



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

“Síntesis y caracterización de un hidrogel de origen polimérico a base de poli(acrilamida) como matriz extracelular sintética”

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

Mtra. Rocío Torres García

Comité Tutorial:

Dra. Miriam Flores Merino

Tutor Académico

Dr. Jaime Flores Estrada

Tutor Interno

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Tutor Externo

Toluca, Estado de México, marzo de 2021



Resumen	4
Introducción	6
1. Antecedentes	9
1.1 Matriz extracelular	9
1.2 Biomateriales	11
1.3 Tipos de biomateriales	12
1.3.1 Clasificación	15
1.3.2 Poliacrilamida	17
1.3.3 Gelatina	20
1.4 Hidrogeles y propiedades mecánicas	22
1.5 Propiedades reológicas de los hidrogeles	23
1.6 Biocompatibilidad	25
1.7 Ingeniería de tejidos en piel y andamiajes	28
1.8 Estudios previos	30
2. Planteamiento del problema	31
3. Justificación	31
4. Hipótesis	32
5. Objetivos: General y específicos	33
6. Diseño metodológico	33
6.1 Diseño de estudio	33
6.2 Materiales	34
6.3 Procedimientos	34
6.3.1 Preparación de los hidrogeles	33
A. Hidrogel de gelatina	34
B. Hidrogel de poliacrilamida	34
C. Síntesis de la red polimérica semi-	34
interpenetrada (semi-IPN) de poliacrilamida/gelatina	
(PAM/Gel)	
6.3.2 Caracterización físico-química de los hidrogeles	35
A. Espectroscopía ATR FT-IR	35
B. Espectroscopía RAMAN	35

C. Pruebas reológicas	36
D. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	36
E. Capacidad de hinchamiento	37
6.3.3 Citocompatibilidad <i>in vitro</i>	37
A. Cultivo celular de fibroblastos	37
B. Ensayo de viabilidad	38
C. Ensayo de hemolisis	39
D. Análisis de resultados	38
E. Aspectos éticos	39
7. Resultados	40
7.1 Artículo aceptado	40
7.1.1 Título del artículo aceptado	40
7.1.2 Página frontal del manuscrito	41
7.2 Artículo enviado	42
7.2.1 Título del artículo enviado	42
7.2.2 Carta de envío	42
8. Resultados adicionales	43
8.1 Propiedades reológicas módulo de almacenaje y módulo de pérdida	43
8.2 Viscosidad	44
9. Discusión general	45
10. Conclusión generales	49
11. Bibliografía	50
12. Anexos	59

RESUMEN

La pérdida de tejidos y órganos es uno de los problemas más graves para la salud humana, debido al limitado número de donantes y altos costos del tratamiento, para enfrentar estas dificultades nace la ingeniería de tejidos como una opción con el propósito para restaurar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido dañado, a partir de la aplicación de matrices tridimensionales (*andamios*), las cuales pueden ser cargadas con células o moléculas bioactivas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es sintetizar y caracterizar una red polimérica semi-interpenetrada (semi-IPN) de Poliacrilamida/Gelatina (PAM/Gel) por el método de radicales libres. La caracterización química se llevó a cabo a través de la identificación de sus principales grupos funcionales mediante el análisis de espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía RAMAN. Además, se realizó la caracterización topográfica del material a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), se analizó la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles combinados a tres temperaturas diferentes (4, 36 y 60 °C), también se evaluó la viabilidad celular de fibroblastos humanos BJ y fibroblastos de ratón Swiss 3T3 a través del ensayo de MTT en contacto directo e indirecto con los hidrogeles, además, se realizó la prueba de compatibilidad de los hidrogeles con eritrocitos humanos. Así mismo, se realizaron pruebas reológicas de los biomateriales como, módulo de almacenaje, módulo de pérdida y viscosidad. Los resultados obtenidos en las pruebas físicoquímica y biológicas sugieren que la semi IPN de PAM/Gel podría ser una buena opción como matriz extracelular biosintética para aplicaciones en bioingeniería de tejidos.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, andamiajes, caracterización físico- química y propiedades biológicas y reológicas.

ABSTRACT

The loss of tissues and organs is one of the most serious problems for human health, due to the limited number of donors and high treatment costs, to face these difficulties, tissue engineering is born as an option with the purpose of restoring, maintaining or improve the function of a damaged organ or tissue, from the application of three-dimensional matrices (scaffolds), which can be loaded with bioactive cells or molecules. Therefore, the objective of this work is to synthesize and characterize a semi-interpenetrated polymeric network (semi-IPN) of Polyacrylamide / Gelatin (PAM / Gel) by the free radical method. Chemical characterization was carried out through the identification of its main functional groups by Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR) and RAMAN spectroscopy analysis. In addition, the topographic characterization of the material was carried out through scanning electron microscopy (SEM), the swelling capacity of the combined hydrogels was analyzed at three different temperatures (4, 36 and 60 ° C), the cell viability was also evaluated of BJ human fibroblasts and Swiss 3T3 mouse fibroblasts through the MTT test in direct and indirect contact with the hydrogels, in addition, the compatibility test of the hydrogels with human erythrocytes was performed. In addition, rheological tests of biomaterials such as storage modulus, loss modulus and viscosity were carried out. The results obtained in the physicochemical and biological tests suggest that the PAM / Gel semi-IPN could be a good option as a biosynthetic extracellular matrix for applications in tissue bioengineering.

Keywords: Tissue engineering, scaffolds, physicochemical characterization, and biological and rheological properties.

INTRODUCCIÓN

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La pérdida de tejidos y órganos es uno de los problemas más frecuentes, graves y costosos para la salud humana. Cada año, millones de personas sufren o mueren a causa de la pérdida de tejidos y órganos causados por enfermedades crónicas degenerativas, envejecimiento o trauma. (Li *et al.* 2015).

El trasplante de órganos está limitado por el número de donantes disponibles, así como altos costos de fabricación, dejando a miles de personas cada año en la lista de espera de un trasplante y muchos mueren antes de recibir un órgano (Gowers *et al.*, 2018). La ingeniería de tejidos surge como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida desarrollando sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran su función. Mediante el progreso de métodos para regenerar tejidos humanos o reconstruir órganos enteros, a través de la aplicación de matrices tridimensionales (andamios), con células, factores de crecimiento y de diferenciación celular (figura1) (Zhao *et al.*, 2020). Los hidrogeles, son redes tridimensionales con alto contenido de agua y buena biocompatibilidad, se han utilizado ampliamente como andamios para imitar la estructura y propiedades de los tejidos (Zhang *et al.*, 2020).

Matrices tridimensionales (andamiajes)

Gelatina, poliacrilamida, polietilenglicol, quitosano, etc.

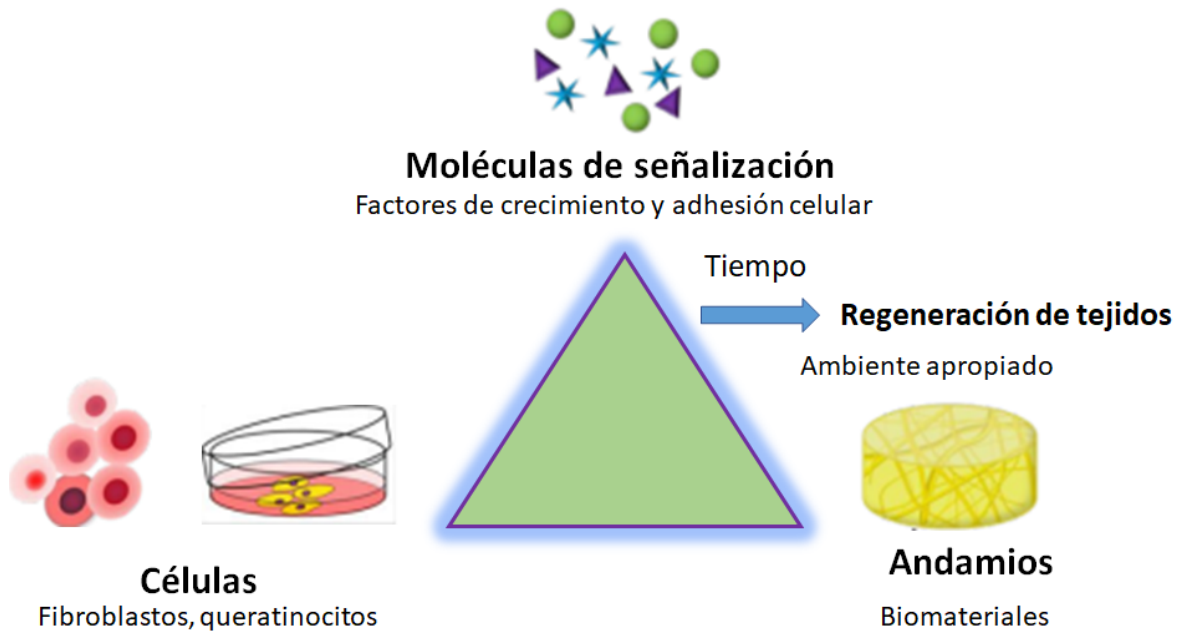


Figura 1. Triada de la Ingeniería de tejidos, modificado He, *et al.* (2020).

Esta disciplina ha crecido durante los últimos treinta años con diferentes aplicaciones en piel, hueso, tejido nervioso, tejido cardiovascular, entre otros. Una de las aplicaciones más prometedoras es la referente a la ingeniería de tejidos en piel, con avances importantes en el desarrollo de sustitutos biológicos (Arias *et al.*, 2015). Los injertos de piel han evolucionado a partir de los autoinjertos y aloinjertos a sustitutos biosintéticos de la ingeniería de tejidos (Chaves *et al.*, 2015).

Algunos ejemplos de sustitutos temporales o permanentes de la ingeniería tisular de piel son: cultivos de injertos de queratinocitos autólogos, injertos de queratinocitos alogénicos, materiales compuestos autólogos/alógenicos, matrices biológicas acelulares y matrices celulares incluyendo compuestos biológicos tales como sellante de fibrina y varios tipos de colágeno, ácido hialurónico, etc. Todas estas alternativas han abierto nuevas perspectivas para hacer frente a la pérdida de

piel. En el caso de los pacientes con quemaduras extensas se ha demostrado que los sustitutos de piel con injertos cultivados pueden ser un medio para salvar la vida (Dantzer, 2015), así como también para la regeneración de tejidos en pacientes con úlcera de pie diabético para evitar la pérdida de la extremidad inferior. Este tipo de investigación se enfoca en crear sustitutos de piel con una epidermis cultivada en circunstancias apropiadas que pueden proporcionar una cobertura para la herida que podría ser perdurable y estéticamente aceptable como injertos de piel convencionales. Así mismo, la ingeniería de tejidos desarrolla técnicas de cultivo de células en matrices sintéticas o biológicas, los avances en estas técnicas podrían conducir a la producción de sustitutos de piel con mejores propiedades como nuevos productos que simulen las características de la piel humana (Donderwinkel *et al.*, 2017).

Actualmente se están investigando el desarrollo de diferentes tipos de tejidos incluyendo óseo, muscular, adiposo y nervioso (Goonoo and Bhaw-Luximon., 2019). Los productos de ingeniería de tejidos pueden ser fabricados mediante dos estrategias: 1) síntesis del tejido u órgano en el laboratorio con funcionamiento y 2) formación de tejido funcional después de la implantación del andamiaje o matriz extracelular (sintética o biológica) (Vijayaraghavan *et al.*, 2009). En esta última estrategia, generalmente los andamiajes se combinan con células o incluso con moléculas bioactivas, por ejemplo: factores de crecimiento. Varias estrategias de ingeniería de tejidos emplean biomateriales como andamiajes para crear sustratos tridimensionales, sembrados con células antes de ser trasplantados. Estos materiales sirven para promover la reorganización celular que forman un tejido funcional (Camarero-Espinosa *et al.*, 2016).

