (%)	12.51
Resiliencia (MJ/cm <sup>3</sup> )	0.011
Esfuerzo Máximo (MPa)	5.59
Esfuerzo último (MPa)	5.13
Resistencia (MPa)	5.13
Tenacidad (MJ/m <sup>3</sup> )	0.26

**Tabla 9.** Propiedades mecánicas del hidrogel sin liofilizar. Fuente: propia.

Propiedad	Valor
Módulo elástico (MPa)	2.81
Esfuerzo de cedencia (MPa)	3.53
Deformación de cedencia (%)	2.01
Resiliencia (MJ/cm <sup>3</sup> )	2.33

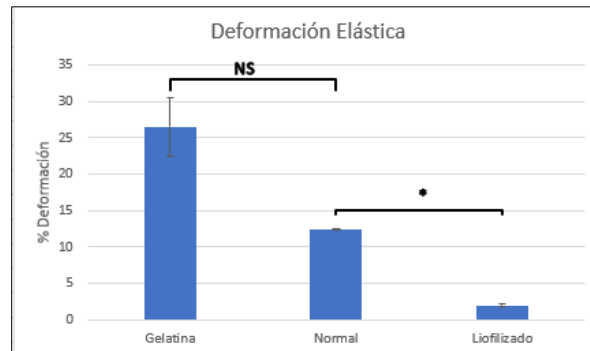
**Tabla 10.** Propiedades mecánicas del hidrogel Liofilizado. Fuente: propia.

Debido a la importancia de las propiedades del rango elástico para la eventual aplicación del hidrogel de forma inyectable, se compararon los módulos elásticos de 3 hidrogeles, gelatina, normal y liofilizado. Primeramente, se llevó a cabo una prueba paramétrica ANOVA de una vía, obteniendo un valor de  $p=0.000195$  y una Post Hoc Tukey, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la gelatina los hidrogeles con PEG, más no entre el hidrogel antes y después de ser liofilizado, tal como se observa en la figura 14.



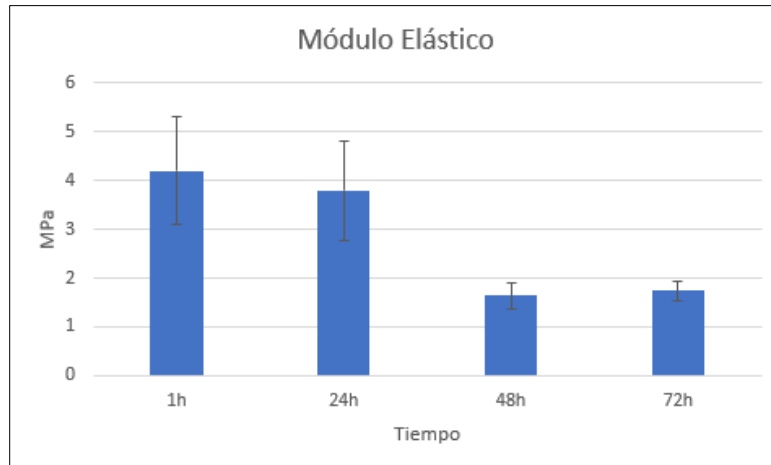
**Figura 14.** Módulo elástico de 3 hidrogeles, gelatina, PEG normal y liofilizado, no se encontraron diferencias estadísticas entre éstos últimos. NS: no significativo; \*:  $p < 0.05$ . Fuente: propia.

También se comparó el porcentaje de deformación elástica, se llevó a cabo una prueba de Kolmogorov Smirnov para verificar normalidad en los grupos: Gelatina  $p = 0.8488$  PEG-PPG-PEG normal  $p = 0.8021$ , PEG-PPG-PEG liofilizado  $p = 0.7719$  y se realizó una ANOVA de una vía con un  $p = 2.0973E-06$  y una Post Hoc Tukey, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el hidrogel normal y el liofilizado, esto debido a que al perder agua, el material vuelve más rígido y por lo tanto se deforma menos elásticamente (figura 15).



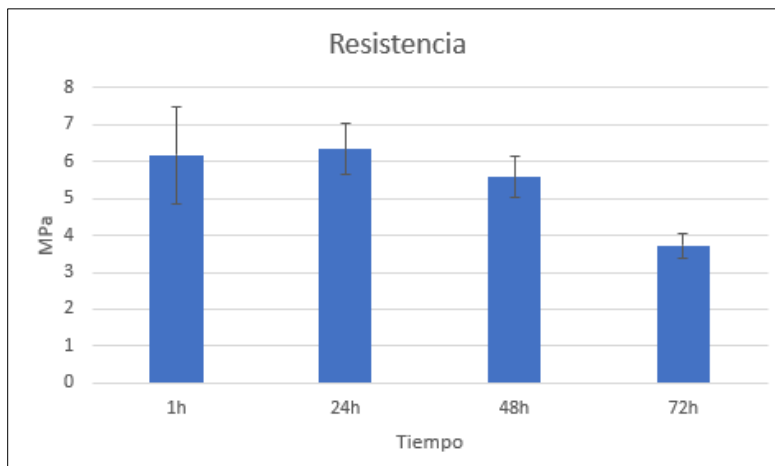
**Figura 15.** Porcentaje de deformación elástica de 3 hidrogeles. NS: no significativo; \*:  $p < 0.05$ . Fuente propia.

