



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* de
materiales poliméricos para la regeneración de tejido
cutáneo”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

BIÓL. ALONDRA ESCUDERO CASTELLANOS

Comité de Tutores

Tutora Académica

Ph D. MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO

Tutora Interna

DRA. EN C. MA. VICTORIA DOMÍNGUEZ GARCÍA

Tutora Externa

DRA. EN C. BLANCA ELÍ OCAMPO GARCÍA

6.6	Análisis Estadísticos	29
7.	Resultados	29
7.1	Anexo de artículo original	29
7.1.1	Página frontal del manuscrito	30
7.1.2	Carta de envío	31
7.1.3	Confirmación: JMSM-D-16-00362	32
7.1.4	Manuscrito	33
7.2	Resultados adicionales	53
7.2.1	Hemocompatibilidad	53
	A. Ensayo cualitativo de hemólisis	53
	B. Ensayo de agregación plaquetaria	53
	C. Degranulación de leucocitos	54
7.2.2	Citocompatibilidad	54
	A. Fotografías del ensayo de citotoxicidad	54
8.	Conclusiones Generales	56
8.1	Conclusiones	56
8.2	Limitaciones	56
8.3	Recomendaciones	57
9.	Productos de la investigación	58
10.	Referencias Bibliográficas	67
11.	Anexos	70
11.1	Anexo 1 - Registro de protocolo de tesis	70
11.2	Anexo 2 - Aprobación por el comité de investigación y ética del CICMED	71
11.3	Anexo 3 - Documento de consentimiento informado para el uso de muestras de sangre con fines de investigación biomédica	72
11.4	Anexo 4 - Certificado de irradiación de los hidrogeles.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructuras químicas de PEG, PEGDA y Quitosano.	8
Figura 2. Acción de la deshidrogenasa mitocondrial en el ensayo XTT.	12
Figura 3. Síntesis de PEGDA y la red polimérica	21
Figura 4. Evaluación cualitativa de hemólisis.	53
Figura 5. Micrografía de los frotis de plasma rico en paquetas (PRP) con tinción Wright.	54
Figura 6. Micrografías de los frotis de la capa leuco-plaqueteria con tinción Wright.	54
Figura 7. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel PEG.	55
Figura 8. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel multi-arm PEG.	55
Figura 9. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel PEG-CH.	56

ÍNDICE DE FIGURAS (ARTÍCULO ORIGINAL)

Fig. 1 FT-IR spectrum (Espectroscopia FT-IR).	47
Fig. 2 Direct <i>in vitro</i> hemolysis assay based on ISO 10993-4 (1992); (Ensayo de hemólisis <i>in vitro</i> basado en ISO 10993-4 (1992)).	48
Fig. 3 Mononuclear cell XTT assay (Ensayo XTT de células mononucleares).	48
Fig. 4 Cytotoxicity assay (Ensayo de citotoxicidad).	49
Fig. 5 Cell proliferation assay (Ensayo de proliferación celular).	50

Resumen:

Los problemas de salud asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos son casos médicos más frecuentes de lo que se pudiera percibir e incluso mortales cuando no son tratados adecuadamente; además, representan costos elevados en la atención para el sistema de salud, para el propio individuo y su entorno familiar. La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria que surge para mejorar la salud de esta área, se basa en la investigación y desarrollo de biomateriales que han evolucionado en conjunto con áreas como la biología celular, molecular y las ciencias de materiales e ingeniería. En la actualidad, la técnica se basa en la reproducción de células sobre un material polimérico prefabricado con biomateriales, entre los que encontramos a los hidrogeles, que son redes tridimensionales con propiedades hidrofílicas. Estos materiales se caracterizan por ser porosos y adheribles, favoreciendo que sirvan de soporte para la proliferación de determinadas células a fin de dirigir la regeneración del tejido lesionado. Para el uso de nuevos biomateriales en la ingeniería de tejidos es indispensable demostrar la capacidad del biomaterial de permitir el contacto con algún tejido existiendo una respuesta favorable del huésped hacia el mismo, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida (biocompatibilidad). El primer paso para la evaluación de la biocompatibilidad son los ensayos *in vitro*, siendo favorables en reproducibilidad y predicción, por lo que se utilizan para producir andamios (estructura polimérica porosa) de alta calidad y para reducir u optimizar el número de pruebas a realizar en modelos animales. Esta prueba nos permite establecer los beneficios y limitaciones de los biomateriales desarrollados. En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad de tres materiales poliméricos para demostrar su potencial para ser usados en ingeniería de tejidos por medio de pruebas de citocompatibilidad y hemocompatibilidad). Asimismo, se evaluaron técnicas de desinfección y esterilización gamma para producir materiales estériles que puedan ser utilizados en ingeniería de tejidos.

Palabras clave: polímeros, biomateriales, hidrogel, biocompatibilidad, *in vitro*, citotoxicidad, hemocompatibilidad, cutáneo.

Summary:

The problems associated with medical cases of functional tissue loss or organ failure are destructive and expensive, even more frequent than could be perceived, sometime if not properly treated, even deathly. Tissue engineering is an interdisciplinary field that emerged to address these clinical problems, it is based on researching and development of biomaterials that have evolved along with areas such as cell biology, molecular and materials science and engineering. Today, the technique is based on seeding cells onto prefabricated scaffold biomaterials, like the hydrogels, that are three-dimensional networks with hydrophilic properties. These materials are characterized as being porous and sticky, favoring the support for the proliferation of certain cells in order to lead the regeneration of injured tissue. As a prerequisite for the use of materials in tissue engineering is testing biocompatibility which is the ability of the biomaterial to allow contact with any tissue, existing a favorable host response, accepting it as their own and restoring previously lost function. The first step for evaluating biocompatibility is to perform the *in vitro* assays. These assays have been demonstrated more reproducibility and predictability than *in vivo* assays, therefore the *in vitro* assays are used to produce high quality scaffolds and testing on animals as less as possible. This test is essential to establish the benefits and limitations of biomaterials tested in order to improve the scaffolds. This work will focus on assessing the biocompatibility of three polymeric materials with potential use in tissue engineering by means of cytocompatibility tests and hemocompatibility tests. Furthermore, disinfection techniques and gamma sterilization were evaluated to produce sterile materials that can be used in tissue engineering.

Keywords: polymers, biomaterials, hydrogel, biocompatibility, in vitro, cytotoxicity, biocompatibility, skin.

1. Antecedentes:

1.1. Biomateriales e ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un área de estudio interdisciplinaria que resuelve problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Se define como la aplicación de los principios de ingeniería, basándose en la utilización de biomateriales, a los sistemas biológicos de forma que sean capaces de estimular la respuesta celular y molecular para generar nuevo tejido o restablecer la función tisular (1).

Un biomaterial se define de forma general como cualquier material sintético o natural que posea propiedades novedosas para ser introducidas en el tejido vivo como parte de un injerto o dispositivo médico. El biomaterial debe ser apropiado para entrar en contacto directo con el cuerpo humano sin provocar ninguna reacción inmune de rechazo o adversa de tal forma que intente imitar el tejido original que fue perdido para restablecer su función (2), esto de acuerdo al paradigma de la medicina de la sustitución por biocompatibilidad. En la actualidad existe una definición que engloba todo lo considerado como biomaterial estableciéndose como cualquier sustancia ingenieril (sola o en complejo) que, regulando las interacciones con componentes de sistemas vivos, dirige el curso de procedimientos terapéuticos o de diagnóstico (3).

La ingeniería de tejidos se basa en el uso de biomateriales para mejorar procesos de sanación y el estado de salud, sus aplicaciones médicas incluyen el diseño de tejidos y órganos artificiales. Los biomateriales se utilizan para reemplazar físicamente cualquier tejido duro o blando que ha sufrido algún daño o destrucción a través de algún proceso accidental o patológico. Así mismo, se incluyen todos aquellos dispositivos que se usan para mejorar el cuidado de la salud general de la población y se fabrican por imitación del proceso que emplea el fenómeno biológico. Los materiales aplicados en medicina regenerativa han jugado un papel fundamental, de forma que utilizando un material sintético se ayude a generar un nuevo tejido, que sin éste, sería imposible regenerar. Las principales funciones de estos materiales, son aplicar los principios de ingeniería de tejidos de forma que se simule la función de los tejidos u órganos de los seres vivos (2).

De acuerdo a Bhat y Kumar (2013) (2), los biomateriales utilizados en el área de la salud se clasifican como: naturales, sintéticos y semi-sintéticos o híbridos. Los naturales son todos aquellos derivados de plantas o animales, los sintéticos son los realizados por el hombre principalmente la mayoría de los polímeros, cerámicas y metales; los híbridos son una combinación de ambos. Dependiendo del tejido al cual se quiera aplicar es que se utilizan ciertos biomateriales, por lo general para regeneración de piel los más utilizados son los polímeros sintéticos.