1. ANTECEDENTES

1.1 MATRIZ EXTRACELULAR

La composición de la matriz extracelular (MEC) consiste en una compleja mezcla de moléculas, donde la célula, reside prolifera y realiza diferentes funciones como la secreción de citosinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y diferenciación celular, los componentes de la MEC son producidos y secretados por las mismas células. Estas moléculas de adhesión o diferenciación celular tienen la función de señalización directa a través de interacciones con receptores de la matriz como integrinas o por medio de receptores de los factores de crecimiento. La matriz extracelular tiene una estructura tridimensional y propiedades que varían de acuerdo con el tipo de tejido. Las principales macromoléculas que componen a la MEC son fibras colágenas, fibras elásticas y proteoglicanos, estos componentes son los responsables de la arquitectura específica extracelular de cada tejido (Hoshiba and Yamaoka., 2019).

El colágeno, uno de los principales componentes de la MEC, es una proteína fibrosa, que es el más abundante componente de la piel, tendones, ligamentos, hueso y cartílago en los mamíferos. Esta es una molécula que tiene varias formas y tamaños, por ejemplo, está compuesto por tres cadenas polipeptídicas, que forman una estructura triple helicoidal. Esta estructura helicoidal tiene la función de ensamblar diversas estructuras supramoleculares. El proceso de biosíntesis del colágeno es complejo ya que implica varias modificaciones postraduccionales, las cuales están siendo estudiadas para desarrollar nuevos enfoques para el uso de colágeno en la regeneración y reparación de tejidos (Pawelec *et al.*, 2016).

Otro de los componentes importantes de la MEC son las fibras elásticas, las cuáles son macromoléculas compuestas por un manto micro fibrilar externo y un núcleo interno de elastina que constituye ~ 90 % de la fibra. Se pueden estirar linealmente hasta 150 % de su longitud original antes de que se rompan. Las fibras elásticas son impulsadas entrópicamente por la capacidad de la elastina para estirarse y retroceder al estado original sin dañarse debido a enlaces cruzados (Moore *et al.*, 2020).

Los proteoglicanos (PGs) están compuestos por cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), unidos covalentemente a un núcleo proteico específico, los PGs se clasifican de acuerdo a sus proteínas centrales, localización y composición. Las tres familias principales son: proteoglicanos pequeños ricos en leucina, proteoglicanos modulares, y proteoglicanos de la superficie celular. Estas moléculas soportan altas fuerzas de compresión y son extremadamente hidrófilas (Hay., 2013).

Debido a que la matriz extracelular es un componente esencial, ha sido estudiada para desarrollar algunas aplicaciones terapéuticas (Sionkowska., 2011). Así mismo se ha explorado su uso como biomateriales de origen natural para su aplicación en la ingeniería de tejidos. Otras estrategias se enfocan a imitar las propiedades de la MEC a través de la fabricación de biomateriales sintéticos.

1.2 BIOMATERIALES

En el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, se encuentran disponibles varias estrategias prometedoras para reparar y/o reemplazar los tejidos dañados, la mayoría de estas estrategias dependen del uso de principios químicos para diseñar biomateriales como sustitutos biológicos que imitan y/o estimulan las funciones de los tejidos. Un biomaterial es cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen sintético o natural que se puede usar durante un periodo de tiempo determinado y que reemplaza parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo (Rahmati *et al.*, 2020), como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en la medicina humana o veterinaria (Agarwal *et al.*, 2020) y para mantener o mejorar la calidad de vida de un individuo.

La principal característica para emplear un material como biomaterial es que debe ser biocompatible, es decir tener la habilidad de ser aceptado por el cuerpo del paciente y que, además, no irrite a los tejidos circundantes, no provoque una respuesta inflamatoria, no produzca reacciones alérgicas y que no tenga efectos carcinogénicos (Jacobs *et al.*, 2020). Otra característica importante es la funcionalidad de un biomaterial que depende de su capacidad de adaptarse o conseguir la forma adecuada para desempeñar una función en particular (Agarwal *et al.*, 2020). Por ejemplo, los biomateriales están diseñados para servir como matrices que proporcionan un microambiente para la proliferación, organización y adhesión celular. Se ha demostrado que diferentes biomateriales de origen

sintético, natural o combinados tienen un alto potencial para aplicaciones biomédicas.

1.3 TIPOS DE BIOMATERIALES: METÁLICOS, CERÁMICOS, POLIMÉRICOS Y COMPUESTOS.

1.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES

Existen diferentes tipos de biomateriales que se han vuelto cada vez más importantes dentro de la medicina regenerativa y en la ingeniería de tejidos como dispositivos capaces de establecer interacciones específicas con medios biológicos estimulando respuestas celulares (Mateos *et al.*, 2015). Una de las clasificaciones más utilizada los agrupa dependiendo de su naturaleza en materiales metálicos, cerámicos y poliméricos.

Los materiales metálicos desempeñan un papel fundamental como biomateriales para ayudar en la reparación o sustitución del tejido óseo dañado y para la fabricación de dispositivos médicos. Ejemplos del uso de materiales metálicos incluyen: articulaciones artificiales de cadera, placas óseas, e implantes dentales (Chen and Thouas., 2015). Los metales son adecuados en aplicaciones de soporte de carga debido a su combinación de alta resistencia mecánica y persistencia a la fractura. Actualmente se han aprobado biomateriales metálicos de uso general que incluyen aceros inoxidable, titanio y aleaciones a base de cobalto-cromo y de metales preciosos, como plata y oro. Una limitación es la posible liberación de iones y/o partículas metálicas tóxicas debido a la corrosión o los procesos que conducen a las cascadas inflamatorias que reducen biocompatibilidad y producen la pérdida de tejido (Chen *et al.*, 2015).

Los biomateriales cerámicos o biocerámicos son compuestos químicos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, son generalmente, duros y frágiles. Además de tener un alto punto de fusión y una baja conductividad térmica y eléctrica, los cerámicos se consideran resistentes al desgaste. Los principales biocerámicos son alúmina, zirconia, hidroxiapatita, porcelanas, vidrios bioactivos, entre otros. Sus principales aplicaciones se enfocan en el sistema óseo, con todo tipo de implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones dentales, en válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales, entre otros (Thrivikraman., 2014).

Los biomateriales poliméricos son macromoléculas que se forman a través de la unión de monómeros. Se considera que son relativamente fáciles de fabricar, a un costo razonable y con buenas propiedades mecánicas y físicas. Existen diferentes clasificaciones de los polímeros, de acuerdo con su origen se dividen en naturales y sintéticos. Los polímeros naturales forman la base misma de la vida, y pueden ser de origen animal como el colágeno y la gelatina, origen marino: quitina/quitosano y origen agrícola (Mann *et al.*, 2018).

Los polímeros sintéticos se utilizan para la obtención de plásticos, fibras y elastómeros. Tienen gran importancia en el área biomédica, así como en la industria de los plásticos, entre los materiales poliméricos sintéticos más utilizados podemos encontrar el polietileno, politetrafluoroetileno, algunos polímeros acrílicos, poliésteres de la familia de los polietilen tereftalato, poliamidas poliuretanos o cauchos de silicona. Estos polímeros han demostrado su utilidad en el área biomédica y sobre todo como soporte en los procesos de regeneración de tejido,

desarrollo y proliferación celular (Samadian *et al.*, 2020). Sin embargo, se necesita un análisis más detallado de sus propiedades e implicaciones de su uso en el cuerpo humano.

Algunos ejemplos de la utilidad de los polímeros naturales y sintéticos en la medicina clínica incluyen componentes esenciales de las prótesis permanentes, como los implantes de cadera artificiales, injertos vasculares, catéteres, prótesis faciales, partes de prótesis de oído, aplicaciones dentales; marcapasos, y regeneración de tejido como piel, hueso y órganos como, riñones, hígado y pulmones, entre otros.

Un tipo de material polimérico que ha captado la atención de los científicos son los hidrogeles, los cuáles se definen como redes tridimensionales. Su estructura se diferencia de los polímeros lineales ya que las cadenas formadas por los monómeros conforman una malla. Entre las redes poliméricas se encuentran las redes inter- penetradas y las redes semi-interpenetradas.

Las redes poliméricas inter-penetradas (IPN) son sistemas que consisten en dos redes de polímeros reticulados que están físicamente entrelazados, pero no químicamente entrelazados. Las redes poliméricas semi-interpenetradas (semi-IPN) son sistemas que consisten en un polímero lineal (es decir, no reticulado, que está físicamente entrelazado dentro de una red de polímero reticulado (Silverstein., 2020).

Las propiedades de los biomateriales son importantes para la ingeniería de tejidos, proporcionan las características físicas, químicas y biológicas para guiar a las células en los procesos de migración, adhesión y diferenciación. La degradación de

los biomateriales debe ser proporcional a la formación de nuevos tejidos para permitir que las células depositen nueva MEC y proporcionar el soporte mecánico apropiado para desarrollar un tejido funcional (Egbo., 2020). El diseño y control de las propiedades de estos materiales puede lograr una respuesta biológica específica (Mitragotri y Lahann, 2009).

1.3.2 POLIACRILAMIDA

La acrilamida es una amida incolora, inodora y cristalina, es un monómero altamente soluble en agua (fig. 2), que polimeriza rápidamente y se puede formar como un subproducto durante el calentamiento de alimentos ricos en almidón a alta temperatura. El mayor uso de la acrilamida es como intermediario en la producción de productos químicos orgánicos y en la síntesis de poliacrilamida. El polímero no es tóxico, se utiliza sobre todo en laboratorios de investigación para la electroforesis, aplicaciones industriales como aditivo en cosméticos, cromatografía, microscopía electrónica y tiene un gran número de aplicaciones en laboratorios de biotecnología (NCBI, 2016). A pesar de su utilidad como polímero, la exposición al monómero puede causar daños en el sistema nervioso central y periférico que resulta en alucinaciones, somnolencia y adormecimiento en las manos y las piernas. Ha sido ampliamente reportado que el monómero de acrilamida es un carcinógeno en humanos y animales (Bucur, 2018).

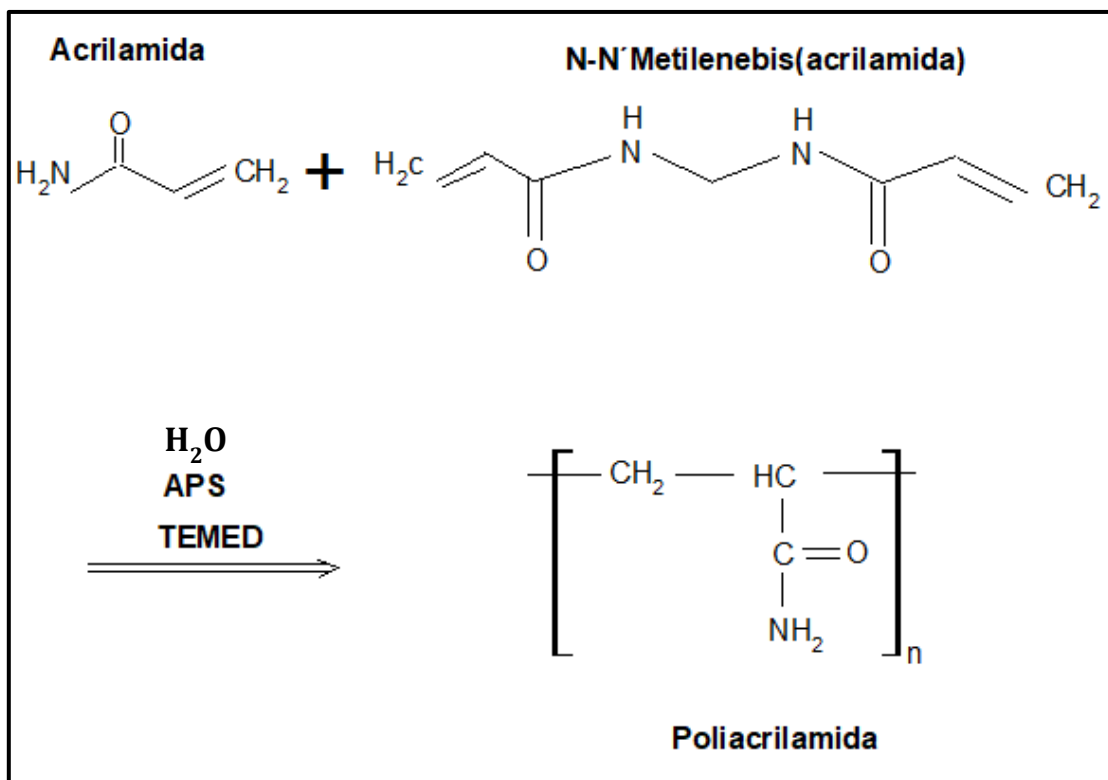


Figura 2. Esquema de la síntesis de poliacrilamida

La poliacrilamida (PAM) ha sido ampliamente empleada para la formación del hidrogeles o redes poliméricas. Este polímero en su estructura como red tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, esta propiedad se debe principalmente a su elasticidad y porosidad. Brevemente, los hidrogeles pueden absorber y liberar agua de manera reversible en respuesta a estímulos específicos, como: temperatura, pH, fuerza iónica (Iswariya *et al.*, 2016). La capacidad de ajustar sus propiedades dependiendo de las variaciones fisiológicas los promueve como candidatos potenciales para la ingeniería de tejidos. (Zhang *et al.* 2020).

