



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

“Síntesis y caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* de un sistema polimérico de liberación modificada de ketoprofeno”

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

MsC. IBETH MAYERLY GAITÁN TOLOSA

Comité Tutorial:

Ph D. MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO

Tutor Académico

Dra. en C. MA. VICTORIA DOMÍNGUEZ GARCÍA

Tutor Interno

Ph D. Eng. CARLOS A. GARCÍA GONZÁLEZ

Tutor Externo



ÍNDICE

	Pág.
Introducción	8
1. Antecedentes	9
1.1 Ingeniería de tejidos y biomateriales	9
1.2 Biomateriales y polímeros	10
1.3 Redes poliméricas Semi-interpenetradas (RPSI)	11
1.4 Redes poliméricas y liberación controlada de fármacos en piel	12
1.5 Ketoprofeno como molécula bioactiva para heridas	12
1.6 Biocompatibilidad	13
1.7 Aplicaciones	14
2. Planteamiento del problema	15
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos: general y específicos	18
6. Diseño metodológico	19
6.1 Diseño del estudio	19
6.2 Universo y Muestra	19
6.3 Procedimientos	19
6.3.1 Síntesis de la RPSI a través de un proceso de fotopolimerización	20
6.3.1.1 Metodología para la síntesis de polietilenglicol diacrilado (PEGDA)	20
6.3.1.2 Metodología de la polimerización de la RPSI de PEG-quitosano	21
6.3.1.3 Encapsulamiento de ketoprofeno en la RPSI de PEG-quitosano.	21
6.3.2 Caracterización fisicoquímica de la RPSI con ketoprofeno	22
6.3.2.1 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier de la RPSI y del sistema polimérico	22

6.3.2.2 Microscopia electrónica de barrido de la RPSI con ketoprofeno	22
6.3.2.3 Transmisión electrónica de barrido	22
6.3.2.4 Dispersión de rayos-X de ángulo pequeño	22
6.3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido	23
6.3.2.6 Cinética de hinchamiento	23
6.3.3 Cinética de liberación <i>in vitro</i> a través de espectroscopia de UV-Vis	24
6.3.3.1 Determinación de la longitud de onda del ketoprofeno por medio de espectroscopia de UV-Vis	24
6.3.3.2 Curva de calibración del ketoprofeno por medio de espectroscopia de UV-Vis	24
6.3.3.3 Liberación <i>in vitro</i> de ketoprofeno	25
6.3.4 Pruebas de biocompatibilidad	25
6.3.4.1 Ensayo de hemólisis	25
6.3.4.2 Citotoxicidad (ensayo en MTT)	26
6.3.4.3 Genotoxicidad (ensayo cometa)	27
6.4 Criterios de inclusión	28
6.5 Criterios de exclusión	28
6.6. Instrumentos	28
6.7 Recolección de datos	28
6.8 Análisis de datos	29
6.9 Aspecto ético	29
7. Resultados	30
7.1 Artículo publicado	30
7.1.1 Título del artículo publicado	30
7.1.2 Página frontal del manuscrito	31
7.1.3 Carta de aceptación	32
7.1.4 Resumen	33
7.1.5 Apartados del artículo	33
Introducción	33

Metodología	35
Resultados y discusión	37
Conclusiones	45
Referencias	45
7.2 Artículo enviado	48
7.2.1 Título del artículo enviado	48
7.2.2 Carta de envío del artículo	49
7.2.3 Resumen	50
7.2.4 Apartados del artículo	50
Introducción	50
Métodos	51
Resultados y discusión	54
Conclusiones	60
Referencias	60
8. Resultados adicionales	63
9. Discusión general	69
10. Conclusiones generales	73
11. Bibliohemerografía utilizada	74
12. Anexos	
12.1 Tabla de investigaciones previas	81
12.2 Tabla de variables de estudio	83
12.3 Consentimiento informado	85
12.4 Aprobación comité de ética	86
12.5. Estancia Doctoral	87
12.6 Productos	88
12.7 Abreviaturas	90

Introducción

En la actualidad la ingeniería de tejidos se ha convertido en un área de gran importancia en el campo de la medicina regenerativa, debido a que busca proveer sustitutos biológicos a través del uso de biomateriales, que fisiológicamente puedan ofrecer las condiciones para reparar un tejido que se encuentre lesionado. Debido a estas necesidades es importante el estudio de diferentes biomateriales naturales, sintéticos o mixtos, que tengan la capacidad de estimular la respuesta celular. Entre los biomateriales, las redes poliméricas o hidrogeles han captado la atención de los científicos.

Una de las propiedades favorables de estas redes poliméricas, es la capacidad de encapsular sustancias activas que coadyuvan en los tratamientos donde hay un evidente daño o pérdida de un órgano o tejido. Así mismo, las redes poliméricas son sistemas que pueden liberar moléculas de interés de forma modificada, es decir, permiten optimizar la velocidad y lugar de liberación. En el caso particular de enfermedades o lesiones cutáneas, es necesario el uso de fármacos antiinflamatorios y/o analgésicos para el alivio o manejo del dolor.