Dentro de la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos es una de las áreas con mayor potencial. Entre los elementos indispensables para construir un tejido, la matriz o andamio (estructura polimérica porosa) a base de biomateriales naturales o sintéticos, es el principal componente. Otros componentes indispensables son las células vivas troncales o progenitoras y las unidades extracelulares que participan en la estimulación de la reparación del tejido dañado como los factores de crecimiento (4).

Existen dos vías para la regeneración de tejidos con la utilización diferente de biomateriales. La primera, consiste en tener andamios modificados que permitan el crecimiento de células fuera del cuerpo humano e imitando *in vitro* el tejido por reparar para después ser implantado en el paciente, con el tiempo el andamio es reabsorbido y reemplazado con células propias. La segunda, es la regeneración *in situ* de tejidos, en esta vía los biomateriales se utilizan para estimular la reparación del tejido induciendo la regeneración de las células propias del individuo por ejemplo algunas estrategias utilizan soluciones o micropartículas que liberen estímulos químicos o factores de crecimiento que activen a las células que se encuentren en contacto con el estímulo, generando gradientes y favoreciendo la regeneración tisular. Gracias a estos biomateriales inertes millones de personas han mejorado su calidad de vida y aún siguen siendo objeto de estudio para su continua mejora y aplicación adecuada (5). Las superficies de los materiales que son generalmente modificados con factores de crecimiento, proteínas o biocomponentes, favorecen la proliferación de las células y la reconstrucción del tejido (2). En la actualidad los andamios sin componentes celulares que estimulan la regeneración de tejidos tienen la ventaja de ser de fácil manejo y reducir costos.

Los biomateriales en forma de andamios poseen gran variabilidad en sus métodos de producción, ya que pueden ser contruidos desde distintos enfoques, lo que les confiere propiedades particulares y diferentes tales como su habilidad para absorber cantidades de solvente (por ejemplo: agua, nutrientes, etc.), encapsular una cierta concentración de medicamentos, capacidad de degradación, características de soporte celular, etc. Estas características convierten a los biomateriales en un candidato prometedor para controlar y tratar gran cantidad de enfermedades (6).

La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos están contruidos por estructuras sintéticas elaboradas a partir de materiales poliméricos. En particular, los más utilizados gracias a sus propiedades, son los andamios de materiales poliméricos bioabsorbibles es decir, con capacidad de degradarse por hidrólisis y absorberse completamente por vías metabólicas. Lo anterior puede disminuir el riesgo de padecer generación de tejido fibroso e infecciones, con la posibilidad de crear tejidos naturales (2).

El surgimiento de la idea de regenerar partes del cuerpo humano dañadas a partir de sustitutos o tejidos biológicos, ha sido un razonamiento no poco común. La primera generación de biomateriales modernos surgió a mediados del siglo XX. La meta era conseguir materiales que no reaccionaran con el tejido circundante y cuyo material se adaptara al tejido que se reemplazaría sin causar toxicidad, centrandose en la bioinactividad, mínima reacción/interacción. En los años 80 la segunda generación de biomateriales se basó en la bioactividad, generando biomateriales biodegradables, por un lado se presentaron los materiales bioactivos (hidroxiapatita y cerámicos activos) y por el otro, los primeros materiales bioabsorbibles (polímeros biodegradables) con el objeto de generar materiales que favorecieran parte del tejido vivo (5).

Una tercera generación de biomateriales en años recientes llega con la investigación en superficies ingenierizadas y arquitecturas diseñadas, que utilizan células vivas para atraer células endógenas facilitando la regeneración tisular. Esta generación busca combinar las propiedades de bioactividad y bioabsorbibilidad. Se busca también aplicar estímulos a nivel celular y molecular que permitan interactuar a los biomateriales con el tejido de forma controlada (5).

1.1.2 Ingeniería de tejidos en piel.

El cuerpo humano tiene una tendencia a repararse, sin embargo ante situaciones que abrumen esta capacidad del cuerpo, éste puede responder de distintas formas, por ejemplo generando una cicatriz. Con respecto a la piel, la mayoría de las heridas provocan mecanismos celulares que sanan las heridas al formar cicatrices. Dependiendo de la gravedad, pueden ser heridas que sanan rápidamente o heridas que comprometan la funcionalidad, la fisiología y la estética del tejido expuesto a factores que causen heridas graves, como las quemaduras profundas o extensas y las úlceras diabéticas, entre otros (1).

La cuestión es encontrar la manera de desarrollar técnicas que faciliten la regeneración, de tal forma que se eviten los procesos desfavorables posteriores. Primordialmente para regenerar el tejido cutáneo se ha planteado que es necesario contar con una fuente de células capaces de diferenciarse, una matriz que sirva de soporte para la proliferación celular e incluso permita la diferenciación y migración de dichas células. El tejido cutáneo se compone de fibroblastos, los cuales producen la matriz extracelular. Durante su proliferación segregan colágeno, factores de crecimiento y proteínas creando una dermis viva (7). Es de igual importancia considerar la información espacial comprendida en las tres dimensiones del área a reparar, así como una respuesta bioquímica de la superficie que facilite su propia organización. Los requerimientos básicos de un remplazo cutáneo obtenido por ingeniería en tejidos son: factibilidad, disponibilidad, manejo clínico adecuado, tener propiedades de ser adherentes, autólogos, mejorar la calidad de la cicatriz y ajustarse a la superficie de la zona por reparar (1).

La ingeniería de tejidos en piel se ha enfocado en estimular la velocidad y calidad de la sanación de la herida, reduciendo la cicatriz y dando especial importancia en mantener protegida la superficie de la herida e incluso reemplazar la superficie de la piel. La piel es una estructura celular tridimensional compuesta de células provenientes, en su desarrollo primario, de todas las capas embrionarias y sirve como una barrera dinámica entre el cuerpo humano y el ambiente. Siendo el órgano más extenso, la piel se adecua a las diferentes zonas del cuerpo adaptándose a las necesidades que le demandan funciones locales, sin olvidarse que cuenta con inervaciones y suministro sanguíneo como cualquier órgano funcional. Por lo ya mencionado es indispensable que se comprenda el origen de la herida de tal forma que se pueda conocer que tiene que ser reconstruido, replicado y reemplazado en el eje que dirija a una solución práctica, rápida y con un beneficio de bajo costo cumpliendo con el efecto requerido (1).

Debido a las importantes funciones de la piel, su pérdida puede propiciar morbilidad severa e incluso causar la muerte. Es primordial para mantener la homeostasis. En este contexto, para el cuerpo es necesario tener intacta esta barrera estructural (1).

Los principios en la ingeniería de piel orientados a reducir el tiempo de sanación se han enfocado principalmente en desarrollar mecanismos para obtener injertos de piel de espesor total o parcial que permita la expansión del tejido en la zona afectada. Los beneficios de este tratamiento son que el tejido transplantado cuenta con todas las características del sitio donador incluyendo la retención de la inervación. Posteriormente, el interés se ha centrado en la expansión del tejido *in vitro*, esto a base de una biopsia del tejido con espesor total colocándolo en un sistema que permita su viabilidad y facilite la replicación celular, resultando en el crecimiento del tejido. No

obstante estos eventos, aún presentan importantes limitaciones como lo son, el área que son capaces de abarcar y el tiempo necesario para obtenerlos (1).

En busca de un sistema que ofrezca cubrir una mayor superficie de piel de forma rápida, se inició a considerar por separado la epidermis y la dermis. En los años setenta los estudios de Green *et al.*, se enfocaron en cultivar queratinocitos en láminas apropiadas para el injerto y expandir el tejido en laboratorio encontrándose con dificultades en el tiempo de cultivo, adherencia a la herida, su durabilidad. Su costo beneficio no fue eficiente ya que únicamente se reemplazaba la epidermis. Se han realizado diversos esfuerzos entre ellos la liberación de células en forma de aerosol que permiten contar con una mejor adherencia y pueden ser obtenidas en menor tiempo. Posteriormente, se consideró importante tomar en cuenta el papel de los melanocitos en el proceso de obtención de células dérmicas y epidérmicas en conjunto, para la disociación física y enzimática además que permite el desarrollo apropiado de la pigmentación (1).