En general se puede mencionar que los hidrogeles de PAM han sido un material con un gran número de aplicaciones para el cultivo celular *in vitro* en dos dimensiones, debido a que proporcionan una base biológicamente neutra (bioinerte)

para la exposición controlada de señales bioquímicas. Los hidrogeles de PAM están formados a partir de monómeros disponibles comercialmente, y permiten un control sencillo de propiedades mecánicas mediante el control de la concentración de agente de reticulación. En particular, una gran parte de los estudios *in vitro* relacionadas con los fibroblastos se han llevado a cabo en hidrogeles de PAM recubiertos con colágeno tipo I, donde se han examinado los gradientes de rigidez, normalmente obtenidos mediante la variación de densidad de reticulación y por lo tanto del módulo elástico. Varios estudios que utilizan poliacrilamida indican que las propiedades mecánicas del medio extracelular desempeñan un papel importante en la activación de fibroblastos, que contribuyen a la fibrosis y cicatrización de heridas (Smithmyer *et al.*, 2014).

1.3.3 GELATINA

La gelatina es un material natural derivado del colágeno, es biocompatible, biodegradable y tiene propiedades gelificantes, sin embargo, tiene un punto de fusión relativamente bajo, que conduce a obtener hidrogeles inestables a temperatura ambiente. La gelatina es un material utilizado en el campo biomédico como sistema de liberación de fármacos y vendajes para la regeneración de heridas (Geng *et al.* 2020).

Se define como una macromolécula natural, y comestible. Contiene principalmente los residuos de tres aminoácidos de glicina (dispuestos cada tercer residuo), prolina y la estructura 4-hidroxiprolina (Pal *et al.*, 2007). Se deriva comúnmente del colágeno, a partir de su hidrólisis parcial, que es considerada la principal fuente de proteína fibrosa es el hueso, cartílago y la piel. Por lo tanto, la edad del animal y el

tipo de colágeno son factores intrínsecos que influyen en las propiedades de la gelatina, hasta la fecha se han identificado hasta 27 tipos de colágeno. El colágeno tipo I tiene mayor presencia en el tejido conectivo.

Las moléculas de colágeno intersticial se componen de tres cadenas α entrelazadas denominadas colágeno de triple hélice (Michelini *et al.*, 2020). Para obtener gelatina, el colágeno natural insoluble debe ser pre-tratado antes de que se pueda convertir en una forma adecuada para la extracción; normalmente se realiza por calentamiento en agua a temperaturas superiores a 45° C. Un pretratamiento químico consiste en romper los enlaces no covalentes con el fin de desorganizar la estructura de la proteína, produciendo así un adecuado hinchamiento y solubilización de colágeno. Para desestabilizar la triple hélice de enlaces covalentes y puentes de hidrogeno se necesita un tratamiento térmico, el cual resulta en la transición y conversión a gelatina (fig. 3) (Liu *et al.*, 2020).

El grado de conversión del tratamiento de colágeno a gelatina se relaciona con el pretratamiento y el proceso de extracción del agua caliente como una función de pH, la temperatura y tiempo de extracción (fig. 3). Dos tipos de gelatina son obtenidos dependiendo del procedimiento del pretratamiento. Se conoce comercialmente como gelatina tipo A (punto isoeléctrico pH 8-9) y gelatina tipo B (punto isoeléctrico pH 4-5), obtenido bajo pretratamiento en condición alcalina o ácida respectivamente.

La calidad de la gelatina depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas incluyendo las propiedades reológicas, tales como los parámetros de composición, solubilidad, transparencia, color, olor y sabor, principalmente la calidad comercial de la gelatina es la fuerza y estabilidad térmica del gel (gelificación

y temperatura de fusión). La resistencia y la termo-estabilidad del gel obtenido dependen en gran medida de las propiedades moleculares de la gelatina, respecto a dos factores principales: (i). La composición de aminoácidos que es específica de la especie, y (ii) la distribución del peso molecular que se debe principalmente a las condiciones de procesamiento (Zhang *et al.*, 2005).

Como polímero biocompatible se ha utilizado en productos farmacéuticos como vehículo de liberación de fármacos, biomoléculas activas, así como productos médicos y comestibles, en aplicaciones biomédicas en la generación de andamios para la ingeniería de tejidos, la gelatina puede ser utilizada sola o en combinación con otros polímeros sintéticos (Favatela *et al.*, 2020).

Los hidrogeles de gelatina combinados con otros polímeros como celulosa y nanopartículas de plata poseen una gran capacidad de cicatrización de heridas cutáneas (Gou *et al.*, 2020), además, los hidrogeles de gelatina combinados con ácido hialuronato mostraron buena adhesión y proliferación celular por lo tanto son hidrogeles biocompatibles y pueden ser utilizados como materiales para la regeneración de tejidos (Chang *et al.*, 2021).

Gelatina

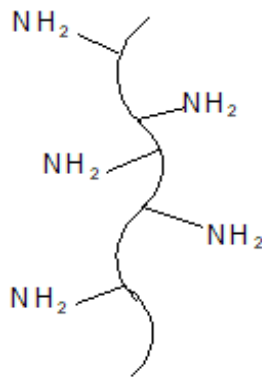


Figura 3. Ilustración esquemática de gelatina (Lai *et al.* 2017).

1.4 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS HIDROGELES

Los biomateriales sintéticos, como las redes basadas en polímeros, se han utilizado ampliamente como imitadores de tejidos, proporcionando soporte mecánico para el cultivo de células en dos y tres dimensiones. Actualmente, ha habido grandes mejoras en el diseño y la aplicación de hidrogeles con funciones especiales como hidrogeles superabsorbentes, con gran elasticidad, autorreparables, entre otros. Sin embargo, el desarrollo de hidrogeles con rendimiento altamente mecánico sigue siendo un desafío, para el tejido de hueso y los tejidos blandos como músculo tendones, cartílago y piel que soportan cargas (Jing., 2020).

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles como andamios en escalas macroscópicas y microscópicas juegan un papel crucial en regulación del comportamiento celular. Las señales biomecánicas y las interacciones entre células

y matriz extracelular (MEC) dirigen el fenotipo y genotipo celular. La rigidez del (MEC) afecta a los fibroblastos dérmicos humanos adultos. También las células expuestas a sustratos más rígidos exhiben un módulo elástico más alto en su membrana plasmática con un citoesqueleto de actina mejor organizado. Además, las células cultivadas en sustratos más rígidos proliferan más rápido y migran más lentamente en comparación con las cultivadas sobre sustratos blandos (Vedadghavami 2017). Sin embargo, la mayoría de los hidrogeles poliméricos convencionales son débiles en resistencia mecánica, falta de tenacidad con baja eficiencia de autoreparación, para compensar estas fallas, se han explorado diferentes estrategias, entre las que se pueden mencionar la construcción de redes dobles, modulación del grado de entrecruzamiento, el uso de nanopartículas inorgánicas como fase de refuerzo o las moléculas de conexión con enlaces no covalentes que generan hidrogeles supermoleculares para proporcionar suficiente resistencia mecánica a los hidrogeles poliméricos. Otras estrategias incluyen la combinación con materiales de diferente origen o incluso del mismo origen que impartan mejores propiedades mecánicas.

La porosidad es otra característica importante de los hidrogeles que contribuye en sus propiedades mecánicas a través del contenido de volumen libre, tamaño, interconectividad y propiedades superficiales de los poros. Aunque una mayor porosidad y tamaño de poro puede facilitar el suministro de nutrientes y oxígeno a las células encapsuladas dentro de un hidrogel, las propiedades mecánicas de los andamios de hidrogel se ven afectadas negativamente debido a la gran cantidad de volumen vacío. En consecuencia, existe una compensación entre la macroporosidad (10-400 μm) y la resistencia mecánica del andamio.

Otra propiedad notable de los hidrogeles es su propiedad de degradación que influye en la densidad de reticulación y la biomecánica de los hidrogeles y el comportamiento de las células. La degradación de los hidrogeles también puede provocar su debilitamiento, lo que implica que la velocidad de degradación del hidrogel debe ser igual a la velocidad de formación celular de la nueva matriz. Esta característica está controlada por la química de la red y la composición del material y la cinética de degradación, y varía según las aplicaciones del hidrogel (Vedadghavami *et al.*, 2017).

1.5 PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LOS HIDROGELES

La reología (del griego *reos*, fluir y *logos*, estudio) es la ciencia del flujo y la deformación de la materia, describe la interrelación entre fuerza, deformación y tiempo y definen las características de la materia como viscosidad, consistencia y propiedades elásticas. Las propiedades reológicas de los hidrogeles dependen principalmente de su grado de entrecruzamiento y la cantidad de agua absorbida. Así mismo, se conoce que la combinación de dos o más polímeros genera una mayor resistencia mecánica debido a la formación de puentes de hidrogeno (De Gáscue *et al.* 2017). Las redes tiene la capacidad de deformarse temporalmente cuando se aplica una fuerza, dicha deformación desaparece cuando el esfuerzo es retirado y el hidrogel recupera parcialmente su estructura inicial, mientras que otra parte del esfuerzo se disipa en forma de calor, este comportamiento se denomina viscoelástico y es característico de los polímeros (Reyes *et al.* 2012).

La caracterización reológica de los hidrogeles permite determinar su estabilidad mecánica y propiedades viscoelásticas del sistema entrecruzado. Las propiedades

reológicas de los hidrogeles dependen de la flexibilidad o rigidez de las fibras de la red. Las redes compuestas de biopolímeros solubles en agua, como polisacáridos, proteínas y una larga variedad de polímeros sintéticos, tienen un alto rango de propiedades reológicas cuando se forman en medios acuosos, además los hidrogeles formados por polímeros flexibles por sus enlaces covalentes pueden ser desde sólidos viscoelásticos con un alto rango de propiedades reológicas ser linealmente elásticos, con magnitudes de corte y módulo de Young, modificables (Van Oosten *et al.* 2016).

1.6 BIOCOMPATIBILIDAD

Uno de los principales requisitos de los biomateriales es que sean compatibles con el sistema objetivo (ejemplo: el cuerpo humano). Para evaluar la biocompatibilidad existen diversas técnicas y pruebas que abarcan desde los estudios *in vitro* hasta los estudios en modelos animales y pruebas en etapas clínicas en seres humanos. El análisis de la biocompatibilidad de nuevos biomateriales comienza por ensayos en modelos celulares, los cuales consisten en estudiar las interacciones biomaterial-células. En este sentido, las células son inherentemente sensibles a su entorno y responden a señales físicas y químicas. Los factores extrínsecos conforman un microambiente especializado, que es esencial para el correcto desarrollo y función celular (Li *et al.*, 2009).