También se evaluaron las propiedades mecánicas a 1, 24, 48 y 72 horas, en la figura 16 se observa cómo se estabiliza el módulo elástico entre 1 y 24h, pero al incrementarse el tiempo el módulo disminuye probablemente debido a que el hidrogel comienza a hincharse al captar agua del medio ambiente.



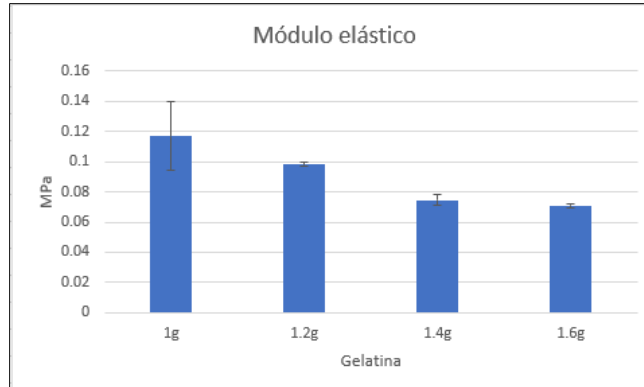
**Figura 16.** Variación del módulo elástico con respecto al tiempo. Fuente: propia.

Al mismo tiempo se observó como la resistencia disminuyó a partir de las 24h (fig. 17) también como consecuencia del hinchamiento excesivo por ganancia de agua del medio.



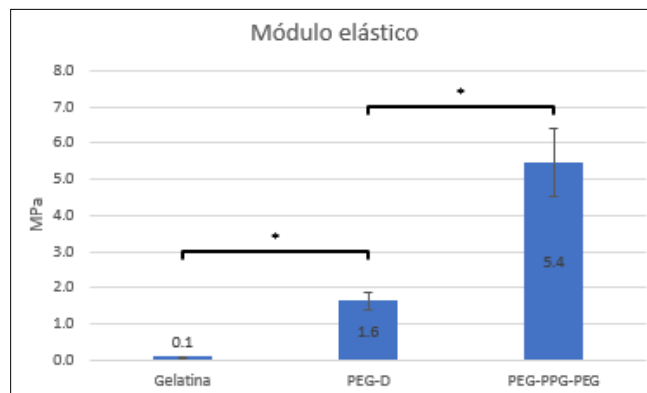
**Figura 17.** Resistencia del hidrogel con respecto al tiempo. Fuente: propia.

También se evaluaron las propiedades mecánicas a una hora de ser sintetizado al incrementar las concentraciones de gelatina, y se observó que al incrementar la concentración de gelatina el hidrogel se vuelve más elástico, tal como se observa en la figura 18.



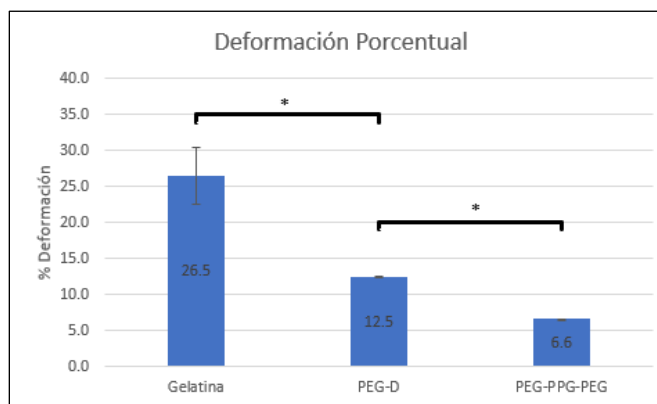
**Figura 18.** Comportamiento del módulo elástico del hidrogel al incrementar la concentración de gelatina. Fuente: propia.

Se comparó además el módulo elástico entre tres grupos de hidrogeles (figura 19), el de gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG, se encontró que la gelatina es más elástica, mientras que existe diferencia estadísticamente significativa entre emplear el polímero PEG-D y el PEG-PPG-PEG, esto concuerda con lo encontrado en la prueba de hinchamiento, ya que, al controlar la ganancia de agua, también se controlan las propiedades mecánicas.



**Figura 19.** Módulo elástico de tres hidrogeles, gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG. \*:  $p < 0.05$ . Fuente: propia.

Respecto a los valores en la deformación elástica porcentual se encontró que, si existe diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos de hidrogeles probados, gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG, siendo este último el que presenta menor deformación porcentual, tal y como se observa en la figura 20.



**Figura 20.** Deformación porcentual de tres hidrogeles, gelatina, PEG-D y PEG-PPG-PEG. \*:p <0.05. Fuente: propia.

Finalmente se resume en la tabla 11 las propiedades de módulo elástico y resistencia obtenidas de los hidrogeles y los componentes del tejido óseo, así como del cartílago, donde se aprecia que los valores obtenidos del PEG-PPG-PEG se acercan a los del cartílago e incluso a los del hueso esponjoso.