A continuación, la ingeniería de tejidos se enfocó en contar con un andamio dérmico adecuado. En 2009 Freytes y colaboradores observaron el fenómeno conocido como “inducción por guía de contacto” (del inglés *contact guidance*), es decir el contar con células específicas del tejido circundante, podría inducir diferentes respuestas celulares al expresar el fenotipo (morfología y química) de la matriz circundante. Años atrás quienes trabajaron con cultivos epidérmicos fueron Yannas y Burke en 1975, culminando su investigación en producto comercial llamado Integra. Este concepto de la regeneración de proliferación celular por contacto y con un andamio, es la práctica clínica que se realiza en la actualidad. Este andamio cuenta con poros que permiten sean cubiertos por las células que van proliferando, el tamaño del poro debe ser menor a 60 μm , obteniendo el tamaño óptimo al observar la migración de las células expresando un fenotipo dérmico de fibroblastos reticulares. Sin embargo posteriormente surgen otros productos entre los que encontramos a Matriderm, Apligrat y Pel nec, como medida para resolver los problemas que presentaba integra de reducir el tiempo de vascularización principalmente (1).

Sin embargo la recuperación de las heridas en piel es conocida por contar con un complejo sistema que desencadena una serie de eventos, principalmente en tres estados que van desde una inflamación seguida por la formación del tejido y terminando con una remodelación del tejido. Por lo mencionado anteriormente, es necesario comprender que desarrollar una solución en el campo de la ingeniería de tejidos da la oportunidad de ofrecer un mecanismo de reparación hacia la situación a la cual fue encaminada sin abarcar a todas las posibles soluciones, ya que no siempre una solución será aplicada para todas. Es claro que una regeneración siempre deja una cicatriz, sin embargo la ingeniería en tejidos ofrece amplias soluciones innovadoras que facilitan la sanación de las heridas *in situ* de múltiples capas de piel y de los diversos tipos de células (1).

El utilizar nuestro conocimiento de sanación por migración celular a partir de áreas de estructuras anexas de piel para formar las nuevas capas dérmicas, y el generar tecnologías que permitan obtener un ambiente óptimo para la migración de las células, es la clave para mejorar la respuesta celular al reducir el tiempo de regeneración de heridas dérmicas y mejorar su resultado final (1).

1.1.3 Biomateriales de origen polimérico

Un polímero es una macromolécula, formada por uniones covalentes entre unidades repetidas de monómeros (unidad simple molecular), su formación es a base de reacciones de polimerización

(8). Duncan en el 2003 realizó una extensa revisión sobre polímeros que pueden ser utilizados en la terapéutica encontrando numerosos artículos que observan una expectativa importante para el futuro de los polímeros en el área biomédica. En su revisión destaca la importancia de este tipo de biomateriales para su aplicación en la medicina (9). Las propiedades físicas de los polímeros son muy diferentes a las de sus unidades básicas constituyentes, por lo que se han investigado para ser utilizados en gran cantidad de aplicaciones. Los polímeros sintéticos pueden ser clasificados de acuerdo a su aplicación como biomateriales para ingeniería de tejidos, por tal motivo el número de materiales poliméricos que se utilizan ha aumentado enormemente durante los últimos años (8, 10).

Los polímeros utilizados en biomedicina se centran en cumplir características importantes como la asepsia, resistencia química y radiológica, entre otras características específicas según la zona del cuerpo y ubicación en donde van a ser utilizados (1). Las nuevas tecnologías han mostrado importante avance ante retos de la ingeniería de tejidos y los biomateriales como la producción de matrices tridimensionales y técnicas mínimamente invasivas. Uno de los importantes avances en este campo es el diseño de microambientes sintéticos para lograr efectos biológicos específicos sobre determinadas células (10).

En concreto, los biomateriales son aquellos materiales capaces de permanecer en el cuerpo como parte de un tejido vivo de tal forma que permanezcan en contacto directo con tejidos determinados sin afectar el resto del organismo, es decir materiales biocompatibles. Un biomaterial tendrá la finalidad de completar y ayudar a mejorar el funcionamiento de determinado tejido (11, 12).

Los andamios o matrices dérmicas pueden ser diseñados para cubrir funciones específicas que se requieran, principalmente se utilizan para proteger la herida mientras esta membrana indispensable pueda regenerarse, es esencial proteger la herida de la invasión de microorganismos exógenos así como evitar la pérdida de líquidos y proteínas además de mejorar estética y funcionalmente la zona de piel regenerada (1).

Las técnicas para elaboración de andamios van desde unión de fibras, electrospinning o electrohilado, separación de fases, liofilización, entre otros. La clave para obtener un polímero destinado a la ingeniería de tejidos en piel, es su reproducibilidad de elaboración o síntesis con un control de la distribución y el tamaño de sus poros, poseer una adecuada respuesta inmune (principalmente sobre la inflamación que puede provocarse al degradarse el polímero), además de asegurarse de remover todo residuo orgánico tóxico. Según la aplicación final del andamio es importante aplicar la técnica correcta a seguir para la elaboración de esta estructura polimérica, ya que pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos (1).

En ingeniería de tejidos, se han utilizado ampliamente el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), el polietilenglicol (PEG). Sin embargo también encontramos polímeros de origen natural como azúcares complejos en los que encontramos el hialuronano y el quitosano. Además también pueden ser utilizados compuestos inorgánicos como la hidroxiapatita (10).

1.2 Hidrogeles

Los polímeros adoptan formas de presentación diversas: fibra y biotextiles, elastómeros, materiales biodegradables, biomateriales inteligentes, hidrogeles, entre otros. Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales de elevado peso molecular e hidrófilicos, también retienen proteínas bioactivas u otros principios activos. Los entrecruzamientos químicos y físicos de los polímeros permiten proveer una red de estructura definida y de integridad física. Su comportamiento hidratante depende del medio en el que se encuentren y varía según su pH, fuerza iónica, temperatura, estímulos eléctricos o magnéticos, entre otros. Las características mencionadas son de especial interés para el uso de estos materiales como remplazo de tejido blando, por lo que han sido objeto de investigación como alternativa de soporte y guía para el desarrollo de tejidos *in vitro* e *in vivo* (13).

Las llamadas pseudodermis, descritas en la actualidad, se tratan de superficies diversas sobre las cuales pueden desarrollarse los queratinocitos. Los hidrogeles pueden servir de andamio para reparar lesiones cutáneas al servir de soporte para que las células puedan migrar, el andamio de polímero tridimensional, asemeja las funciones de la matriz extracelular encontrada normalmente en los tejidos. Además favorecen procesos de diferenciación, crecimiento, migración y adhesión de células y tejidos (14).

Algunos de los materiales comúnmente usados en hidrogeles para tejido cutáneo son el quitosano, gelatina, alginato, polietilenglicol (PEG), polivinil acetato (PVA), glicerol, etc. (Figura 1). Generalmente se utilizan en combinaciones variadas para mejorar sus propiedades. El quitosano tiene propiedades bactericidas, fungicidas, no tóxicas, humectantes, mejora la adhesión celular, es hemostático, biodegradable y posee una alta estimulación de la proliferación celular (15); el polietilenglicol muestra baja inmunogenicidad, tiene propiedades de viscosidad y elasticidad, se degrada hidrolíticamente tiene alta absorción, es hemocompatible y biocompatible (15); y el ácido poliláctico el cual tiene una baja densidad y es altamente versátil, es decir, se puede formular para que exhiba diferentes características según su uso (16).

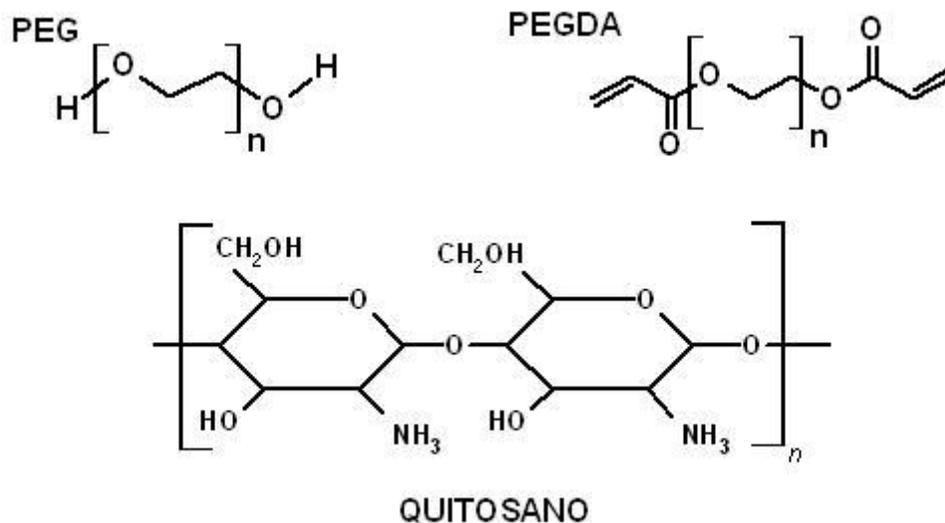


Figura 1. Estructuras químicas de PEG, PEGDA y Quitosano. Estructuras químicas de interés de materiales comúnmente usados en hidrogeles para tejido cutáneo. PEG (Poli-etilenglicol). PEGDA se refiere a la funcionalización de PEG como PEGDA (Poli-etilenglicol diacrilado). Quitosano se refiere a la estructura química del poly(β -[1,4]-D-glucosamina).