El general, un microambiente *in vivo* facilita la intercomunicación entre células con el fin de promover una cascada de reacciones bioquímicas complejas, que

conducen a la formación de una matriz extracelular estructural organizada. Sin embargo, la matriz extracelular sintética (material de andamio) debe poseer excelentes características mecánicas junto con un buen perfil de citocompatibilidad. Los biomateriales de origen sintético o natural diseñados para el desarrollo y crecimiento de células y tejidos, deben mimetizar las características de la matriz extracelular biológica, para que las células puedan formar tejidos tan complejos como los huesos, el hígado o el corazón, los riñones y la piel, entre otros. La capacidad de diseñar materiales a nivel similar de complejidad se está convirtiendo en una realidad (Kulkarni *et al.*, 2020), sin embargo, todavía es un reto.

La matriz extracelular tiene una gran variedad de características dependiendo de los tipos de tejidos y diferentes etapas de desarrollo en el mismo tejido. Esta complejidad surge a través de combinaciones de interacciones moleculares, específicas entre numerosas isoformas, a la disposición y proporción del colágeno, elastina, proteoglicanos y proteínas de adhesión, tales como la fibronectina y laminina, así como las propiedades biomecánicas (Tibbitt *et al.*, 2009).

La porosidad y el tamaño de poro de los biomateriales tiene implicaciones directas en las interacciones del material-célula y por consecuencia en la funcionalidad del andamio, las redes porosas interconectadas son esenciales para la nutrición, proliferación y migración celular para la vascularización y la formación de nuevo tejido, una superficie porosa también sirve para la unión del andamio con el tejido circundante para facilitar la estabilidad mecánica del implante. Los materiales con alta porosidad permiten la liberación efectiva de biofactores tales como proteínas,

genes o células y proporcionar el sustrato para el intercambio de nutrientes. Sin embargo, una mayor porosidad afecta las propiedades mecánicas para mantener la estabilidad estructural del biomaterial (Das, 2019).

Los andamios para la ingeniería de tejidos, deben estar interconectados para permitir el crecimiento celular, si el poro es demasiado pequeño la migración celular es limitada lo que resulta en una formación de una capsula alrededor del andamio lo que impide el adecuado flujo de nutrientes y la eliminación de los residuos en las regiones necróticas (Murphy *et al.*, 2010). A la inversa, si los poros son demasiado grandes se produce una disminución en el área superficial de adhesión celular. Por lo tanto, el mantenimiento de un equilibrio entre el tamaño óptimo de poros para la célula de migración y la superficie específica para la fijación celular es esencial (Perez *et al.* 2016).

Sin embargo, ciertos biomateriales con un excelente perfil de citocompatibilidad no cumplen con estos requisitos previos mecánicos para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

1.7 INGENIERÍA DE TEJIDOS EN PIEL Y ANDAMIAJES

El daño o pérdida de la integridad de la piel causada por una herida cutánea puede afectar las funciones de la piel en varios grados que van desde la incapacidad, hasta la muerte. Las heridas en piel pueden surgir por varias causas incluyendo, trauma mecánico, procedimientos quirúrgicos, reducción en la circulación de la sangre, quemaduras, envejecimiento, etc. (Watt *et al.*, 2018). La curación exitosa de las

heridas es un fenómeno complejo que implica interacciones entre células epidérmicas y dérmicas, la matriz extracelular (MEC), y la angiogénesis; todos los cuales están regulados por una variedad de moléculas de señalización y factores de crecimiento (Saghazadeh *et al.*, 2020).

Los biomateriales han desempeñado un papel cada vez más destacado en el desarrollo de la ingeniería de tejidos, que busca desbloquear el potencial regenerativo innato de los tejidos/órganos humanos en estado de deterioro y restaurar o restablecer la función corporal normal. Los avances en nuestra comprensión de los biomateriales y sus funciones en la formación de nuevos tejidos pueden potencialmente abrir una nueva frontera en el campo de rápido crecimiento de la medicina regenerativa.

Los biomateriales inspirados en el papel y la construcción multicomponente de las matrices extracelulares nativas (MEC) para el arreglo celular es clave para su éxito, así mismo los biomateriales sintéticos producidos en la actualidad incorporan de forma rutinaria componentes biológicamente activos para definir un entorno artificial *in vivo* con interacciones complejas y dinámicas para fomentar y regular a las células, similar a eventos que ocurren en un microambiente celular natural (Chen y Liu, 2016).

Los biomateriales y su uso como andamiajes, se consideran componentes clave en la ingeniería de tejidos, porque funcionan como plantilla de soporte físico para guiar la diferenciación y proliferación de células en los tejidos u órganos (Kim *et al.*, 2019). Los andamiajes deben cumplir con diferentes criterios dependiendo de su aplicación, incluyendo propiedades mecánicas definidas, biocompatibilidad y biodegradabilidad a un ritmo acorde con formación de nuevo tejido (Puppi *et al.*,

2020). Entre otras características, el andamio debe ser reproducible, en estructuras tridimensionales, debe de absorber fluido corporal para permitir la transferencia de nutrientes celulares y metabolitos a través del biomaterial, para evitar la acumulación de exudado o deshidratación excesiva (Saghazadeh *et al.*, 2018). Los biomateriales utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos cutáneos deben de tener propiedades de biocompatibilidad, hemostáticas, antimicrobianas y de biodegradabilidad (Madni *et al.*, 2021).

VII. ESTUDIOS PREVIOS

Autor, año y título	Aportación
Lv, <i>et al.</i> (2020). Gelatin/PAM double network hydrogels with super-compressibility.	Se prepararon los hidrogeles de gelatina/ PAM de doble red con supercompresibilidad mediante polimerización inducida por calentamiento, y enfriamiento, en los que se utilizó gelatina con estructura de triple hélice como parte rígida y PAM como parte flexible. Se estudio la relación de hinchamiento, las propiedades mecánicas y las propiedades de memoria de forma. Los estudios han demostrado que los hidrogeles de gelatina/PAM no solo tienen una excelente resistencia a la compresión, también un gran rendimiento de memoria de forma que puede restaurar su forma. Se observó un aumento de la tensión durante la compresión de hidrogeles de gelatina/PAM.
Chen <i>et al.</i> (2019). Thermal-and salt-activated shape memory hydrogels based on a gelatin/polyacrylamide double network. <i>RSC advances</i> , 9(32), 18619-18626.	Se sintetizó un hidrogel de gelatina/PAM de doble red mediante la polimerización de acrilamida en presencia de gelatina. Demostraron los efectos de memoria térmicos y activados por sales en tales hidrogeles basados en biopolímeros. La red PAM sirve como una red permanente. La gelatina no solo dota a la gelatina / hidrogel PAM DN de sensibilidad a la temperatura, sino que también aporta al hidrogel sensibilidad a la sal. Por lo tanto, se cree que podría brindar nuevas oportunidades con respecto a la aplicación práctica.
Zhang <i>et al.</i> (2018). <i>Nanoinitiator for enzymatic anaerobic polymerization and graft enhancement of gelatin-PAAM hydrogel.</i>	Se demostró que los hidrogeles de gelatina/PAM, mostraron resistencia mecánica, alta capacidad de estiramiento, es un hidrogel biocompatible debido a su baja citotoxicidad.
Han <i>et al.</i> (2017). Biohybrid methacrylated gelatin/ polyacrylamide hydrogels for cartilage repair.	Se realizó el estudio del comportamiento mecánico de un hidrogel biohíbrido de gelatina metacrilada y poli(acrilamida por copolimerización, el cuál presento mayor resistencia a la compresión, mejor elasticidad y una tasa de degradación favorable, realizaron una liberación sostenida de factores de crecimiento TFG- β 2, durante 20 días, los experimentos <i>in vitro</i> , demostraron que la gelatina provee una bioactividad al hidrogel para mantener el fenotipo de los condrocitos y aumentar la adhesión y proliferación celular. El estudio <i>in vivo</i> demostró poder reparar el defecto del cartílago después de tres meses.
Yan <i>et al.</i> (2017). High Strength and Self-Healable Gelatin/ Polyacrylamide Double Network Hydrogels	Hidrogeles de gelatina físicamente reticulada y poli(acrilamida reticulada covalentemente, forman una red semi-IPN, concentraciones adecuadas presentan mejores propiedades mecánicas, modulo elástico (<i>E</i>) 84

	kPa, esfuerzo (σ_f) 0.268 MPa, deformación (ϵ_f) 40.69 mm/mm y la autorrecuperación de tensión de 87%.
Noshadi <i>et al.</i> (2017). <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> analysis of visible light crosslinkable gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels.	Se reporta un hidrogel inyectable de gelatina reticulada, sus propiedades mecánicas como el módulo de compresión puede ser modificable de 5 a 56 kPa, además presentan un tamaño de poro medio de 26 a 106 μm y un porcentaje de hinchamiento de 7 a 13 % variando la proporción del hidrogel. Los estudios <i>in vitro</i> mostraron el crecimiento y desarrollo de cardiomiocitos.
Yuan <i>et al.</i> (2017). Injectable Photo Crosslinked Enhanced Double-network Hydrogels from Modified Sodium Alginate and Gelatin	Hidrogeles de alginato de sodio y gelatina variando la densidad de reticulación, los hidrogeles presentan propiedades de velocidad de degradación, relación de hinchamiento controlables y buenas propiedades mecánicas, la actividad citotóxica <i>in vitro</i> mostro que los hidrogeles proporcionan el ambiente adecuado para la proliferación celular, en la superficie como el interior del hidrogel.
Li <i>et al.</i> (2016). Novel hemocompatible nanocomposite hydrogels crosslinked with methacrylated gelatin	Hidrogeles nanocompuestos a base de poliacrilamida con gelatina metacrilada, los resultados del FTIR confirman la modificación de la gelatina y monómeros de poliacrilamida. El grado de entrecruzamiento modifica el tamaño de poro, el equilibrio de hinchamiento y mejora las propiedades mecánicas, los estudios <i>In vitro</i> mostraron que los hidrogeles son hemocompatibles.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de tejidos y órganos es una de las amenazas más graves para la salud humana. Cada año, millones de personas sufren y/o mueren a causa de la pérdida de tejidos y órganos causados por enfermedades crónicas degenerativas, envejecimiento o trauma. (Li *et al.* 2015). Las terapias con células, para el tratamiento de heridas crónicas han mostrado ser una gran promesa. Sin embargo, necesitan de un sistema para la proliferación celular con el propósito de obtener las cantidades necesarias, antes de que este tipo de terapias se puedan usar de forma clínica.

Los hidrogeles son redes tridimensionales conformadas de cadenas flexibles de polímeros, de origen sintético, o natural (Han *et al.*, 2013) que son similares a una gran variedad tejidos naturales vivos (Zhou *et al.* 2020). Por lo tanto, han encontrado gran aplicabilidad como andamiajes en la ingeniería de tejidos, (Rent *et al.* 2020) y como herramientas para el transporte y protección de células.

La combinación de biomateriales de origen natural y sintético, como la gelatina y la poliacrilamida, es una estrategia que ayuda a obtener materiales con mejores propiedades que pueden modificarse o modularse para imitar las características de la matriz extracelular nativa.

En este trabajo se enfoca en la síntesis y caracterización las propiedades reológicas y biológicas (proliferación y compatibilidad con eritrocitos) de un hidrogel de origen polimérico a base de poliacrilamida como matriz extracelular sintética.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Un hidrogel de origen polimérico a base de poliacrilamida será biocompatible *in vitro* y tendrá las propiedades reológicas necesarias para su uso como matriz extracelular sintética?