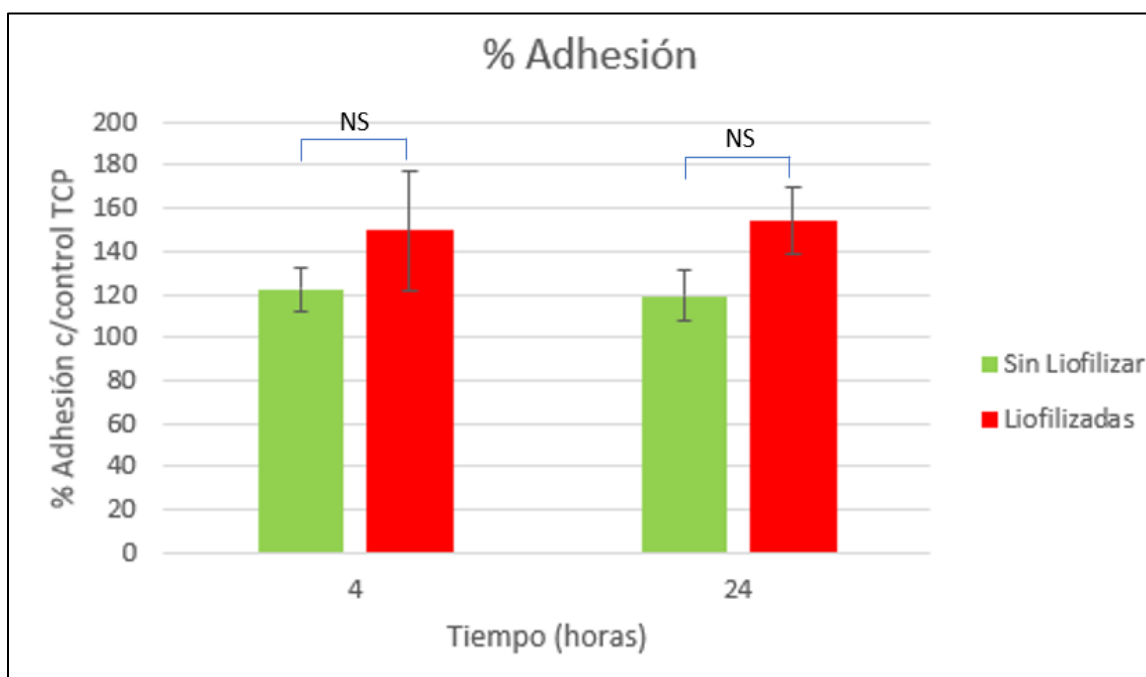
Estructura/material	Módulo elástico (MPa)	Resistencia (MPa)
Mineral fosfato de calcio	130000 (C)	100 (T)
Hueso compacto	7000-15000 (C)	100-230 (C)
Hueso esponjoso	5-200 (C)	2-12 (C)
Cartílago	0.2-6.44 (D)	-
PEG-D	1.6 (C)	-
PEG-PPG-PEG liofilizado	2.3 (T)	-
PEG-PPG-PEG	5.4 (C)	-

**Tabla 11.** Resumen comparativo de las propiedades mecánicas del hidrogel y diversos tejidos. T: ensayo mecánico de tracción; C: ensayo compresivo; D: ensayo por dureza. Fuente: Sergerie K, Lacoursiere MO, Levesque M, Villemure I. Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. J. Biomech. 2009;42(4):510-16 y propia.

## 12.4.- Caracterización Biológica del Hidrogel

### 12.4.1.- Adhesión

Se obtuvo el porcentaje de adhesión con respecto al plato de cultivo (TCP) que correspondería al control positivo, esto a 4 y 24 h. En la figura 21 se observa que el hidrogel liofilizado presenta mejor porcentaje de adhesión, sin embargo, tal y como se observa en la tabla 12, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de adhesión evaluados.