Los poros de los hidrogeles tienen la funcionalidad de permitir que las células vivas se acomoden adecuadamente de tal forma que puedan penetrar y proliferar al mismo tiempo que el hidrogel se va degradando y liberando factores de crecimiento y proteínas que favorecen esta situación. Además de estas características se busca que los hidrogeles sintetizados presenten una alta biocompatibilidad, al brindar un ambiente favorable para las células y las proteínas. Deben de tener una gran capacidad de adaptarse a diferentes superficies al moldearse en diferentes formas. Sin embargo existen ciertas limitaciones entre las que se encuentran la baja resistencia mecánica y la dificultad para ser esterilizadas. Entre las ventajas más destacables de los hidrogeles, sobre las técnicas previamente utilizadas, se encuentra el no crear rechazo inmunológico al combinar las células propias del paciente con los andamios de los polímeros (13).

1.2.1 Métodos de esterilización

La esterilización es un proceso crítico para el uso clínico de los hidrogeles como andamio para ingeniería de tejidos. Una comparación de las técnicas de esterilización es un paso que se debe realizar con el fin de analizar los parámetros óptimos (dosis de radiación, costos y eficiencia) para su fabricación. Además, existe una diferencia significativa en la dureza y propiedades del material según el método de esterilización.

Se ha reportado que la esterilización de hidrogeles de polietilenglicol por radiación gamma a una dosis de 25 kGy disminuye la dureza del material y posiblemente genera radicales libres; mediante óxido de etileno como esterilización, únicamente disminuye la dureza del material (17). Por otro lado se han propuesto nuevas técnicas de esterilización efectivas como lo es la exposición del material a CO₂ denso (70 °C y 75 bar de presión) por 6 h, el cual permite conservar las propiedades de los hidrogeles, ya que comparado con exposición a rayos gamma a dosis de 5-25 kGy o vapor (5 min a 132 °C y 186 kPa) se ha observado que cambian las propiedades reológicas del hidrogel. Incluso se ha comprobado que esta técnica permite al material mantenerse biocompatible y no causa toxicidad en pruebas *in vivo* en hurón (18), sin embargo al ser una técnica nueva y más compleja que las anteriores no se presentan aún las facilidades para su utilización, lo que podría incrementar costos.

La esterilización por radiación ionizante normalmente utiliza rayos gamma. Los rayos gamma son fotones de la radiación electromagnética con energías en el rango de 1 keV-10 MeV. Son similares a los rayos X y son penetrantes (17). La irradiación gamma se ha utilizado para obtener geles de PEG entrecruzados por lo que es posible que después de ser esterilizados por irradiación gamma se observen agregados como resultado del entrecruzamiento (18). La esterilización mediante calor húmedo, desnatura las proteínas, por lo que no es la mejor opción para su utilización en materiales hidrofílicos (18).

La comparación de los materiales en las etapas tempranas de investigación podría conducir a tomar mejores decisiones en sus aplicaciones. En algunos otros estudios se ha reportado que varios polímeros son resistentes a dosis altas o alrededor de 25 kGy (19). Sin embargo debido a estas controversias en las diferentes técnicas de esterilización, la desinfección de materiales poliméricos en etanol al 70 % es comúnmente utilizada en experimentos de cultivo celular *in vitro* con el fin de evitar daños morfológicos y/o químicos (18).

1.2.2 Espectroscopia en el infrarrojo por transformada de Fourier.

La espectroscopia por transformada de Fourier (FT-IR), brinda la localización e identificación de grupos funcionales y mide los cambios vibracionales que ocurren cuando una molécula absorbe energía electromagnética, por espectroscopia infrarroja. Permite identificar los grupos funcionales de una molécula y el efecto de nuevos enlaces químicos (20).

Las frecuencias de la espectroscopía infrarroja brinda un espectro de absorbancia, el cual es la huella digital molecular del material (21). Esta emplea un interferómetro (dispositivo óptico) que genera contra tiempo una grafica de intensidades, conteniendo la información de toda la radiación absorbida por la muestra para todas las frecuencias del haz inicial. A través de las transformadas de Fourier se realiza la decodificación de todo el interferograma, ya que el espectro de IR esta dado por la intensidad de luz transmitida por la muestra en función de la frecuencia (20).

En materiales no vivos como los polímeros se ha utilizado con diferentes fines, por ejemplo para conocer los grupos químicos presentes en determinado material, para conocer la existencia de nuevos enlaces químicos formados en la matriz del polímero ya sea por añadir otros polímeros y/o nanopartículas (22) o por la aplicación de técnicas anexas, como lo podría ser en biopolímeros, las diferentes técnicas de esterilización que pudieran cambiar su composición química(23). La FT-IR se ha utilizado inclusive con materiales vivos para clasificar e identificar muestras de bacterias utilizando patrones de FT-IR, esta exactitud ha permitido que su utilización sea muy amplia (24, 25).

1.3 Biocompatibilidad.

Las interacciones del biomaterial con los componentes vivos tienen un impacto significativo en la habilidad del material para desarrollar satisfactoriamente y en el tiempo necesario, la función deseada. (3).

La característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de la biomedicina, es la biocompatibilidad con los tejidos es decir que sea compatible en contacto con la zona biológica y que el organismo no desencadene una respuesta inmunológica contra el biomaterial, además de poseer la resistencia y propiedades mecánicas adecuadas dependiendo de su uso (1). La definición más aceptada de biocompatibilidad se refiere a la característica del biomaterial de tener la habilidad de desarrollar su función con una respuesta favorable del huésped hacia él mismo en una aplicación delimitada (3). La capa o andamio generado, una vez en uso, se encontrará en contacto con el ambiente de la herida, por lo que el material debe ser compatible con las células nativas de la piel sin provocar efectos citotóxicos (26). En concreto la biocompatibilidad se refiere a la capacidad del tejido de permitir el contacto con el biomaterial existiendo una respuesta favorable del huésped hacia el mismo aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida (3).

Las pruebas de biocompatibilidad son una estrategia para evaluar materiales para regenerar tejidos funcionales, en esta estrategia se estudian los procesos fisiopatológicos *in vivo* e *in vitro* mediante selección de células y materiales de acuerdo a las condiciones metabólicas y mecánicas de la zona por reparar. Es por esto que los biomateriales deben tener propiedades y características específicas respecto a la superficie a reparar. Tan importante es el proceso de biocompatibilidad

que los estudios realizados en este ámbito deben ser realizados de acuerdo a la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), siguiendo la guía internacional ISO-10993 (estudios de biocompatibilidad) (12).

Las tecnologías para la obtención de hidrogeles involucran, entre otros procesos, la mezcla de polímeros con diversos aditivos, los cuales incrementan el riesgo de presentar citotoxicidad. Los materiales de sustituto dérmico pueden examinarse en estricto control en el laboratorio, fuera del contacto directo con el tejido. Para tener una adecuada manipulación clínica son necesarios los estudios de biocompatibilidad ya que permiten evaluar la viabilidad del producto. Es esencial el estudio *in vitro* para identificar los efectos nocivos potenciales que pueda tener un sustituto dérmico antes de que se encuentre en contacto con el ser humano. Todo ensayo de biocompatibilidad de un nuevo biomaterial debe ser realizado *in vitro* antes que *in vivo* con la finalidad de disminuir el uso de los modelos animales y los riesgos en las pruebas clínicas (27). Los fibroblastos, como células dérmicas que se encuentran principalmente en la capa basal de la piel, son las células utilizadas para determinar la citocompatibilidad *in vitro* de diversos hidrogeles, al medir su proliferación e interacción con la finalidad de apreciar el panorama general de sus funciones normales (26).

La toxicidad puede dar lugar a efectos a largo plazo, desencadenando desde la alteración del sistema inmune hasta el desarrollo de tumores malignos por algún posible daño genético. Los estudios de biocompatibilidad *in vitro* pueden mostrar incluso la dosis y duración del tratamiento en medida que reflejan las respuestas celulares y moleculares de las células hacia los biomateriales evaluados. Existen diferentes parámetros experimentales primordiales de biocompatibilidad *in vitro*, la expresión de citocinas, la genotoxicidad y en particular de mayor interés la citocompatibilidad y la hemocompatibilidad (27).