3. JUSTIFICACIÓN

La regeneración de tejido para el tratamiento de heridas crónicas continúa siendo un problema de salud y un reto debido a los altos costos de los tratamientos con biomateriales. A pesar de la investigación existente en el tema, se necesitan biomateriales con características que se vean reflejadas en una mejor funcionalidad. El estudio del biomaterial propuesto pretende aportar conocimiento que permita el desarrollo de terapias de menor costo y mayor efectividad. Este tipo de investigación aportará información y conocimiento importante para el desarrollo de biomateriales combinados que se puedan aplicar a terapias de regeneración de tejidos para beneficiar a diferentes estratos sociales de la población.

4. HIPÓTESIS

HIPOTESIS ALTERNA

El hidrogel de origen polimérico a base de poliacrilamida es biocompatible *in vitro* y tiene propiedades reológicas necesarias para su uso como matriz extracelular sintética.

HIPOTESIS NULA

El hidrogel de origen polimérico a base de poliacrilamida no es biocompatible *in vitro* y tiene propiedades reológicas necesarias para su uso como matriz extracelular sintética.

5. OBJETIVOS

GENERAL

- Sintetizar y caracterizar un hidrogel con las propiedades un hidrogel de origen polimérico a base de poliacrilamida como matriz extracelular sintética.

ESPECÍFICOS

- Sintetizar un hidrogel de poliacrilamida y gelatina por medio de una polimerización de radicales libres.
- Caracterizar el hidrogel por ATR FT-IR y RAMAN.
- Determinar la capacidad de hinchamiento del hidrogel a diferentes temperaturas (4, 36 y 60 °C).
- Realizar caracterización de superficie del hidrogel a través de SEM.
- Evaluar la biocompatibilidad *in vitro* del hidrogel en fibroblastos de ratón swiss 3T3, fibroblastos humanos BJ y eritrocitos humanos.
- Estudiar las propiedades mecánicas y reológicas del hidrogel de PAM/Gel.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Experimental puro, longitudinal.

6.2 MATERIALES

Acrilamida (AA, Merck), NN metileno bis (acrilamida) bis-acrilamida (MBA; Sigma Aldrich), persulfato de amonio (APS) grado de reactivo 98% (Sigma Aldrich), N, N, N0, N0 - Tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma Aldrich), gelatina (de piel bovina tipo B, Sigma Aldrich, EE. UU.), Glucosa media alta de águila modificada de Dulbecco (Sigma Aldrich, EE. UU.), suero bovino fetal (10% v / v; ATCC), penicilina-estreptomicina solución 100, (Sigma -Aldrich, EE. UU.), Bromuro de tiazol-2-il-2,5-dimetil tetrazolio (MTT), bromuro de potasio (KBr) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), Solución salina tampón fosfato (PBS, Sigma Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich, EE. UU.), solución de Triton 100% (Sigma Aldrich), tubos de heparina Vacutainer (Becton Dickinson y compañía).

6.3 PROCEDIMIENTOS

Este estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación de Ciencias Médicas (CICMED), la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) y el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

6.3.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES

A. HIDROGEL DE GELATINA

Se disolvió gelatina en solución salina tamponada de fosfato (PBS) al 3 % en peso y se homogeneizó a 45° C durante 30 minutos con agitación constante. Luego, los hidrogeles se enjuagaron con agua destilada. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4° C para su posterior análisis.

B. HIDROGEL DE POLIACRILAMIDA

Se empleó una polimerización por radicales libres para sintetizar hidrogeles de PAM. Para este propósito, se disolvió acrilamida (2 % en peso) en PBS y se mezcló con MBA. Entonces, se añadieron APS al 1% en peso y TEMED al 0,01% en peso a la mezcla y se agitó. Se dejó polimerizar la solución al vacío a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Finalmente, los hidrogeles se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier producto químico que no hubiera reaccionado.

C. SÍNTESIS DE LA RED POLIMÉRICA SEMI-INTERPENETRADA (SEMI-IPN) DE POLIACRILAMIDA/GELATINA (PAM/G)

Primero, se disolvió gelatina (0,1, 0,3 y 0,5% en peso) en PBS a 45 ° C durante 30 minutos. A continuación, se añadió una solución de acrilamida (2% en peso). La solución combinada se agitó a temperatura ambiente ($22 \pm 1 \text{ C}$). Finalmente, MBA (0.03 wt. %), APS (10% en peso) y TEMED (0,1% en peso) se añadieron y homogeneizaron.

6.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS HIDROGELES

A. ESPECTROSCOPIA ATR FT-IR

La caracterización química de los hidrogeles secos se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con ATR.

Para ello, las muestras se liofilizaron y luego se adquirieron los espectros de 4.000 a 650 cm^{-1} utilizando un espectrómetro Nicolet 8700 FTIR Thermo SCIENTIFIC (USA).

B. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros Raman se obtuvieron mediante un microscopio RENISHAW inVia Raman con un microscopio Leica DM 2700 M.

Primero, las muestras se liofilizaron y luego se adquirieron espectros Raman de 3200 a 100 cm^{-1} . Se utilizó un láser (633 nm) como radiación de excitación con una potencia del 10 al 50%, con un aumento de 50.

C. PRUEBAS REOLÓGICAS

Para caracterizar las propiedades reológicas las muestras se utilizará un reómetro rotacional (HAAKE MARS III) a una temperatura constante de 20°C utilizando un cono de 35 a 800 rpm donde se determinarán las propiedades viscoelásticas del hidrogel. Las muestras se utilizarán en húmedo directamente del vial al plato de acero para su análisis de muestras.

D. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM-6360LV SEM) con el propósito de estudiar la morfología de las muestras de hidrogel. Los hidrogeles se cortaron transversalmente y se liofilizaron a 50°C (LABCONCO, FreeZone 4.5, modo de bajo vacío). Después de la liofilización, las muestras se colocaron en un revestimiento de pulverización catódica (DENTON VACUUM, DESK II) y se cubrieron con una fina película de oro (160 nm). Finalmente, se colocaron en el soporte de microscopía y se obtuvieron imágenes en modo de alto vacío.

E. CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

Para estudiar el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles, las muestras secas se sumergieron en PBS (pH 7,4). A continuación, se controló gravimétricamente el hinchamiento midiendo la ganancia de peso debida a la absorción del disolvente. Brevemente, las muestras se retiraron del tampón en diferentes momentos y se secaron con papel de filtro para eliminar el agua de la superficie. El peso se registró hasta que no hubo más cambios significativos. Las muestras se estudiaron a 4, 37 y 60 ± 2° C por triplicado. El comportamiento de hinchamiento se calculó utilizando la siguiente ecuación:

Se determinó la cantidad de agua absorbida por los hidrogeles expresada en porcentaje, usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hinchamiento} = \left(\frac{w - w_0}{w_0} \right)$$

Donde:

W es el peso del hidrogel a diferentes tiempos

W₀ es el peso inicial del Xerogel.

6.3.3 CITOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO*

A. CULTIVO CELULAR DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos de ratón *Swiss Albino* 3T3 (donados por la División de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México) y fibroblastos humanos normales BJ (ATCC-CRL-2522) (donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, ININ, Ocoyoacac, México), se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa, suplementado con suero bovino fetal (10% v / v) y solución de penicilina-estreptomicina. Las células se incubaron a 37 ° C con una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 85%.

B. ENSAYO DE VIABILIDAD

Se evaluó la viabilidad celular del fibroblasto albino *Swiss* 3T3 y los fibroblastos BJ de humano, los fibroblastos se pusieron en contacto directo, como indirecto con extractos de acuerdo con ISO 10993-12. Para la prueba de contacto directo, una muestra de cada grupo de tratamiento (15±1 mg) se puso en contacto con fibroblastos murinos y humanos (8x10³ células/pocillo, placa 96 pocillos).

Para la prueba de contacto indirecto, los hidrogeles (6 cm², 3X2 cm) se cubrieron con 2 ml de solución salina tampón fosfato y se agitaron durante 24 horas a 37 C. A continuación, se recogieron los extractos (100 ml) y se añadieron a placas de

pocillos previamente cultivadas con fibroblasto albino Swiss 3T3 y fibroblastos BJ (8X10³ células/pocillo, placa de 96 pocillos).

En la prueba de contacto directo e indirecto, las células se analizaron en diferentes tiempos de exposición (1, 2 y 3 días) a 37 °C, con atmósfera de CO₂ al 5% y humedad del 85%. Las células viables se analizaron cuantitativamente mediante la prueba MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio). Este ensayo se basa en la observación de que las células viables tienen la capacidad de metabolizar un tinte de tetrazolio soluble en agua (MTT), en una sal de formazán insoluble. Antes del ensayo, las muestras de hidrogel se esterilizaron mediante exposición a radiación de luz ultravioleta (30 minutos). Para ello, se retiró el medio de cultivo celular de las placas de pocillos y se añadió solución MTT en PBS (50 ml/pocillo, 5 mg / ml de solución MTT), la placa se incubó durante 60 min. Pasado ese tiempo, se eliminó la solución de MTT y los cristales formados se disolvieron con 50 ml de DMSO. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC Thermo Fisher Scientific).

C. ENSAYO DE HEMÓLISIS

El ensayo hemolítico se realizó de acuerdo con ISO 10993-4. Brevemente, las muestras de hidrogel se pusieron en contacto con 500 ml de una solución de eritrocitos (5%), de voluntarios adultos sanos. Las muestras de hidrogel que estaban en equilibrio de hinchamiento (5,0 ± 1 mg) se incubaron a 37 ° C durante 1 h junto con un control positivo (Triton al 1%) y un control negativo (PBS). Las muestras de hidrogel se esterilizaron bajo luz ultravioleta (UV) durante 30 min, antes de la prueba

de hemólisis. Después de la incubación, la hemólisis se obtuvo midiendo la absorción de hemoglobina en el sobrenadante a 450 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de hemólisis se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hemolisis} = \frac{\text{Abs grupo experimental} - \text{abs control negativo}}{\text{abs control positivo} - \text{abs control negativo}} \times 100$$

D) ANALISIS DE RESULTADOS

El análisis de las variables se realizó mediante estudios descriptivos (media y desviación estándar) y las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se analizaron utilizando el software origin, versión 9.

D) ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto de investigación fue sometido al Comité de Ética y al Comité del Investigación del Centro de Investigación de Ciencias Médicas.

7. RESULTADOS

7.1 ARTICULO ACEPTADO

7.1.1 TÍTULO DEL ARTÍCULO

“Design of a polyacrylamide and gelatin hydrogel as a synthetic extracellular matrix”

7.1.2 PÁGINA FRONTAL DEL MANUSCRITO



Design of a polyacrylamide and gelatin hydrogel as a synthetic extracellular matrix

Rocío Torres-García^a, Jaime Flores-Estrada^b , Juan V. Caulich-Rodríguez^c , Mario Flores-Reyes^a, and Miriam V. Flores-Marino^b

^aFacultad de Enfermería y Obstetricia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca de Lerdo, Mexico; ^bFacultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca de Lerdo, Mexico; ^cUnidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Colonia Chuburná de Hidalgo, CP 97205, Mérida, Yucatán, Mexico

ABSTRACT

Hydrogels are three-dimensional networks with high water content become soft and elastic mimicking some characteristics of the extracellular matrix. They can be prepared by using either synthetic or natural polymers, therefore, their combination can benefit the overall of the material for a specific biomedical application. In this study, a semi-interpenetrating polymer network hydrogel of polyacrylamide/gelatin (PAM/Gel) with up to 0.3% of gelatin content was synthesized while evidence of gelatin incorporation was obtained from FTIR and Raman spectroscopy. SEM micrographs show uniform porous structure of PAM/gelatin combined hydrogels. According to the micrographs, the amount of pores decrease with the incorporation of gelatin into the PAM network. The combined hydrogel had the maximum swelling at 37 °C (1,800 ± 7.5%). Results indicate that PAM/Gel hydrogels are biocompatible (fibroblast viability > 70%) in the presence of extracts and by direct contact method. These hydrogels can be good candidates for soft tissue engineering applications.