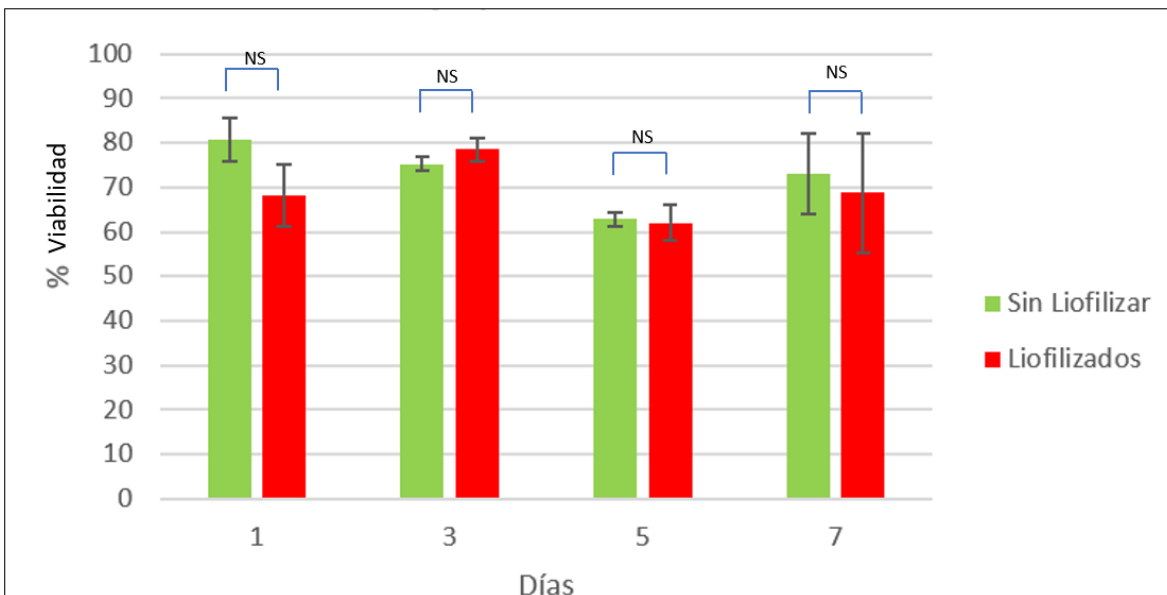
**Figura 21.** Porcentaje de adhesión con respecto al control positivo (plato de cultivo), tanto del hidrogel normal y como del liofilizado a 4 y 24 horas. Fuente: propia.

	t student 4 horas	t student 24 horas
p(1cola) =	0.1530	0.0677
p(2colas) =	0.3060	0.1353

**Tabla 12.** Valores de “p” para 1 o 2 colas obtenidos con t student comparando los porcentajes de adhesión con respecto al TCP de hidrogeles liofilizados contra los no liofilizados a 4 y 24 horas, no se observan diferencias estadísticamente significativas, en ninguno de los grupos a 4 o 24 horas. Fuente: propia.

### 12.4.2.- Viabilidad

Se realizó un ensayo de viabilidad comparando los hidrogeles liofilizados y sin liofilizar a 1, 3, 5 y 7 días con respecto al plato de cultivo (TCP), en la gráfica se observa una viabilidad sostenida durante la duración del ensayo, sin embargo, como se observa en la tabla 13 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos durante los días que duró el ensayo, sin embargo podemos decir que el ensayo arroja que ambos hidrogeles no son citotóxicos durante el tiempo de cultivo celular.



**Figura 22.** Porcentaje de viabilidad de los hidrogeles liofilizados y sin liofilizar con respecto al plato de cultivo (TCP) a 1, 3, 5 y 7 días. Fuente: propia.

	t student día 1	t student día 3	t student día 5	t student día 7
p(1cola) =	0.1491	0.1733	0.4152	0.2621
p(2colas) =	0.2983	0.3465	0.8304	0.5242

**Tabla 13.** Valores de “p” para 1 o 2 colas obtenidos con t student comparando los porcentajes de viabilidad con respecto al TCP de hidrogeles liofilizados contra los no liofilizados por 1, 3, 5 y 7 días, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Fuente: propia.



### 13.– Discusión

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria debido a que la complejidad de los problemas que intenta resolver exige un enfoque plural que abarque diversas áreas de conocimiento. Particularmente la regeneración de cartílago representa un gran reto, debido a que éste tejido carece de inervación e irrigación, dichas ausencias son suplidas por el pericondrio, el cual se encuentra rodeando al cartílago. Además, la formación de tejido cartilaginoso requiere condiciones especiales como, presencia del factor de transcripción Sox-9 y un medio carente de oxígeno. Particularmente en las articulaciones el tejido cartilaginoso regenerado suele ser fibrocartílago, el cual no tiene las mismas características que el cartílago hialino, esto es un problema considerando las complejas condiciones a las que estará sometido, particularmente las propiedades mecánicas son importantes ya que el cartílago está bajo constantes cargas mixtas (compresivas y de tracción).

En ese sentido el estándar de oro es el injerto autólogo, ya que, no genera respuesta inmune, ni de rechazo por parte del organismo, sin embargo, no siempre hay suficiente tejido disponible para realizar el injerto, particularmente en padecimientos como la osteoartritis que destruye amplias zonas de cartílago articular. Por lo tanto, se ha propuesto emplear diversos biomateriales naturales o sintéticos en el enfoque de la ingeniería de tejidos con la finalidad de regenerar cartílago. Los hidrogeles forman parte de los biomateriales sugeridos con esta finalidad debido a sus propiedades deseables tales como, biocompatibilidad, no tóxicos, son flexibles, hidrofílicos, particularmente los hidrogeles sintéticos son versátiles, ya que permiten sintonizar diversas características como su entrecruzamiento, y, por lo tanto, sus propiedades mecánicas, su degradabilidad, su capacidad de liberación controlada, y su excesiva ganancia de agua, su hinchamiento y su actividad biológica.