El primero de ellos, la expresión de citocinas, se basa en la función de las citocinas que regulan interacciones entre células del sistema inmune y se encargan de inducir la respuesta inflamatoria, en circunstancias normales, las citocinas no son detectables, por lo que su detección en niveles elevados indicaría claramente una reacción inmune contra el material. Por otro lado la genotoxicidad, es el daño posible que puede causar una sustancia química o algún otro agente físico o biológico en el material genético. La producción de hebras rotas de DNA, correlaciona bien con el posible daño del genoma; existen diversos ensayos que pueden realizarse para establecer la genotoxicidad, dentro de ellos se encuentra el ensayo cometa que requiere sólo unas pocas células por ensayo (27).

Sin embargo de vital importancia son los ensayos de citotoxicidad y hemocompatibilidad, ya que cualquier daño en la célula o en el sistema inmune puede ser detectado en estos tipos de estudios, además de que no requieren mucho tiempo de exposición al material. Los ensayos de citotoxicidad se utilizan para medir los efectos de compuestos tóxicos expuestos a cultivos celulares, en múltiples concentraciones y en diferentes intervalos de tiempo (referencia).

La citotoxicidad y la proliferación celular se evalúan por varios métodos. Por ejemplo, el ensayo colorimétrico de la sal 2,3-bis (2-metoxi-4 nitro-5 sulfofenil) -2 H tetrazolio-5 carboxanilida (XTT). Se basa en la reducción metabólica de la sal de tetrazolio a cristales de formazán (color naranja), actividad realizada por una enzima mitocondrial (Figura 2). Lo que se determina es la funcionalidad mitocondrial de las células, basándose en las células viables que poseen sus organelos activos, es decir depende de las células que se encuentren intactas (27). El dato

observado en esta prueba es la cantidad o porcentaje de células vivas. Se ha reportado previamente que un porcentaje de viabilidad mayor al 80% permite considerar que el biomaterial presenta citocompatibilidad.

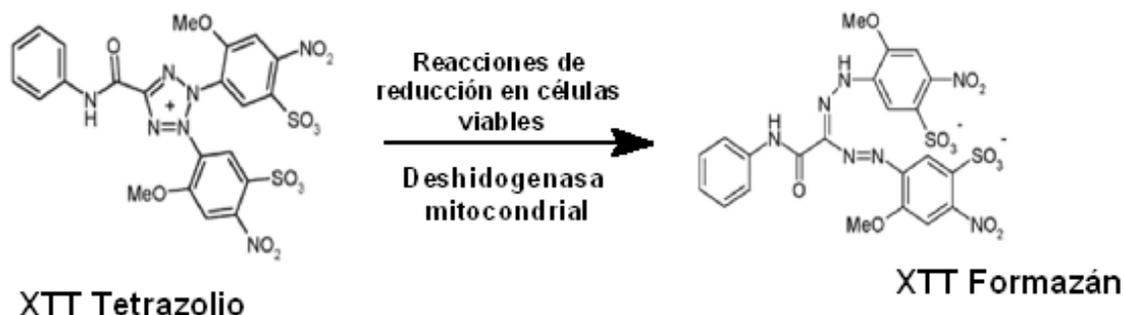


Figura 2. Acción de la deshidrogenasa mitocondrial en el ensayo XTT. Transformación del tetrazolio XTT(amarillo) a formazán (naranja) por acción de la enzima mitocondrial deshidrogenasa, activa solo en células que se encuentren viables.

Respecto a la proliferación celular es posible cuantificarla utilizando este método colorimétrico. En un material citocompatible se puede observar por medio del microscopio la elongación y estrechamiento de los fibroblastos en el tercer día a lo largo de las paredes depositándose en los poros, un considerable incremento de estas células viables se observa en el día 5, es indispensable que los fibroblastos se extiendan sobre la matriz para que funcionen de manera adecuada (26).

Otro ensayo de citotoxicidad es el llamado estudio de vida/muerte. El cual, provee información valiosa sobre los diferentes estados de viabilidad de la célula, se basa en la utilización de dos colorantes de ácidos nucleicos: SYTO 9, penetra las membranas libremente y el yoduro de propidio, que se encuentra altamente cargado positivamente, no penetra en las células, a menos que las membranas se encuentren dañadas. El mecanismo se basa en la permeabilidad de la membrana a los colorantes, en una célula intacta el SYTO 9 es permeable pero no el yoduro de propidio. No es permeable ya que la membrana externa celular es impermeable a todas las moléculas cargadas, además los lípidos de la cara externa de la membrana se encuentran cargados positivamente. Por eso no es posible su entrada por la membrana intacta, lo que permite observar las células viables de color verde. En cambio en una célula con la membrana dañada ambos colorantes penetran permitiendo observar las células muertas de color rojo (28).

Los materiales sanguíneos compatibles, son aquellos materiales que se encuentran en contacto con la sangre y que no activan el sistema de coagulación de la sangre, ni atraen o alteran las plaquetas o leucocitos. Este tipo de compatibilidad depende de diversas propiedades del biomaterial, desde la distribución del grupo químico, lo heterogéneo del material, la textura, la porosidad, etc. (16). Por ello, existen diversas pruebas que determinan la hemocompatibilidad de un producto, ya sea investigando su capacidad para inducir trombosis, coagulación, activación plaquetaria, o cualquier otro sistema biológico. El análisis de la alteración hemática se realiza por pruebas de hemólisis. La hemólisis de los eritrocitos *in vitro*, se considera que es una medida simple y fiable para estimar la compatibilidad de los materiales con la sangre. Al final, se busca que la capacidad del producto de provocar hemólisis sea inferior al 5%, (29).

Las pruebas de hemocompatibilidad *in vitro* generalmente implican la medición de la adhesión plaquetaria y la liberación de gránulos. El análisis de la activación plaquetaria es de importancia, ya que el mecanismo por el cual se induce trombosis es relevante en los procesos de cierre de

herida. Esta prueba se realiza midiendo sus marcadores, que son la agregación y propagación de plaquetas. Menos plaquetas adheridas y una morfología redondeada indican una menor activación, una mayor activación mostrará plaquetas agregadas y extendidas sobre la superficie. Los componentes de complemento parecen ser los responsables de la adhesión de leucocitos, cuando la sangre entra en contacto con un material ajeno, inicia la activación de C3a y C5a, lo que conduce a la degranulación de los mastocitos y por lo tanto la liberación de histamina y citocinas. Los gránulos leucocitarios son liberados en el proceso conocido como degranulación en respuesta a un estímulo inmunológico, por lo que el análisis de la degranulación de leucocitos se mide con base en la liberación de material leucocitario al medio celular (16, 30). Estos parámetros aquí descritos son una guía para establecer la biocompatibilidad de los materiales y predecir su comportamiento *in vivo*.

1.4 Evolución de los estudios de biocompatibilidad *in vitro*.

Existe una gran variedad de sustitutos dérmicos que utilizan diversos materiales desde biológicos hasta sintéticos. Sin embargo existen diversos estudios en progreso con el objetivo de desarrollar otras alternativas de andamios más eficientes y de bajo costo. Para poder obtener alternativas de andamios que sean utilizados en la práctica clínica, las pruebas de biocompatibilidad son necesarias e indispensables. De los primeros estudios que se encuentran documentados en materia de evaluación de la citotoxicidad se encuentra el de Mosmann en 1933, que desarrolló la prueba de biocompatibilidad que se basa en la reducción metabólica del tetrazolio MTT a formazan, años después en 1966 este ensayo es modificado y perfeccionado por Francois Denizot y Rita Lang (27).

En 1990 Christine *et al.* realizaron mediciones *in vitro* para evaluar la bioadhesión de fibroblastos, si el biomaterial genera adherencia celular, nos indica una clara atracción celular demostrando una ausencia de toxicidad y por lo tanto una alta biocompatibilidad, la adherencia nos permitiría la regeneración del tejido. En el 2003 Mattioli-Belmonte y colaboradores son los primeros en demostrar la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de un biomaterial de Polianilina (PAni). En el mismo año se realizan estudios sobre los beneficios particulares de la utilización de diversos polímeros para fines de ingeniería de tejidos en piel, como el realizado por Miyatake y colaboradores que demostraron el efecto antiinflamatorio de la quitina modificada químicamente. Más tarde se obtuvieron andamios de dos capas de diferentes materiales como el reportado en el 2011 por Franco y colaboradores donde se llevaron a cabo pruebas de biocompatibilidad en un andamio de dos capas imitando ya no solo la dermis sino también la epidermis con particularidades que permiten la dispersión y prueba en células de fibroblastos y queratinocitos (26, 27).