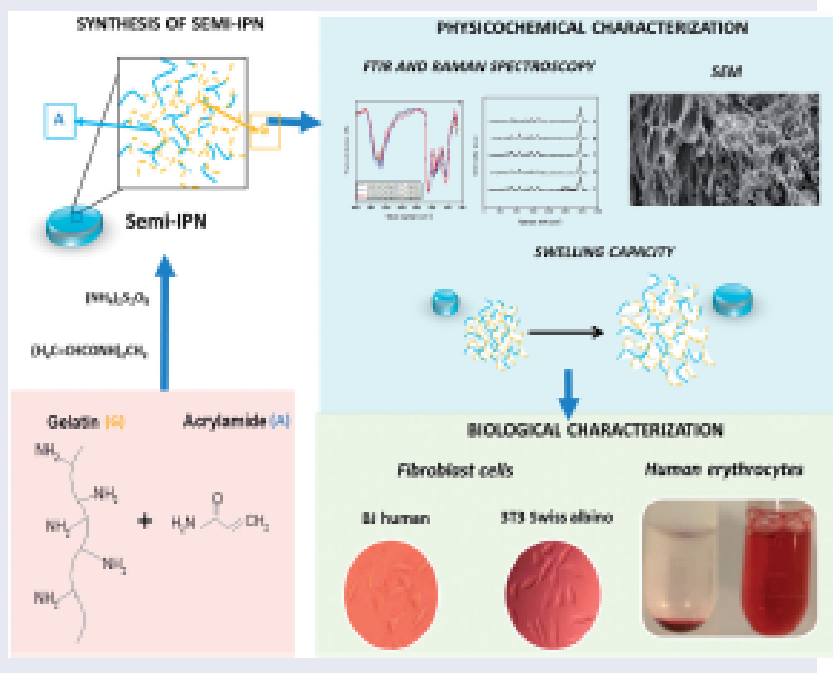
ARTICLE HISTORY

Received 24 May 2020
Accepted 15 September 2020

KEYWORDS

Biocompatibility; gelatin; hydrogel; polyacrylamide

GRAPHICAL ABSTRACT



CONTACT Miriam V. Flores-Marino mfloresm@uaemex.mx Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón S/N, Residencial Colón, Toluca de Lerdo 50000, Mexico.

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

7.2 ARTÍCULO ENVIADO

7.2.1 TÍTULO DEL MANUSCRITO

“Evaluation of a semi-interpenetrating polymer network of poly(ethylene glycol) and chitosan as wound dressing”

7.2.2 CARTA DE ENVÍO

IPOL-D-20-00221 - Submission Notification to co-author

 Traducir mensaje a: Español | No traducir nunca de: Inglés



Editorial Office (IPOL) <em@editorialmanager.com>

Lun 01/06/2020 11:46 PM

Para: Usted



Re: "Evaluation of a semi-interpenetrating polymer network of poly(ethylene glycol) and chitosan as wound dressing"
Full author list: Rocío Torres García, Master of Science; Mario Flores Reyes, Master of Science; Maria Victoria Domínguez García, Ph.D.; Jaime Flores Estrada, Ph.D.; Miriam Veronica Flores Merino, Ph.D

Dear Msr. Torres García,

We have received the submission entitled: "Evaluation of a semi-interpenetrating polymer network of poly(ethylene glycol) and chitosan as wound dressing" for possible publication in Iranian Polymer Journal, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Msr. Miriam Veronica Flores Merino who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

8. RESULTADOS ADICIONALES

8.1 PROPIEDADES REOLOGICAS MODULO DE ALMACENAJE Y MODULO DE PERDIDA (REÓMETRO)

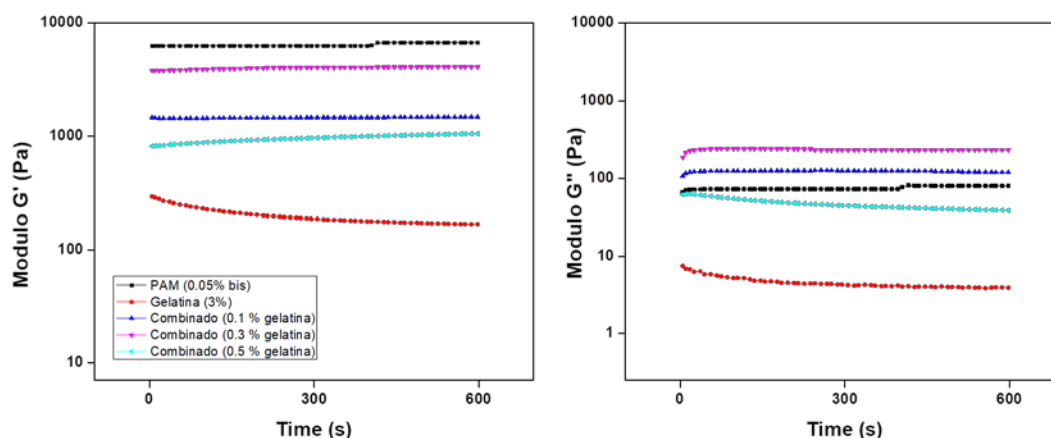


Fig. 4. Módulo de almacenaje (G') y módulo de pérdida (G'') de hidrogel de poliacrilamida, gelatina y combinado 0.1, 0.3 y 0.5 % de gelatina.

Los resultados sugieren que los hidrogeles de PAM y el hidrogel combinado de con 0.3% de gelatina presentaron mayor módulo elástico en comparación de los hidrogeles combinados 0.1 % y 0.5 % de gelatina. Los hidrogeles combinados con 0.3 % de gelatina en comparación con los combinados 0.1 y 0.5% de gelatina presentaron mayor modulo elástico. El módulo elástico se define como la relación entre el esfuerzo (σ) y la deformación (ϵ), este módulo caracteriza la resistencia al alargamiento elástico y se representa en la unidad de pascal (Pa). Lo cual significa que los resultados muestran que los hidrogeles con menor módulo elástico como los hidrogeles de gelatina y los combinados 0.1% 0.5 % y el hidrogel de gelatina presentan menor rigidez y mayor flexibilidad (Bayona, 2020).

8.2 VISCOSIDAD (REÓMETRO)

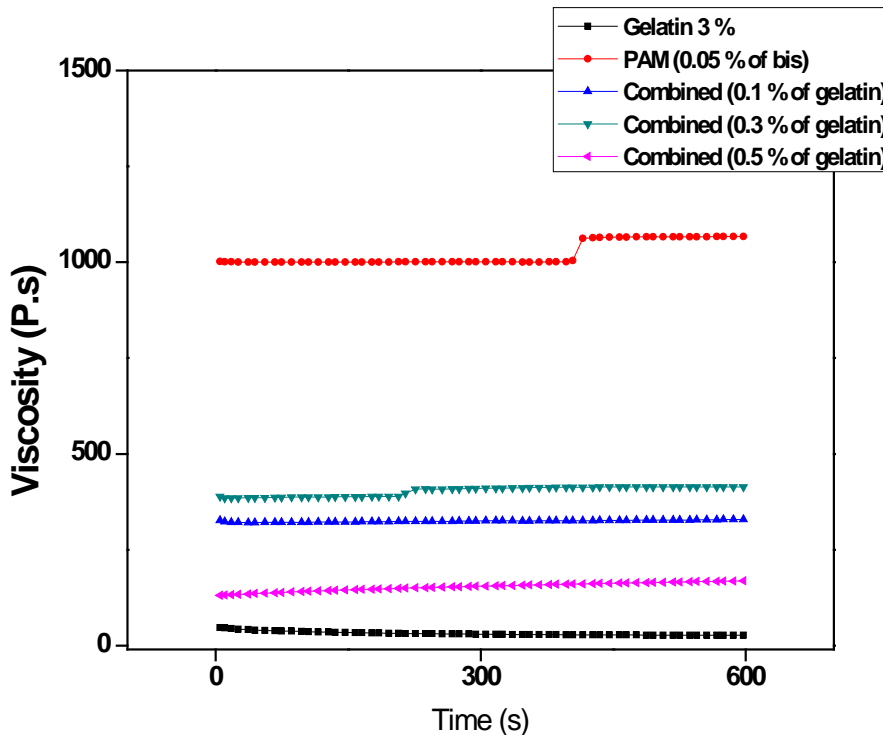


Fig. 5 Viscosidad de hidrogeles de poliacrilamida, gelatina y combinados 0.1, 0.3 y 0.5% de gelatina.

La figura 6 muestra la viscosidad de hidrogeles de gelatina, PAM y combinados con 0.1, 0.3 y 0.5 % de gelatina. Se observa que los hidrogeles de PAM muestran mayor viscosidad, en cambio los hidrogeles combinados de gelatina al 0.1, 0.3, y 0.5 % presentaron menor viscosidad, este comportamiento puede deberse a una menor reticulación de los hidrogeles y por lo tanto a la formación de un hidrogel más débil. Sin embargo, los hidrogeles de gelatina al 3 % presentaron menor viscosidad debido a que no está reticulado (Fan *et al.*, 2021). Se observa que los hidrogeles de PAM presentan una mayor viscosidad (1000 Pa) esto es debido a la reticulación del hidrogel. En los hidrogeles combinados se observa que los hidrogeles con 0.1 % de gelatina tiene una viscosidad de 330 Pa, mientras el hidrogel con 0.3 % de gelatina

tiende a aumentar ligeramente su viscosidad (400 Pa) aproximadamente, sin embargo, se observa que el hidrogel con mayor concentración de gelatina (0.5%) tiene una viscosidad menor 150 (Pa) en comparación de la concentración (0.1 y 0.3%).

9 DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se desarrollaron hidrogeles poli(acrilamida), gelatina y combinados. El proceso de síntesis de hidrogeles de poli(acrilamida), gelatina y combinados se realizó, a través de la polimerización por radicales libres, para formar una red polimérica semi-IPN, de los cuales se realizó la caracterización físico-química, utilizando espectroscopia FT-IR y RAMAN, donde se confirmó la formación de la red semi-IPN de PAM/Gel debido a la aparición de los principales grupos funcionales como el estiramiento del grupo NH_2 y $\text{C}=\text{O}$ estos resultados concuerdan con Cong *et al.* Además, se observaron bandas típicas a 3.406, 1.664, 1.611, 1.454, 1.420 y 1.125 cm^{-1} correspondientes a estiramiento $\text{N}-\text{H}$, estiramiento $\text{C}=\text{O}$, vibración por deformación $\text{N}-\text{H}$ correspondiente a la amida primaria, CH_2 en vibración plana, se observó el estiramiento de $\text{C}-\text{N}$ y NH_2 en balanceo plano, respectivamente.

Estos resultados son similares con Stancu *et al.*, Y Acharya *et al.* Los cuales reportaron los mismos picos de absorción que observaron el estiramiento de los grupos $\text{O}-\text{H}$ y $\text{N}-\text{H}$, amida I, amida II, amida III y $\text{N}-\text{H}$ en el espectro infrarrojo de la gelatina. El espectro del hidrogel de combinado PAM/Gel presenta sus bandas en las mismas regiones de los principales grupos funcionales que conforman a la PAM y gelatina estos resultados concuerdan con Ferferia *et al.* La espectroscopia RAMAN muestra las principales bandas correspondientes a ambos polímeros, es

decir para la gelatina mostro absorciones a 2938 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} , 1326 cm^{-1} , 1123 cm^{-1} y 852 cm^{-1} y las principales bandas de PAM se observaron 1657 cm^{-1} y 1428 cm^{-1} , estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por Mandal *et al.*, y Tsiptsias *et al.*, reportando las mismas bandas correspondientes a PAM y gelatina. Se realizó el estudio de SEM en todas las muestras de los hidrogeles se observo que el hidrogel de PAM muestra mayor porosidad en comparación con los hidrogeles de gelatina y combinados, por lo tanto se puede determinar que la porosidad está influenciada por la cantidad de gelatina, hidrogeles combinados con mayor concentración de gelatina mostraron menor porosidad, Jaiswal *et al.*, demostraron el mismo comportamiento observando un aumento de la porosidad con respecto a la concentración de gelatina, mientras que Li *et al.* Demostraron un comportamiento similar.