El polietilenglicol es un hidrogel sintético que se ha propuesto para ser empleado en bioingeniería de tejidos con la finalidad de la regeneración de cartílago, particularmente el PEG-D se entrecruza fácilmente con glutaraldehído, permitiendo controlar algunas de las propiedades mencionadas previamente, sin embargo, al igual que otros hidrogeles, no permite controlar su ganancia excesiva de agua y, por ende, tanto sus propiedades mecánicas como su reactividad biológica se ven

afectadas. En este proyecto se propuso sustituir la molécula del PEG-D por el polímero de naturaleza anfipática PEG-PPG-PEG, para de esta forma controlar la ganancia excesiva de agua, su hinchamiento y, por lo tanto, sus propiedades mecánicas y biológicas. En ese sentido se logró sintetizar un hidrogel a base del copolímero PEG-PPG-PEG y gelatina tipo A, empleando glutaraldehído como entrecruzante, además el hidrogel se funcionalizó con PRFC.

Primeramente, se demostró la biodisponibilidad del PRFC posterior a ser liofilizado, ya que los GFs tienen una vida media corta en forma libre o en la circulación, pues son altamente sensibles a la degradación proteolítica, además se podrían ver afectados por el proceso de liofilización en sí. Mediante la cuantificación de proteínas por BCA y la electroforesis SDS-PAGE se demostró la presencia de proteínas, particularmente la presencia y biodisponibilidad de varios factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , PDGF y el FGF posteriormente a ser sometidas al proceso de liofilización. Además, mediante el FTIR se identificaron las principales bandas asociadas a proteínas como la amida I ( $1649\text{ cm}^{-1}$ ), II ( $1143\text{ cm}^{-1}$ ) y III ( $1250\text{ cm}^{-1}$ ), el estiramiento N-H del grupo amino ( $3442\text{ a }3360\text{ cm}^{-1}$ ), y la tensión O-H ( $2500\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$ ) y C=O ( $1711\text{ cm}^{-1}$ ) del ácido carboxílico, además de algunas bandas específicas para algunos factores de crecimiento reportadas en la literatura como leucina ( $2131\text{ cm}^{-1}$ ), asparagina ( $1667\text{ cm}^{-1}$ ), glutamato ( $1728\text{ cm}^{-1}$ ), treonina ( $1075\text{ cm}^{-1}$ ) y prolina ( $1441\text{ cm}^{-1}$ ) entre otras. Esto concuerda con las bandas reportadas en la literatura para tales enlaces o grupos funcionales.(38–40)

Sin embargo, y a pesar de encontrar dichos resultados, el proceso se vio dificultado por el ruido de fondo obtenido en el espectro, razón por la cual se sugiere repetir la prueba incorporando el PRFC en una pastilla de bromuro de potasio (KBr) para proyectos posteriores.

Las bandas obtenidas con el FTIR del PRFC por separado se contrastaron con las bandas del del hidrogel ya sintetizado y funcionalizado con el mismo PRFC, donde se confirmó que no existió un corrimiento de dichas bandas hacia la región más energética del espectro, esto es importante ya que, de haberse dado, se dificultaría la liberación de los GFs de forma controlada y sostenida.

Existe controversia acerca de la eficacia del empleo de PRFC y PRP en procesos de regeneración tisular, en odontología se emplean de forma rutinaria en la clínica, particularmente en el área de periodoncia, implantología y cirugía bucal, por su potencial para la reparación de heridas sobre todo en tejidos blandos, existen tanto estudios que sustentan su aplicación, como otros que o bien, lo desestiman o concluyen se necesita mayor investigación al respecto.(19)

Plachokova y colaboradores realizaron una revisión sistemática para determinar el éxito de la aplicación de PRP en regeneración ósea, concluyeron que existen pruebas que sustentan los beneficios de emplear PRP en el tratamiento de los defectos periodontales, mientras que la evidencia de los efectos del PRP en la elevación del suelo del seno maxilar (ESM) parece ser débil. Respecto a otras aplicaciones del PRP en odontología no pudieron extraer conclusiones.(41,42)

La mayoría de los estudios se centran en los efectos *in vivo* ya sea en modelo animal o en un ensayo clínico de la aplicación del PRFC, por lo tanto, existen pocos estudios *in vitro* que evalúan la interacción de éste con el material y la eficacia del mismo como vehículo para brindar una liberación controlada y sostenida de los GFs. Esto es importante porque como demostró Hokugo y colaboradores, existe una diferencia importante entre colocar PRP solo y en el vehículo/andamio adecuado.(43)

Del mismo modo se identificaron con ayuda del FTIR las bandas que confirman el entrecruzamiento del glutaraldehído con la gelatina en mayor medida mediante la aparición del grupo imino de la base de schiff recién formada, y un leve entrecruzamiento de la gelatina con el PEG-PPG-PEG, estos datos concuerdan con lo encontrado en otros estudios. Además, se encontraron bandas que corresponden a la molécula del glutaraldehído, lo cual indica la presencia de grupos aldehídos libres en el hidrogel, posterior a ser sintetizado, las bandas concuerdan con lo reportado en la literatura.(27,44)