1.4.1 Poli (etilenglicol) y Quitosano.

En medida de obtener andamiajes para la curación de heridas existen diversos biopolímeros. Debido a sus propiedades biológicas algunos de los compuestos más sobresalientes son el polietilenglicol y el quitosano. Los hidrogeles de Poli (etilenglicol) se han reportado para varios usos, por ejemplo: andamios de ingeniería de tejidos, dispositivos de liberación controlada, entre otros (31, 32). Sin embargo, una de las principales limitaciones es la falta de propiedades de adherencia de células debido a su alta hidrofilia. Sin embargo con el fin de ser utilizado como andamio para aplicaciones de ingeniería de tejidos, el material debe proporcionar un nicho

óptimo para la proliferación y diferenciación celular, esto incluye la unión de células(15). Una importante ventaja es que el polietilenglicol puede modificarse químicamente (12).

Por otra parte, el polímero lineal derivado de la desacetilación de la quitina, llamado quitosano y compuesto de monómeros de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, se ha utilizado en el área de la aplicación biomédica para diferentes usos como lo son sanación de heridas, vendaje postquirúrgico e ingeniería de tejidos debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y muy importante: tiene propiedades antimicrobianas, hemostáticas y alta estimulación de la proliferación celular(12). Estas propiedades en combinación con el Poli(etilenglicol), estarían potenciando las propiedades de dicho polímero y mejorar también las desventajas del quitosano de poseer desventajas en sus propiedades mecánicas (33). El quitosano presenta otra importante desventaja: se disuelve en medios ácidos y eso podría incrementar su toxicidad (12).

Se ha observado que el Polietilenglicol (PEG) posee la propiedad de reducir la adhesión plaquetaria, ya que en materiales tratados con superficies ricas en PEG la adhesión plaquetaria se ve reducida, lo que lo conduce como una superficie de compatibilidad sanguínea (34). Varios trabajos han informado de la síntesis de hidrogeles y su evaluación biológica a través de pruebas de viabilidad celular, sin embargo el poli(etilenglicol) junto con el quitosano se ha estudiado en algunas ocasiones. Se ha observado que en conjunto, estas sustancias químicas se presentan mejores resultados incluso se obtienen sustitutos dérmicos con mayor biocompatibilidad (35). Como se puede observar en un estudio realizado por Zhang y colaboradores donde se observa que la biocompatibilidad aumenta al combinar el polietilenglicol (PEG 6000 y PEG 8000) con quitosano, en células fibroblásticas de ratón embrionarias (3T3) (33). El polietilenglicol es un compuesto con propiedades de biocompatibilidad importantes, aumenta la adsorción de proteínas, la adhesión, el crecimiento y proliferación de las células, sin embargo es necesario calcular la cantidad adecuada de este compuesto para no provocar el efecto inverso con cantidad excesiva del compuesto (27, 33, 35).

Recientemente, se evaluó la biocompatibilidad de polycaprolactona (PCL) y ácido poly(lacto-co-glycolico) (PLGA) con quitosano (PCL/PLGA-Quitosano) para su aplicación en ingeniería de tejidos en piel. El estudio celular fue realizado en queratinocitos y presentó una buena biocompatibilidad. Los hidrogeles fueron sintetizados por dos métodos: por electrohilado sobre el hidrogel liofilizado y por laminación de membranas (26). También se ha utilizado el hidrogel de polietilenglicol con múltiples brazos no obstante las formas en la síntesis y aplicación difieren. Su síntesis es realizada vía reacciones tipo Michael y además no utilizan AIBA con fotoiniciador; la aplicación va dirigida a células estromales de médula ósea humana, direccionando a células hematopoyéticas. Sin embargo sus hallazgos sugieren que PEG de 8 brazos permite un control más preciso de las propiedades mecánicas y biológicas, a diferencia de PEG de 4 brazos lo que podrían conducir a un espectro más amplio de aplicaciones de ingeniería de tejidos (36).

Sin embargo, muy pocos estudios comparan diferentes materiales destinados para la misma aplicación o diferentes métodos de esterilización, en donde se estudien sus propiedades mecánicas y químicas del hidrogel (37).

2. Planteamiento del Problema:

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano que actúa como barrera de protección hacia el medio externo, resultando cualquier lesión en un delicado desbalance fisiológico que aunado a heridas crónicas, como es el caso de úlceras diabéticas o accidentes inesperados, como quemaduras graves de espesor total, pueden incluso causar la muerte del individuo. Hasta el momento no se ha conseguido desarrollar un tratamiento totalmente ideal para la regeneración de lesiones cutáneas, por la compleja respuesta que el cuerpo desencadena en sus mecanismos de reparación. Desafortunadamente las heridas crónicas y accidentes inesperados de los que se habla presentan una elevada incidencia y su dificultad de tratarlos desencadena un gran impacto familiar y socioeconómico (38).

Como primera solución los injertos de piel en especial los autólogos han cubierto esta necesidad, en especial a pacientes quemados, sin embargo dejan pobres resultados estéticos y mecánicos, además de que en ocasiones no se cuenta con suficiente epitelio autólogo. Ante esto se ha visto la necesidad prioritaria de desarrollar una estructura que imite la piel autóloga. En la actualidad se cuenta con diversos andamios como los que se han descrito, incluso es factible obtener estos sustitutos de piel comerciales, que cuentan con compuestos biológicos y sintéticos que favorecen la regeneración de la piel dañada al dar soporte a las células dermo-epidérmicas. Sus ventajas principales son la solución rápida que ofrecen en una lesión importante, sin embargo la presencia de cicatrices notorias al término del tratamiento sigue presente, además y principalmente, sus altos costos aunados a la baja disponibilidad de las mismas, hacen aún necesaria la investigación en este campo (38).

Lo que se conoce hasta ahora no soluciona del todo el problema relacionado con el tejido cutáneo por lo que es indispensable que la investigación en esta área sea dirigida a la obtención de nuevos productos que imiten cada vez mejor y actúen como sustitutos dérmicos, eficientes y de bajo costo, presentando el conjunto de cualidades y requerimientos precisos, en sus características básicas. En medida de obtener otras alternativas de andamios, es necesario realizar una serie de pruebas previas al biomaterial que se pretende utilizar como sustituto dérmico, de tal forma que se corrobore su posible uso como sustituto dérmico. Los materiales deben ser compatibles con las células de la piel nativa además de no desencadenar efectos citotóxicos, esto desde el punto de vista en que el hidrogel servirá como soporte para las células nativas ya que se presentará en contacto directo con todo el ambiente de la herida. De esta forma es necesario comprobar la biocompatibilidad de cualquier material que se desee utilizar en estas condiciones, es decir que el material desarrollado previamente, presente un porcentaje de viabilidad celular adecuado (mayor al 80%). El primer paso para evaluar la biocompatibilidad son los ensayos *in vitro*, ya que es necesario estudiar los biomateriales en modelos celulares con el fin de observar sus beneficios y carencias para mejorar sus características, antes de realizar pruebas *in vivo* y de esta forma no realizar pruebas innecesarias en animales.

En la facultad de química de la UAEMex se sintetizaron 3 hidrogeles basados en polietilenglicol: PEG, multi-arm PEG y PEG-CH; dirigidos a utilizarse en ingeniería de tejidos, sin embargo se requieren una serie de pruebas antes de considerarse aptos para utilizarse, además conociendo sus características (físicoquímicas, biocompatibles, etc.) se puede definir dicha aplicación final.

Pregunta investigación: ¿Los tres materiales poliméricos serán biocompatibles en su evaluación por medio de ensayos de hemocompatibilidad y citotoxicidad *in vitro* para su uso potencial como sustituto dérmico?

3. Hipótesis:

Hipótesis 1

Hipótesis alterna: Los materiales poliméricos: 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-chitosano son biocompatibles en pruebas de citocompatibilidad *in vitro*, presentando una viabilidad celular mayor al 80% en contacto directo con fibroblastos.

Hipótesis nula: Los materiales poliméricos: 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-chitosano no son biocompatibles en pruebas de citocompatibilidad *in vitro*, presentando una viabilidad celular menor al 80% en contacto directo con fibroblastos.

Hipótesis 2

Hipótesis alterna: Los materiales poliméricos 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-chitosano producirán hemocompatibilidad menor al 5% de hemólisis de eritrocitos y no producirán agregación plaquetaria y/o degranulación de leucocitos.

Hipótesis nula: Los materiales poliméricos 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-chitosano producirán hemocompatibilidad mayor al 5% de hemólisis de eritrocitos y producirán agregación plaquetaria y degranulación de leucocitos.

4. Objetivos:

General:

Evaluar la biocompatibilidad de los hidrogeles poliméricos: PEG, multi-arm PEG y PEG-chitosano por medio de pruebas *in vitro* y establecer un método de esterilización y/o desinfección para determinar su factibilidad de uso en la regeneración de tejido cutáneo.