El ketoprofeno es un analgésico antiinflamatorio no esterooidal (AINE) que ha sido estudiado y usado en la clínica por muchos años. Se caracteriza por proveer un buen manejo del dolor agudo y crónico. Posee una limitante y es que su vida media de eliminación es muy corta (< 2 h) por lo que es necesario administrarlo varias veces al día. El uso de una vía cutánea disminuirá el riesgo de los efectos secundarios que produce la vía oral.

En este proyecto se sintetizó y caracterizó de manera físicoquímica y biológica un sistema polimérico en forma de una red semi-interpenetrada conformado por el polietilenglicol diacrilado (PEGDA, sintético) y quitosano (natural) con la finalidad de encapsular ketoprofeno.

Para este propósito se utilizaron diferentes técnicas físicas y químicas para la caracterización del material; entre ellas la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (IR-FT), microscopía electrónica de barrido (SEM), transmisión electrónica de barrido (TEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC), la dispersión de rayos-X de ángulo pequeño (SAXS), porcentaje de hinchamiento de la matriz polimérica y eficiencia de encapsulamiento del fármaco por ecuaciones teóricas y liberación del ketoprofeno a través de espectroscopía UV-Visible (UV-vis). Así mismo se evaluó la biocompatibilidad del sistema a través de pruebas *in vitro* como la hemocompatibilidad (presencia o ausencia de hemólisis, método de contacto directo), citotoxicidad (ensayo MTT) y genotoxicidad (ensayo cometa).

1. Antecedentes

1.1. Ingeniería de tejidos y biomateriales

Por más de tres décadas la bioingeniería ha desarrollado materiales implantables como prótesis ortopédicas o vasculares, dispositivos extracorpóreos como fijaciones externas, y en la actualidad se ha enfocado en la fabricación de matrices de soporte que estimulen los procesos de reparación celular dando origen a la ingeniería de tejidos. Esta área de estudio se ha convertido en uno de los campos interdisciplinarios más importantes de la medicina regenerativa, no solo por que combina principios y métodos propios de la ingeniería con las ciencias biológicas para generar sustitutos biológicos que anatómicamente y funcionalmente pueden mantener, mejorar y/o reparar un tejido lesionado.^{1,2}, si no que a su vez busca ser más eficiente al emplear biomateriales que interactúen de forma favorable con los sistemas biológicos.

El enfoque del uso de biomateriales en la ingeniería de tejidos se centra en desarrollar materiales que puedan actuar como una matriz de soporte extracelular artificial, reemplazando la natural y que le permita crear un espacio tridimensional, para que las células le den paso al tejido neoformado, con su estructura anatómica y funcional apropiada³. Además de realizar la función de soporte, se ha buscado que los biomateriales promuevan funciones específicas, por ejemplo: activación de los procesos biológicos de regeneración⁴.

Todo este desarrollo de los biomateriales y el descubrimiento de diferentes estirpes celulares (ejemplo: las células madre), han permitido que la ingeniería de tejidos se interrelacione con la terapia celular en un campo de gran potencialidad como lo es la Medicina Regenerativa^{5,6}. Entre las desventajas que se observan en el uso de células, es que las células humanas tienen un uso limitado por la posibilidad de presentar rechazo del receptor, y en el caso de las de origen animal, puede haber un alto riesgo de zoonosis y de rechazo. Por ello, una alternativa son los andamios prefabricados que como se mencionó anteriormente favorecen la regeneración celular y por ende tisular a través de diferentes propiedades *per se* a las características de los biomateriales.

Los productos que se obtienen de la interacción de los biomateriales con los sistemas biológicos, varían de acuerdo a su complejidad, al tipo de lesión y al tejido u órgano afectado⁷. Un ejemplo, son los andamios tridimensionales temporales, a base de biomateriales biodegradables, utilizados en heridas con pérdida de continuidad de la piel, mucosa o hueso, que favorecen la migración y adhesión celular, la difusión de nutrientes y factores de crecimiento; además de ejercer funciones mecánicas de sostén para la regeneración tisular⁸.

12.7 Abreviaturas

AINE: Antiinflamatorio No Esteroidal

CICMED: Centro de Investigación en Ciencias Médicas

DMSO: Dimetil sulfoxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSC: Calorimetria diferencial de barrido

EE: Eficiencia de encapsulamiento

FDA: Food and Drug Administration

H: Hinchamiento

ININ: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Ket: Ketoprofeno

mM: Milimolar

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

PEG-QUITOSANO: Polietilenglicol-QUITOSANO

PEG: Polietilenglicol

PEGDA: Polietilenglicol diacrilado

RPSI: Red polimérica semi-interpenetrada

RTFI: Infrarrojo por transformada de Fourier

SAXS: Dispersión de rayos-X de ángulo pequeño

SEM: Microscopia electrónica de barrido

TEM: Transmisión electrónica

UV-Vis: Ultravioleta Visible