En este trabajo encontramos un valor para el módulo elástico de hasta 5.4 MPa en el hidrogel de PEG-PPG-PEG y apenas 1.6 MPa para el PEG-D, valores muy superiores a lo reportado en la literatura. Vahedi y colaboradores evaluaron las propiedades mecánicas de hidrogeles de gelatina y PEG, encontrando módulos

elásticos en rangos que van desde 0.0004 MPa hasta 2.0014 MPa, y valores de resistencia desde 0.004 MPa hasta 0.024 MPa.(45)

También se evaluó si se modificaron las propiedades mecánicas del hidrogel al ser liofilizado, y posteriormente rehidratado, se concluyó que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al someter los hidrogeles a estos procesos. Esto concuerda con lo encontrado por Luong y colaboradores, quienes estudiaron el efecto que tienen tres métodos de desecación, incluida la liofilización sobre las propiedades mecánicas y biológicas de un hidrogel de PEG, encontrando que éste proceso no afecta dichas características.(46)

Una parte importante de este proyecto fue evaluar la capacidad de absorción de los hidrogeles, para ello se compararon 3 grupos, el hidrogel de gelatina, uno de PEG-D y otro a base del polímero tribloque de naturaleza anfipática PEG-PPG-PEG, tal y como se esperaba, se observó que éste último tuvo un menor porcentaje de hinchamiento de los tres, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el PEG-D y el PEG-PPG-PEG, esto concuerda con los hallazgos encontrados por Truong y colaboradores donde compararon tres hidrogeles, uno de PEG, y dos con polímeros Pluronic, encontrando que los dos últimos tuvieron un menor hinchamiento.(31)

Respecto a los ensayos biológicos Truong y colaboradores encontraron que sus hidrogeles de PEG y de gelatina obtuvieron hasta un 95% de viabilidad con fibroblastos, mientras que los hidrogeles con polímeros Pluronic mostraron un alto porcentaje de muerte celular, aunque no lograron dilucidar la causa de este fenómeno, supusieron se debía a Pluronic sin reaccionar. En este estudio se encontró primeramente que si bien, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre liofilizar el andamio y emplearlo sin liofilizar sobre la adhesión celular y sobre la viabilidad, los resultados mostraron una respuesta biológica que puede mejorarse, ya que, mientras la adhesión celular es sobresaliente a 24 horas con respecto al TCP, la viabilidad a los 7 días no es concluyente. Debido a que los hidrogeles carecen de moléculas bioactivas, una perspectiva del trabajo sería funcionalizar dicho hidrogel con biocerámicas, que permitirían una mayor

interacción célula-material, lo cual podría inducir una proliferación celular en los ensayos *in vitro*.

La citotoxicidad del glutaraldehído está ampliamente descrita en la literatura(47). Sin embargo, cabe destacar que en nuestros ensayos de viabilidad celular el entrecruzante no es citotóxico, probablemente debido a los lavados posteriores a la síntesis del hidrogel y a la baja concentración de glutaraldehído empleado. Si bien no hay mucha literatura respecto al comportamiento biológico del copolímero PEG-PPG-PEG, si existen abundantes estudios que respaldan el uso del PEG, el cual es la base de estos hidrogeles. Zustiak y colaboradores sintetizaron diferentes combinaciones de hidrogeles de PEG con diferentes agentes entrecruzantes, encontrando una buena respuesta en adhesión y proliferación de fibroblastos gingivales.(48)

King y colaboradores demostraron que agregar factor de crecimiento fibroblástico 2 aumenta la viabilidad en andamios de PEG en células troncales mesenquimales humanas, lo cual es importante considerando que éste andamio está funcionalizado con PRFC.(24)

Nojoomi y colaboradores realizaron un ensayo biológico con hMSC de un hidrogel inyectable compuesto por PEG-laponita encontrando una viabilidad del 80%, la cual se incrementaba hasta 5% al realizar lavados del hidrogel para eliminar los grupos no reactivos de su agente entrecruzante.(49)

Obando y colaboradores realizaron la síntesis y caracterización de un hidrogel de PEG-D entrecruzado con glutaraldehído, el cual mostró una viabilidad satisfactoria a 24 horas con osteoblastos humanos.(29)

Martín del Campo y colaboradores realizaron un ensayo de proliferación con fibroblastos gingivales a 9 días en un hidrogel de PEG-D encontrando resultados satisfactorios.(30)

Todos estos estudios concuerdan con lo encontrado durante la realización de este proyecto, sustentando la seguridad en el empleo de los polímeros a base de PEG como una opción confiable para la elaboración de andamios con potencial aplicación en bioingeniería de tejidos.