Específicos:

1. Sintetizar por reacciones de polimerización por radicales libres (AIBA) 2 lotes de hidrogeles poliméricos PEG, multi-arm PEG y PEG-chitosano con procesos desarrollados en la Facultad de Química de la UAEMex.
2. Aplicar dos métodos de esterilización (irradiación gamma y calor húmedo) y un método de desinfección por etanol para determinar el grado de esterilidad de los hidrogeles obtenidos.
3. Analizar por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier los cambios en los grupos funcionales sufridos por los hidrogeles después del método de esterilización o desinfección aplicado
4. Establecer las condiciones de esterilización de las muestras de los tres materiales poliméricos para su evaluación *in vitro*.
5. Evaluar la hemocompatibilidad en eritrocitos, plaquetas y linfocitos a través de la prueba de hemólisis, agregación plaquetaria; degranulación de linfocitos y viabilidad en células mononucleares, al estar en contacto con los hidrogeles PEG, multi-arm PEG y PEG-chitosano.
6. Establecer condiciones óptimas para el cultivo celular de la línea de fibroblastos humanos BJ (ATCC-CRL-2522) para la evaluación de la citotoxicidad de los materiales PEG, multi-arm PEG y PEG-chitosano.
7. Evaluar la citotoxicidad a un mismo tiempo de exposición en diferentes masas: 5.4, 10.8, 16.2 y 32.4 mg.
8. Evaluar la citotoxicidad celular a través de la actividad metabólica mitocondrial de células vivas (XTT) que se encuentren en contacto directo con fibroblastos humanos durante 4 diferentes periodos de tiempo: 1, 3, 7 y 10 días con una misma cantidad de masa.

5. Justificación:

Diversas enfermedades y problemas de salud en piel requieren el apoyo de terapias especializadas e individualizadas para su tratamiento exitoso, por ejemplo: quemaduras en piel extensas y úlceras diabéticas, entre otros. El padecer una lesión de piel que provoque un desbalance fisiológico, puede traer consecuencias graves que van desde una amputación hasta la pérdida de la vida. Debido a la alta incidencia de diabetes, los problemas asociados a esta condición son temas prioritarios en materia de salud en nuestro país y mundialmente. Una úlcera diabética, que es una de las consecuencias comunes de la diabetes, tiene una incidencia de 1 a 4% y una prevalencia de 5.3 a 10.5%, sin embargo una vez que se presenta la úlcera diabética, existe el 85% de riesgo de amputación (39). El lograr equivalentes biológicos de la epidermis y dermis se ha convertido en uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos, incluso en el COMECYT (Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología) la ingeniería de tejidos se encuentra dentro de sus áreas prioritarias. Por lo que existe una necesidad de desarrollar diferentes sistemas para la regeneración y reparación de defectos en la piel. Es por ello que la medicina regenerativa tiene un papel fundamental en el desarrollo de nuevos materiales para la elaboración de implantes y para la regeneración de tejidos.

Una vez señalado esto, la importancia de realizar estudios de biocompatibilidad *in vitro*, permanece como paso indispensable para establecer los beneficios y limitaciones de los biomateriales puestos a prueba, en medida de mejorar las fallas y potenciar los aciertos. La finalidad principal es comprobar que los materiales del posible andamio no resultan tóxicos para los componentes celulares con los que los biomateriales estarán en contacto y así mismo servirán para la proliferación del tejido, es decir que se propicie la extensión de los fibroblastos. Siendo así que en un futuro cuando se continúe con el siguiente procedimiento, las pruebas en modelos animales, se realicen con un mayor grado de seguridad, esto con el objetivo de acercarse más eficientemente a la obtención de un sustituto dérmico bioingenierizado para la regeneración de tejido blando. El evaluar la biocompatibilidad en diversos materiales poliméricos permitirá brindar una aportación en el desarrollo de nuevos biomateriales y sistemas, buscando dar solución a los diversos problemas relacionados con la regeneración del tejido cutáneo.

6. Material y Métodos

6.1 Diseño de estudio

Tipo de estudio. Prospectivo, experimental, comparativo, longitudinal.

6.2 Materiales

6.2.1 Equipos

- a) Autoclave, marca Felisa
- b) Balanza analítica Sartorius BP 221S
- c) Centrífuga Sorvall Superspeed, RC2-B Thermo Scientific
- d) Espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum 400 con accesorio ATR Diamond GLADIATR, Pike Technologies.
- e) Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda-Bio
- f) Liofilizadora Hull
- g) Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol JEM 2010 HT
- h) Campana de flujo laminar Veco
- i) Microondas, DAEWO DE, Korea.
- j) Lámpara UV, onda corta, 365 nm, GL-25 UVP, USA.
- k) Espectrofotómetro. Epoch™, BioTek Instruments, USA

6.2.2 Materiales

- a) Vasos de precipitados de 50 mL
- b) Micropipetas automáticas con puntas estériles 10 µL, 200 µL 1000 µL.
- c) Desecador al vacío con sílica gel
- d) Viales de vidrio tipo B de 10 mL, estériles y libres de endotoxinas bacterianas
- e) Membranas millipore de 0.22 µm
- f) Filtros Centricon YM-30, peso molecular 30 000
- g) Molde de teflón con tapa de vidrio (40 mm x 30 mm x 3 mm).
- h) Tubos Vacutainer. Becton Dickinson, San Jose, CA.
- i) Placas de cultivo de 96 pozos. Corning, USA.

6.2.3 Líneas celulares.

- a) Fibroblastos humanos BJ (ATCC-CRL-2522)
- b) Linfocitos de sangre periférica

6.2.4 Reactivos

- a) Ácido N-N'-etilén-diamino-diacético (EDDA), Sigma-Aldrich
- b) Etanol anhidro, Sigma-Aldrich
- c) Diclorometano anhidro, Sigma-Aldrich
- d) Solución salina (NaCl, 0.9 %), Pisa
- e) Medio de cultivo RPMI, Sigma-Aldrich

- f) PEG lineal, MW=4000 g/mol; Polioles, Mexico.
- g) AIBA (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride; Sigma-Aldrich.
- h) Quitosano (poly-1, 4-d-glucosamina; peso molecular medio). Sigma-Aldrich, USA.
- i) Pentaerythritol. Sigma-Aldrich, USA.
- j) Ácido acético. Sigma-Aldrich, USA.
- k) Etanol al 70 %.
- l) Medio de cultivo de soya y caseína. Pharmatest, L-S1022A203, Mexico.
- m) Medio de cultivo sabouraud. Pharmatest S1034A204, Mexico.
- n) Microscopio óptico. Meiji Techno, Japan
- o) Reactivo de Wright. Sigma-Aldrich, USA.
- p) Lymphoprep. Axis-Shield, Norway.
- q) Kit de ensayo de XTT. Sigma-Aldrich, USA.
- r) Medio de cultivo DEMEM. Gibco, USA.
- s) Suero Bovino Fetal. 10% v/v; Gibco, USA.
- t) Penicilina y estreptomina. 50X, Corning USA.

6.3 Procedimientos

6.3.1 Síntesis de hidrogeles 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-chitosano

Se usaron muestras de materiales poliméricos a base de polietilenglicol sintetizadas en la Facultad de Química de la UAEMéx. Los materiales que se sintetizaron y evaluaron son: 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-Chitosano.

Síntesis de hidrogeles de polietilenglicol (PEG).

El polietilenglicol di-acrilato (PEGDA) se obtuvo por síntesis de microondas (DAEWO DE, Corea) del PEG lineal (MW = 4000 g/mol; Polioles, México). Un exceso de anhídrido metacrílico (Sigma-Aldrich, EE.UU.) se mezcló con PEG. La reacción asistida por microondas fue de 6 minutos con una potencia de funcionamiento de 1100 W. Las muestras se secaron aplicando vacío hasta obtener un peso constante (Figura 3). Para la preparación del hidrogel de PEG, se homogeneizaron en agua desionizada los siguientes reactivos: PEGDA (0,1 g/mL) y AIBA (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina); 0,02 g/mL; Sigma-Aldrich, EE.UU.). A continuación, se realizó la polimerización por la luz ultravioleta de onda larga (365 nm; UV lámpara modelo GL-25 UVP, EE.UU.) durante 15 minutos.

Síntesis del hidrogel de polietilenglicol con quitosano o chitosán (PEG-CH)

Se obtuvo mediante el uso de quitosano (poly(β -[1,4]-D-glucosamina; peso molecular medio; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y PEGDA como precursores. El PEGDA se preparó de la misma manera que se ha descrito anteriormente. En primer lugar, una solución de quitosano (1% v/v) en ácido acético (Fermont, México) se mezcló con una solución de PEGDA (0,2 g / mL) y AIBA (0,04 g / mL) en agua desionizada. Estas soluciones se mezclaron en una relación 1:1 molar para obtener la misma concentración de PEGDA, como se describe previamente. Por último, la fotopolimerización se llevó a cabo en las mismas condiciones de hidrogeles de PEG.