Además, se observó la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles a tres diferentes temperaturas 4 , 36 , y 60° C , el hidrogel de PAM presento mayor hinchamiento en todas las muestras a diferentes temperaturas analizadas, esto puede ser debido al carácter hidrofílico de la poliacrilamida y a una densidad baja de reticulación por una baja concentración de entrecruzante (MBA), estos resultados concuerdan con Darrien y Gilormini, donde observaron un comportamiento de hinchamiento similar en los hidrogeles de PAM. Los hidrogeles de gelatina mostraron menor capacidad de hinchamiento en comparación de la poliacrilamida, sin embargo, las propiedades químicas de los grupos hidrofílicos de la gelatina tuvieron una mayor contribución al hinchamiento, estos resultados concuerdan con lo reportado con Hoch *et al.*, informo alta capacidad de hinchamiento con menor grado de reticulación. Se observo que los hidrogeles

combinados con 0.3 % de gelatina aumento rápidamente su hinchamiento aproximadamente 1500 % dentro de los primeros treinta minutos, el alto porcentaje de hinchamiento es probablemente al carácter hidrofílico de los grupos NH_2 y al COO^- que están vinculados al polímero primario. Esos resultados son similares a lo reportado por Mansoori *et al.*, y Murugan *et al.*, donde observaron la contribución del carácter hidrofílico del hidrogel produciendo un cambio en su afinidad por el agua (Hassanzadeh *et al.*, 2016), la contribución del carácter hidrofílico podría ser determinante en la absorción de disolvente del material combinado.

Además, se realizó el ensayo de viabilidad celular a través del ensayo MTT, con dos líneas celulares de fibroblastos de ratón Swiss 3T3 y fibroblastos humanos BJ, el ensayo se realizó en contacto directo con los hidrogeles de PAM, gelatina y PAM/Gel, a 24, 48 y 72 horas, además, se realizaron la pruebas en contacto indirecto con extractos de cada una de las muestras mencionadas, se observó que los fibroblastos presentaron una viabilidad mayor a 70 % en ambos ensayos, de acuerdo a la norma ISO 10993-12 la cual menciona que los biomateriales son biocompatibles cuando las células presentan una viabilidad del 70 % o más. De acuerdo con lo demostrado por Jaiswal, donde observo una viabilidad mayor al 90 % en fibroblastos de ratón L929, después de 12 y 24 horas en contacto con el extracto de los hidrogeles. Thakur *et al.*, Denostaron que los hidrogeles de gelatina presentaron viabilidad superior al 90 % en células AH-927 y células HaCat.

Así mismo, se observó que los hidrogeles de PAM, gelatina y combinados no inducen a hemolisis a eritrocitos humanos, ya que presentan menos de 2 % de hemolisis, de acuerdo a la norma ISO 10993-4, que menciona que los biomateriales no son citotóxicos si presentan menor del 5 % de hemolisis, esto concuerda con los

resultados obtenidos por Pandey *et al.*, sugiriendo que los hidrogeles no causan hemo toxicidad, lo cual confirma la naturaleza hemo compatible de estos biomateriales. lo cual significa que los biomateriales son biocompatibles con fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos y eritrocitos humanos.

También se llevó a cabo el estudio de las propiedades reológicas de los hidrogeles de PAM, gelatina y combinados, se observó que los hidrogeles de PAM presentaron mayor módulo de almacenaje, en comparación con los hidrogeles combinados, la concentración de 0.3 y 0.1 % de gelatina se observa un módulo de almacenaje ligeramente menor que el de PAM en un rango de 1000 a 10 000 (P.s), seguido se encuentra la concentración con 0.5 % de gelatina con un rango ligeramente menor a 1000 (P.s) . El módulo de pérdida es mayor en los hidrogeles combinados con 0.3 y 0.1 de gelatina, seguido del hidrogel de PAM en un rango aproximado de 70 a 500 (P.s) Los resultados de viscosidad muestran que el hidrogel de PAM presenta una mayor viscosidad en comparación de los hidrogeles combinados, cerca de los 1000 P.s, seguido de los hidrogeles combinados que presentan una viscosidad menor a los 500 P. s. Y finalmente se observa que el hidrogel de gelatina presenta menor módulo de almacenaje, menor módulo de pérdida y menor viscosidad por que la gelatina presenta pobres propiedades reológicas. Con lo cual se demuestra los hidrogeles con menor módulo elástico como los hidrogeles de gelatina y los combinados 0.1% 0.5 % y el hidrogel de gelatina presentan menor rigidez y mayor flexibilidad (Bayona, 2020).

Se observa que los hidrogeles de PAM muestran mayor viscosidad, en cambio los hidrogeles combinados de gelatina al 0.1, 0.3, y 0.5 % presentaron menor viscosidad, este comportamiento puede deberse a una menor reticulación de los

hidrogeles y por lo tanto a la formación de un hidrogel más débil. Sin embargo, los hidrogeles de gelatina al 3 % presentaron menor viscosidad debido a que no está reticulado (Fan *et al.*, 2021). Los resultados de las pruebas reológicas no son concluyentes debido a que hace falta realizar más pruebas para poder determinar de una forma adecuada las propiedades reológicas de estos biomateriales.

10. CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrolló con éxito un hidrogel de gelatina y PAM. El análisis de ATR-FTIR y RAMAN reveló la formación de la red y muestra los correspondientes grupos funcionales de PAM y gelatina. Por medio del microscopio electrónico de barrido se observó la estructura porosa de los hidrogeles, sin embargo, se observó que la cantidad de poros disminuye con la incorporación de gelatina a la red PAM. Además se realizaron las pruebas de capacidad de hinchamiento de los hidrogeles, se observó que los hidrogeles de PAM presentaron mayor capacidad de hinchamiento en comparación con los hidrogeles de gelatina y combinados, sin embargo, entre los hidrogeles combinados de PAM/Gel, la formulación con 0.3 % de gelatina mostró una mejor capacidad de hinchamiento. La prueba de citocompatibilidad mostró que tanto los fibroblastos murinos como los humanos permanecen con una viabilidad superior al 70 % en contacto con hidrogeles y los extractos, por lo que los materiales se consideran compatibles bajo las condiciones analizadas. Además, estos hidrogeles son compatibles con los eritrocitos humanos, ya que el análisis cuantitativo demostró una hemólisis menos al 2 % . Se observó que el hidrogel combinado con 0.3 % de gelatina fue el hidrogel que presentó mejores propiedades reológicas, esto puede ser debido a una mayor densidad de reticulación formando

un hidrogel más estable. En conclusión, esta red podría ser una buena opción como matriz extracelular biosintética para estudios *in vitro* del comportamiento celular.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Li, Q., Ma, L., & Gao, C. (2015). Biomaterials for in situ tissue regeneration: development and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(46), 8921-8938.
- Gowers, S. A., Hamaoui, K., Vallant, N., Hanna, G. B., Darzi, A., Casanova, D., ... & Boutelle, M. G. (2018). An improved rapid sampling microdialysis system for human and porcine organ monitoring in a hospital setting. *Analytical Methods*, 10(44), 5273-5281.
- Zhao, H., Liu, M., Zhang, Y., Yin, J., & Pei, R. (2020). Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. *Nanoscale*, 12(28), 14976-14995.
- Zhang, W., Wang, R., Sun, Z., Zhu, X., Zhao, Q., Zhang, T., ... & Forooshani, P. K. (2020). Catechol-functionalized hydrogels: biomimetic design, adhesion mechanism, and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 49(2), 433-464.
- He, W., Reaume, M., Hennenfent, M., Lee, B. P., & Rajachar, R. M. (2020). Biomimetic hydrogels with spatial-and temporal-controlled chemical cues for tissue engineering. *Biomaterials Science*.
- Arias, D. G., & Mendez, L. C. (2015). Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Rev. Médica Risaralda*, 21(1), 38-47.
- Chaves-Rodríguez, M. I., Calvo-Castro, L. A., Alvarado-Meza, R., Madrigal-Monge, O., Ulloa-Fernández, A., & Centeno-Cerdas, C. (2015). Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos. *Revista Tecnología en Marcha*, 28, 46-57.

- Dantzer, E. (2015). Indicaciones de los sustitutos cutáneos y de los aloinjertos. *EMC-Cirugía Plástica Reparadora y Estética*, 23(1), 1-14.
- Donderwinkel, I., Van Hest, J. C., & Cameron, N. R. (2017). Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *Polymer Chemistry*, 8(31), 4451-4471.
- Goonoo, N., & Bhaw-Luximon, A. (2019). Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair. *RSC advances*, 9(32), 18124-18146.
- Vijayaraghavan R, Thompson B, MacFarlane D, Kumar R, Surianarayanan M, Aishwarya S, et al. Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. *Chem Commun*. 2009;46(2):294-6.
- Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J., & Weder, C. (2016). Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials science*, 4(5), 734-767.
- Hoshiba, T., & Yamaoka, T. (2019). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Biological Research.
- Pawelec, K. M., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Collagen: a network for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(40), 6484-6496.
- Moore, S. O. N., Grubb, T. J., & Kothapalli, C. R. (2020). Insights into the biophysical forces between proteins involved in elastic fiber assembly. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Hay, E. D. (Ed.). (2013). *Cell biology of extracellular matrix*. Springer Science & Business Media.
- Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. *Progress in polymer science*, 36(9), 1254-1276.
- Mateos-Timoneda MA, Levato R, Punet X, Cano I, Castano O, Engel E, editors. Biofunctionalization of polymeric surfaces. Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2015 37th Annual International Conference of the IEEE; 2015: IEEE.

- Rahmati, M., Silva, E. A., Reseland, J. E., Heyward, C. A., & Haugen, H. J. (2020). Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chemical Society Reviews*, 49(15), 5178-5224.
- Agarwal, K. M., Singh, P., Mohan, U., Mandal, S., & Bhatia, D. (2020). Comprehensive study related to advancement in Biomaterials for Medical Applications. *Sensors International*, 100055.
- Jacobs, A., Pr, G. R., Forestier, C., Nedelec, J. M., & Descamps, S. (2020). Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects. *Acta Biomaterialia*.
- Ishihara, K., Oda, H., & Konno, T. (2020). Spontaneously and reversibly forming phospholipid polymer hydrogels as a matrix for cell engineering. *Biomaterials*, 230, 119628.
- Chen, Q., & Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 87, 1-57.
- Thirvikraman, G., Madras, G., & Basu, B. (2014). In vitro/in vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Advances*, 4(25), 12763-12781.
- Mann, J. L., Anthony, C. Y., Agmon, G., & Appel, E. A. (2018). Supramolecular polymeric biomaterials. *Biomaterials science*, 6(1), 10-37.
- Samadian, H., Maleki, H., Allahyari, Z., & Jaymand, M. (2020). Natural polymers-based light-induced hydrogels: promising biomaterials for biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 420, 213432.
- Silverstein, M. S. (2020). Interpenetrating polymer networks: So happy together? *Polymer*, 207, 122929.
- Egbo, M. K. (2020). A fundamental review on composite materials and some of their applications in biomedical engineering.
- Mitragotri, S., & Lahann, J. (2009). Physical approaches to biomaterial design. *Nature materials*, 8(1), 15.