## 14.- Conclusiones

- Se logró sintetizar un andamio de un hidrogel compuesto por PEG-PPG-PEG, gelatina tipo A, empleando glutaraldehído como entrecruzante, y funcionalizado con PRFC.
- Se realizó la caracterización físico química, mecánica y biológica del andamio a base del hidrogel de PEG-PPG-PEG, con lo cual se logró integrar los principios físico químicos que rigen el comportamiento mecánico y biológico del andamio.
- Se demostró que el hidrogel de PEG-PPG-PEG obtuvo una menor ganancia de agua y un menor hinchamiento comparado con los hidrogeles de PEG-D y de gelatina.
- Se identificó que las propiedades mecánicas del hidrogel de PEG-PPG-PEG mejoran con respecto al PEG-D y la gelatina, esto incluye un módulo elástico más alto y una mayor resistencia, demostrando un comportamiento mecánico más cercano al del cartílago e incluso al de hueso trabecular, lo cual va de la mano con la capacidad del hidrogel de controlar el hinchamiento y la ganancia excesiva de agua.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las propiedades mecánicas del hidrogel al ser liofilizado, ni vuelto a rehidratar, ni tampoco en su comportamiento biológico en los ensayos de adhesión celular y viabilidad, lo cual demuestra que la liofilización es un método confiable y eficiente para permitir el almacenamiento y distribución del hidrogel de PEG-PPG-PEG.
- Respecto a las propiedades biológicas del nuevo biomaterial, es decir, la adhesión celular y la viabilidad, si bien mostraron un desempeño satisfactorio, los resultados pueden ser mejorados, por lo tanto, se sugiere continuar investigando este aspecto del hidrogel.
- Si bien el biomaterial tiene un amplio potencial para ser empleado en la ingeniería de tejidos como andamio para la regeneración de cartílago, a continuación, se muestran algunas propuestas de posibles modificaciones o estudios a ser realizados en una ampliación del proyecto:

- Determinar la concentración de grupos aldehídos libres.
  - Sustituir el agente entrecruzante.
  - Añadir borohidruro de sodio o aumentar el tiempo de lavado para reducir el número de aldehídos libres.
  - Incorporar algún antibiótico, ya que el hidrogel se contamina fácilmente.
  - Añadir una cerámica bioactiva que mejore las propiedades mecánicas y al mismo tiempo induzca una respuesta celular específica, con el objetivo de dirigir el proyecto hacia la regeneración de tejido óseo o defectos osteocondrales.
  - Realizar un modelo animal para evaluar su desempeño *in vivo*.
  - Llevar a cabo un ensayo para evaluar si los factores de crecimiento se están liberando de forma controlada y sostenida mediante ELISA.
  - Realizar un estudio de degradación del hidrogel.
- Por lo tanto, surgen nuevas e interesantes líneas de investigación, que permitan ahondar en el conocimiento de este andamio a base de un hidrogel de naturaleza anfipática, el PEG-PPG-PEG, para aprovechar las ventajas de este material, y al mismo tiempo superar las desventajas del mismo, con miras hacia su potencial aplicación en bioingeniería de tejidos.

## 15.- Referencias Bibliográficas

1. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. Tercera ed. Ciudad de México: Panamericana; 2009.
2. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2002;4:30–5.
3. Hernández-gil IF, Angel M, Gracia A, Pingarrón C, Carlos J, Hernández-gil DIF. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I . *Histología y fisiología del tejido óseo*. 2005;(1):47–51.
4. Zhu J. Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomaterials*. 2011;31(17):4639–56.
5. M Singh, Detamore MS. Tensile Properties of the Mandibular Condylar Cartilage. *J Biomed Eng*. 2008;130(February):1–7.
6. Robinson DL, Kersh ME, Walsh NC, Ackland DC, Steiger RN De, Pandy MG. Mechanical properties of normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater [Internet]*. 2016;61:96–109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.01.015>
7. Boschetti F, Peretti G. MECHANICAL PROPERTIES OF NORMAL AND OSTEOARTHRITIC HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. *J Biomech*. 2008;41(July):2008.
8. Correa D, Lietman SA. Seminars in Cell & Developmental Biology Articular cartilage repair : Current needs , methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol [Internet]*. 2017;62:67–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.013>
9. Triplett RG, Budinskaya O. *New Frontiers in Biomaterials*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2017;29:105–15.
10. Flores E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Investig clínica*. 2006;58(5):498–511.
11. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, Bari C De. Stem cell niches in mammals. 2007;3.
12. Mcniece I. Letter to the Editor Subsets of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy [Internet]*. 2007;9(3):301–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240701218540>
13. Horwitz EM, Blanc K Le, Dominici M, Mueller I, Marini FC, Deans RJ, et al. Clarification of the nomenclature for MSC : The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy [Internet]*. 2005;7(5):393–5. Available



from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240500319234>

14. Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
15. Kojima K, Ph D, Westerman K, Ph D, Yamato M, Ph D, et al. The Potential of Stem Cells in Adult Tissues. 2011;17.
16. Carrow JK, Kerativitayanan P, Jaiswal MK, Lokhande G, Gaharwar AK. Polymers for bioprinting. *Essentials 3D Biofabrication Transl*. 2015;229–48.
17. Chen J, Long F. mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Res*. 2018;6(1).
18. Hall MN. mTOR-What Does It Do? *Transplant Proc* [Internet]. 2008;40(10 SUPPL.):S5–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.009>
19. Ibero Sagastibelza I, Castro Lara J, Bascones Martínez A. Factores de crecimiento y periodoncia: Una revisión bibliográfica actualizada. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2010;14(3).
20. Atashi F, Jaconi MEE, Pittet-cue B. Autologous Platelet-Rich Plasma : Mesenchymal Stem Cell Expansion. *TISSUE Eng*. 2015;21(3):253–63.
21. Zhu J, Merchant R. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2012;8(5):607–26.
22. Singh MR, Patel S, Singh D. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering [Internet]. *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc.; 2016. 231–260 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42865-1.00009-X>
23. Tan F, Xu X, Deng T, Yin M, Zhang X, Wang J. Fabrication of positively charged poly (ethylene glycol) -diacrylate hydrogel as a bone tissue engineering scaffold. *Biomed Mater*. 2012;055009(7):1–10.
24. King W, Jongpaiboonkit L, Murphy W. Influence of FGF2 and PEG hydrogel matrix properties on hMSC viability and spreading. *J Biomed Mater Res*. 2011;93(3):1110–23.
25. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2014;1840(8):2506–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>