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6579, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6579> (accessed Apr. 12, 2016).
- Bucur, M. P., Bucur, B., & Radu, G. L. (2018). Simple, selective and fast detection of acrylamide based on glutathione S-transferase. *RSC advances*, 8(42), 23931-23936.
- Iswariya, S., Bhanukeerthi, A. V., Velswamy, P., Uma, T. S., & Perumal, P. T. (2016). Design and development of a piscine collagen blended pullulan hydrogel for skin tissue engineering. *RSC advances*, 6(63), 57863-57871.
- Zhang, Y., Chen, H., Li, Y., Fang, A., Wu, T., Shen, C., ... & Zhang, G. (2020). A transparent sericin-polyacrylamide interpenetrating network hydrogel as visualized dressing material. *Polymer Testing*, 106517.
- Smithmyer, M. E., Sawicki, L. A., & Kloxin, A. M. (2014). Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease. *Biomaterials science*, 2(5), 634-650.
- Geng, J., Guo, H., Zhang, J., & Gu, H. (2020). pH/oxidation dual-responsive gelatin/PVA composite hydrogels cross-linked by a novel ferrocene-containing dialdehyde. *Materials Letters*, 129016.
- Pal, K., Banthia, A. K., & Majumdar, D. K. (2007). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *Aaps Pharmscitech*, 8(1), E142-E146.
- Michelini, L., Probo, L., Farè, S., & Negrini, N. C. (2020). Characterization of gelatin hydrogels derived from different animal sources. *Materials Letters*, 127865.
- Liu, B., Huang, W., Yang, G., An, Y., Yin, Y., Wang, N., & Jiang, B. (2020). Preparation of gelatin/poly (γ -glutamic acid) hydrogels with stimulated response by hot-pressing preassembly and radiation crosslinking. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111259.
- Zhang, Y., Ouyang, H., Lim, C. T., Ramakrishna, S., & Huang, Z. M. (2005). Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 72(1), 156-165.

- Favatela, F., Horst, M. F., Bracone, M., Gonzalez, J., Alvarez, V., & Lassalle, V. (2020). Gelatin/Cellulose nanowhiskers hydrogels intended for the administration of drugs in dental treatments: Study of lidocaine as model case. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101886
- Gou, L., Xiang, M., & Ni, X. (2020). Development of wound therapy in nursing care of infants by using injectable gelatin-cellulose composite hydrogel incorporated with silver nanoparticles. *Materials Letters*, 277, 128340.
- Chang, K. C., Chen, W. C., Chen, C. H., Ko, C. L., Liu, S. M., & Chen, J. C. (2021). Chemical cross-linking on gelatin-hyaluronan loaded with hinokitiol for the preparation of guided tissue regeneration hydrogel membranes with antibacterial and biocompatible properties. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111576.
- Jing, H., Shi, J., Guo, P., Guan, S., Fu, H., & Cui, W. (2020). Hydrogels Based on Physically Cross-linked Network with High Mechanical Property and Recasting Ability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125805.
- Vedadghavami, A., Minooei, F., Mohammadi, M. H., Khetani, S., Kolahchi, A. R., Mashayekhan, S., & Sanati-Nezhad, A. (2017). Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*, 62, 42-63.
- Chen, C., Duan, N., Chen, S., Guo, Z., Hu, J., Guo, J., ... & Yang, L. (2020). Synthesis mechanical properties and self-healing behavior of aliphatic polycarbonate hydrogels based on cooperation hydrogen bonds. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 114134.
- Vedadghavami, A., Minooei, F., Mohammadi, M. H., Khetani, S., Kolahchi, A. R., Mashayekhan, S., & Sanati-Nezhad, A. (2017). Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*, 62, 42-63.

- De Gáscue Zhou, C., Wu, Q., & Zhang, Q. (2011). Dynamic rheology studies of in situ polymerization process of polyacrylamide–cellulose nanocrystal composite hydrogels. *Colloid and Polymer Science*, 289(3), 247-255.
- Reyes Ortega, F., Rodríguez, G., Rosa Aguilar, M., García-Sanmartín, J., Martínez, A., & San Román, J. (2012). Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica*, 20, 7-19.
- Van Oosten, A. S., Galie, P. A., & Janmey, P. A. (2016). Mechanical Properties of Hydrogels. *Gels Handbook: Fundamentals, Properties and Applications (In 3 Volumes) Volume 1: Fundamentals of Hydrogels Volume 2: Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine Volume 3: Application of Hydrogels in Drug Delivery and Biosensing*, 67.
- Kulkarni, G., Ray, P. G., Byram, P. K., Kaushal, M., Dhara, S., & Das, S. (2020). Tailorable hydrogel of gelatin with silk fibroin and its activation/crosslinking for enhanced proliferation of fibroblast cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4073-4083.
- Li, B., Davidson, J. M., & Guelcher, S. A. (2009). The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin excisional wounds. *Biomaterials*, 30(20), 3486-3494.
- Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4), 655-663.
- Das, P., Salerno, S., Remigy, J. C., Lahitte, J. F., Bacchin, P., & De Bartolo, L. (2019). Double porous poly (ϵ -caprolactone)/chitosan membrane scaffolds as niches for human mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110493.
- Perez, R. A., & Mestres, G. (2016). Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 922-939.

- Chen, F. M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in polymer science*, 53, 86-168.
- Watt, S. M., & Pleat, J. M. (2018). Stem cells, niches and scaffolds: applications to burns and wound care. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 123, 82-106.
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S. S., Sharifi, F., Jalilian, E., ... & Yue, K. (2018). Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Advanced drug delivery reviews*, 127, 138-166.
- Madni, A., Kousar, R., Naeem, N., & Wahid, F. (2021). Recent Advancements in Applications of Chitosan-based Biomaterials for Skin Tissue Engineering. *Journal of Bioresources and Bioproducts*.
- Kim, H. S., Sun, X., Lee, J. H., Kim, H. W., Fu, X., & Leong, K. W. (2019). Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 146, 209-239.
- Puppi, D., & Chiellini, F. (2020). Biodegradable Polymers for Biomedical Additive Manufacturing. *Applied Materials Today*, 20, 100700.
- Kaliva, M., Chatzinikolaidou, M., & Vamvakaki, M. (2017). Applications of smart multifunctional tissue engineering scaffolds.
- Zhou, X., Li, C., Zhu, L., & Zhou, X. (2020). Engineering hydrogels by soaking: from mechanical strengthening to environmental adaptation. *Chemical Communications*, 56(89), 13731-13747.
- Rent, J., Zhao, L., Zhang, L., Wang, X., Li, Y., & Yang, W. (2020). Electroconductive and free-shapeable nanocomposite hydrogels with an ultrafast self-healing property and high stretchability performance. *Soft Matter*, 16(36), 8422-8431.
- Bayona Velasco, G. A. (2020). Evaluación de las propiedades mecánicas de hidrogeles biodegradables a base de polietilenglicol diacrilado, con potencial uso en el diseño de matrices para úlceras crónicas.
- Fan, C., Xu, K., Huang, Y., Liu, S., Wang, T., Wang, W., ... & Yang, S. (2021). Viscosity and degradation controlled injectable hydrogel for esophageal endoscopic submucosal dissection. *Bioactive materials*, 6(4), 1150-1162.

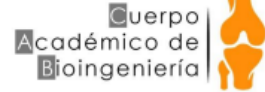
- Cong, H. P., Wang, P., & Yu, S. H. (2014). Highly elastic and superstretchable graphene oxide/polyacrylamide hydrogels. *Small*, 10(3), 448-453.
- Stancu, I. C., Lungu, A., Dragusin, D. M., Vasile, E., Damian, C., & Iovu, H. (2013). Porous gelatin-alginate-polyacrylamide scaffolds with interpenetrating network structure: synthesis and characterization. *Soft Materials*, 11(4), 384-393.
- Acharya, C., Panda, C. R., Bhaskara, P. K., Sasmal, A., Shekhar, S., & Sen, A. K. (2017). Physicochemical and antimicrobial properties of sodium alginate/gelatin-based silver nanoformulations. *Polymer Bulletin*, 74(3), 689-706.
- Ferfera-Harrar, H., Aiouaz, N., & Dairi, N. (2015). Synthesis and properties of chitosan-graft polyacrylamide/gelatin superabsorbent composites for wastewater purification. *polymer*, 6, 9.
- Tsiptsias, C., Paraskevopoulos, M. K., Christofilos, D., Andrieux, P., & Panayiotou, C. (2011). Polymeric hydrogels and supercritical fluids: The mechanism of hydrogel foaming. *Polymer*, 52(13), 2819-2826.
- Mandal, P., Manna, J. S., Das, D., Maiti, R., Mitra, M. K., & Chakravorty, D. (2018). Magnetic response of chlorophyll self-assembly within hydrogel: a mechanistic approach towards enhanced photoharvesting. *RSC advances*, 8(47), 26440-26447.
- Derrien, K., & Gilormini, P. (2009). The effect of moisture-induced swelling on the absorption capacity of transversely isotropic elastic polymer–matrix composites. *International Journal of Solids and Structures*, 46(6), 1547-1553.
- Hoch, E., Schuh, C., Hirth, T., Tovar, G. E., & Borchers, K. (2012). Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2607-2617.
- Mansoori, Y., Atghia, S. V., Zamanloo, M. R., Imanzadeh, G., & Sirousazar, M. (2010). Polymer–clay nanocomposites: Free-radical grafting of

polyacrylamide onto organophilic montmorillonite. *European Polymer Journal*, 46(9), 1844-1853.

- Murugan, R., Mohan, S., & Bigotto, A. (1998). FTIR and polarised Raman spectra of acrylamide and polyacrylamide. *J. Korean Phys. Soc*, 32(4), 505-512.
- Hassanzadeh, P., Kazemzadeh-Narbat, M., Rosenzweig, R., Zhang, X., Khademhosseini, A., Annabi, N., & Rolandi, M. (2016). Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl (GelMA). *Journal of Materials Chemistry B*, 4(15), 2539-2543.
- Jaiswal, M., Dinda, A. K., Gupta, A., & Koul, V. (2010). Polycaprolactone diacrylate crosslinked biodegradable semi-interpenetrating networks of polyacrylamide and gelatin for controlled drug delivery. *Biomedical Materials*, 5(6), 065014.
- Li, C., Mu, C., Lin, W., & Ngai, T. (2015). Gelatin Effects on the Physicochemical and hemocompatible properties of gelatin/pAAm/laponite nanocomposite hydrogels. *ACS applied materials & interfaces*, 7(33), 18732-18741.
- Pandey, M., Mohamad, N., & Amin, M. C. I. M. (2014). Bacterial cellulose/acrylamide pH-sensitive smart hydrogel: development, characterization, and toxicity studies in ICR mice model. *Molecular pharmaceutics*, 11(10), 3596-3608.
- Thakur, G., Mitra, A., Rousseau, D., Basak, A., Sarkar, S., & Pal, K. (2011). Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(1), 115-123.

12. ANEXOS





LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
A través del
CUERPO ACADÉMICO CONSOLIDADO DE BIOINGENIERÍA
Otorga la presente:

CONSTANCIA

a: Rocío Torres García, Dr. Jaime Flores Estrada, Dr. Juan Valerio Cauch Rodríguez, Ph. D. Miriam Veronica Flores Merino

Por haber presentado el trabajo titulado "Obtención y análisis de las propiedades reológicas de un hidrogel inyectable de poliacrilamida para aplicaciones biomédicas" en la modalidad de POSTER durante el 3rd International Congress of the Red MexBIOT, y el 6th International Symposium on Bioengineering, llevado a cabo en la ciudad de Morelia, Mich., del 30 de noviembre al 2 de diciembre de 2016.

Dr. Marco A. Espinosa Medina
Representante del Cuerpo Académico

Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes
Representante de la Red MexBIOT A.C.



Universidad Autónoma
del Estado de México

EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MÉDICAS, OTORGA LA PRESENTE

A:

ROCÍO TORRES GARCÍA, JAIME FLORES
ESTRADA, JUAN VALERIO CAUCH RODRÍGUEZ,
MIRIAM V. FLORES MERINO

Por su PARTICIPACIÓN en la modalidad
CARTEL, con el tema: "SÍNTESIS y
CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL COMBINADO DE
POLIACRILAMIDA CON GELATINA COMO MATRIZ
EXTRACELULAR SINTÉTICA", EN EL MARCO DEL
Ier. CONGRESO TRANSDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA "Integración
disciplinaria para el beneficio social"

Toluca, Méx., a 24 DE NOVIEMBRE, 2017

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la
Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



M. en C. S. JULIO B. ROBLES NAVARRO
Coordinador del CICMED