26. Shankar KG, Gostynska N, Montesi M, Panseri S, Sprio S, Kon E, et al. Investigation of different cross-linking approaches on 3D gelatin scaffolds for tissue engineering application: A comparative analysis. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;95:1199–209. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.010>
27. Farris S, Song J, Huang Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. *J Agric Food Chem*. 2010;58(2):998–1003.
28. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(SUPPL.):223–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>
29. Obando-Suárez MA, Oliva Ridríguez R, González-Ortega O, Komabayashi T, Flores-Arriaga JC, Cerda-Cristerna BI. BMP-7 loaded PEG-d, gelatin type-A hydrogels for mineral-tissue regeneration. *Dent Mater* [Internet]. 2015;31:e61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.136>
30. Martín del Campo B. Síntesis y evaluación de biocompatibilidad de un hidrogel de polietilenglicol diamina y gelatina tipo A para regeneración ósea. Universidad Autonoma de Aguascalientes; 2017.
31. Truong VX, Tsang KM, Forsythe JS. Nonswelling Click-Cross-Linked Gelatin and PEG Hydrogels with Tunable Properties Using Pluronic Linkers. *Biomacromolecules*. 2017;18(3):757–66.
32. Lai TC, Kataoka K, Kwon GS. Bioreducible polyether-based pDNA ternary polyplexes: Balancing particle stability and transfection efficiency. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012;99:27–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.026>
33. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Glenn H, Chmelka BF, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* (80- ). 2016;279(5350):548–52.
34. Chanes OA. Preparación de un composite a partir de una cerámica mesoporosa tipo SBA-15 y fibras de PLA. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
35. Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA, Höchst IP. OSTEOARTHRITIS — AN UNTREATABLE DISEASE ? *Nat Rev*. 2005;4(APRIL).
36. Skoog D, James H, Stanley C. Principios de análisis instrumental. Sexta Edic. México D.F.: CENGAGE Learning; 2008. 430–480 p.
37. Askeland D, Pradeep F, Wright W. Materiales de construcción. In: Ciencia e ingeniería de materiales. Sexta Edic. México D.F.: CENGAGE Learning; 2012. p.

- 705–10.
38. Miller LM, Bourassa MW, Smith RJ. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2013;1828(10):2339–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.014>
  39. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2007;1767(9):1073–101.
  40. Glassford SE, Byrne B, Kazarian SG. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2013;1834(12):2849–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>
  41. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NHJ. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(6):539–45.
  42. Sánchez Garcés M, García Delaney C, Montserrat Bosch M, Díaz Campos E, Nogueira Magalhães P, Herranz Aparicio J, et al. Revisión bibliográfica de Implantología Bucofacial del año 2011: segunda parte. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2013;25(2):99–117.
  43. Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, et al. Augmented Bone Regeneration Activity of Platelet-Rich Plasma by Biodegradable Gelatin Hydrogel. *Tissue Eng*. 2005;11(7–8):1224–33.
  44. Wang H, Heilshorn S. Adaptable Hydrogel Networks with Reversible Linkages for Tissue Engineering. *Adv Mater*. 2016;27(25):3717–36.
  45. Vahedi M, Barzin J, Shokrolahi F, Shokrollahi P. Self-Healing, Injectable Gelatin Hydrogels Cross-Linked by Dynamic Schiff Base Linkages Support Cell Adhesion and Sustained Release of Antibacterial Drugs. *Macromol Mater Eng*. 2018;303(9):1–10.
  46. Luong P, Browning M, Bixler R. Drying and Storage Effects on Poly(ethylene glycol) Hydrogel Mechanical Properties and Bioactivity. *J Biomed Mater Res*. 2015;102(9):3066–76.
  47. Gough JE, Scotchford CA, Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen / poly ( vinyl alcohol ) films is by the mechanism of apoptosis. 2001;
  48. Zustiak S, Leach J. Hydrolytically degradable poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds with tunable degradation and mechanical properties. *Biomacromolecules*.

2011;11(5):1348–57.

49. Nojoomi A, Tamjid E, Simchi A, Bonakdar S, Stroeve P. Injectable polyethylene glycol-laponite composite hydrogels as articular cartilage scaffolds with superior mechanical and rheological properties. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. 2017;66(3):105–14. Available from: <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1182914>