Síntesis del hidrogel de polietilenglicol de múltiples brazos (multi-arm PEG)

El precursor de multi-arm PEG se obtuvo por un método de dos pasos. En primer lugar, se hicieron reaccionar pentaeritritol (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y anhídrido acético (Sigma-Aldrich,

EE.UU.) en atmósfera de nitrógeno durante 4 horas a 100° C en una relación molar de 1:4. Posteriormente, el producto obtenido en el paso anterior se mezcló con PEG lineal (relación 1:4, 2 horas, 100° C). Para obtener una muestra seca, el precursor se dejó sometió a alto vacío hasta que se alcanzó un peso constante. A continuación, el precursor se hizo reaccionar con anhídrido metacrílico en las mismas condiciones de PEG lineal, descritos anteriormente. Por último, se llevó a cabo la fotopolimerización (15 min, UV de onda larga) de una solución de multi-arm PEG (0,1 g/ml) y AIBA (0.02 g / mol)

Todos los hidrogeles se obtuvieron en un molde cuadrado (40 mm x 30 mm x 4 mm). A continuación, las muestras se cortaron en discos de 5 mm de diámetro y 4 mm de espesor para su análisis.

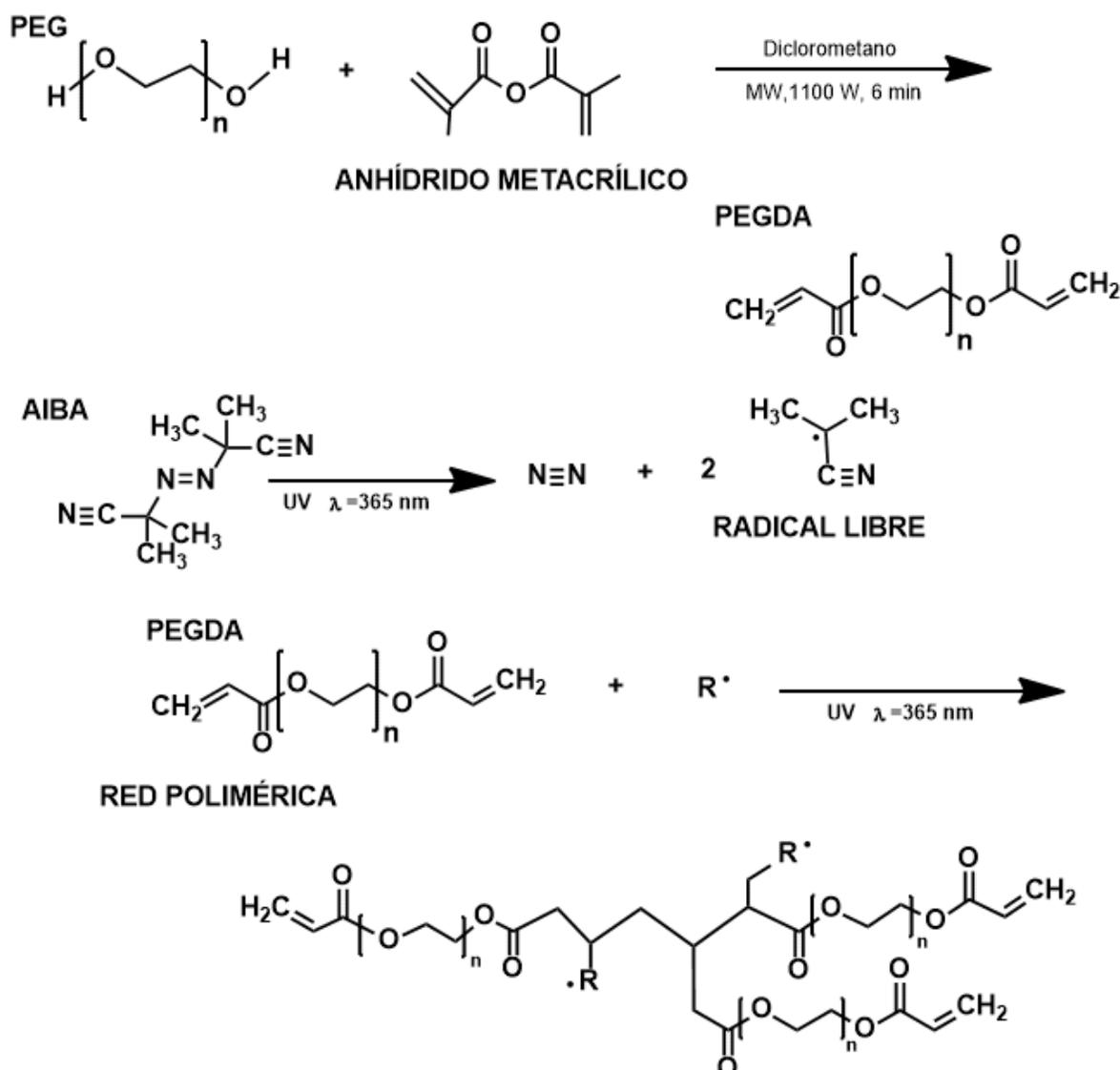


Figura 3. Síntesis de PEGDA y la red polimérica. Síntesis del Poli (etilenglicol) diacrilado (PEGDA) y la generación de la red polimérica con el fotoiniciador AIBA.

6.3.2 Tratamientos para mantener los hidrogeles libres de gérmenes patógenos.

Desinfección de las muestras: etanol al 70%

Los discos de 5 mm de diámetro y 4 mm de cada uno de los hidrogeles (PEG, multi-arm PEG, PEG-Chitosano) se colocaron en alcohol etílico al 70% hasta que el material alcanzó un equilibrio en solución a temperatura ambiente en placas estériles, con cambios de etanol diarios durante una semana. Posteriormente se lavaron en buffer fosfato salino pH 7.4 y finalmente en el medio de cultivo (según el que vaya a ser empleado, RPMI o DMEM), los cambios se realizaron diario y durante una semana por solución. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y en condiciones estériles. El tiempo de esterilización adecuado se determinó en base a los estudios de hinchamiento y caracterización realizados con anterioridad en la facultad de química de la UAEMex.

Esterilización de las muestras por medio de irradiación gamma y por calor húmedo

Cada uno de los discos de los diferentes hidrogeles se colocó en tubos eppendorf y se tapó para evitar contaminación después de la irradiación. Los tubos eppendorf, a su vez se colocaron en una gradilla de plástico y posteriormente en una caja corrugada bien identificada para su transporte al irradiador gamma del ININ. Se solicitó una dosis de 9-18 kGy que se emplea rutinariamente para esterilizar dispositivos médicos. Se esterilizaron un total de 80 discos para cada uno de los materiales.

Los material poliméricos (hidrogeles: PEG, multi-arm PEG, PEG-Chitosano) se sometieron a esterilización por rayos gamma a una dosis de 13.83 ± 0.7 kGy en el irradiador gamma del ININ.

La esterilización por calor húmedo se realizó en la planta de producción de radiofármacos a las condiciones utilizadas de manera rutinaria para dispositivos médicos (121°C, 15 Pa de presión) Este método de esterilización fue descartado toda vez que los materiales poliméricos sufrieron descomposición y alteración en sus características físicas.

Todos los estudios fueron realizados en lotes iguales de hidrogeles y evaluados después de irradiación gamma o desinfección con etanol al 70 % con la finalidad de ser comparados y observar si existe una variación en la biocompatibilidad entre ambos métodos, por alguna variación en su composición química.

6.3.3. Ensayos de hemocompatibilidad

A. Prueba de hemólisis.

El ensayo hemolítico se determinó por medio de los métodos de contacto directo, de acuerdo con la norma ISO 10 993-4 (1992) con los requisitos generales para la evaluación de las interacciones de los dispositivos médicos con sangre, en función de la actividad hemolítica de los hidrogeles. Las muestras de sangre fresca contenidas en tubos vacutainer morados con anticoagulante EDTA se centrifugaron a 3000 rpm durante un minuto, se decantaron y se lavaron con solución salina, se centrifugaron tres veces y se obtuvo la suspensión total de eritrocitos.

1. Posteriormente se realizó una suspensión de eritrocitos al 5%, agregando 1.9 mL de solución salina y 100 μ L de suspensión total de eritrocitos.

2. Previamente se contó con viales que contenían muestra de los biomateriales en condiciones de esterilidad, a estos viales se agregaron 5 mL de solución salina isotónica y posteriormente 0.25 mL de la suspensión de eritrocitos y se agitaron suavemente.
3. Como control positivo y control negativo, se colocaron 5 mL de agua destilada con 0.25 mL de suspensión de eritrocitos al 5%, y 5 mL de solución salina isotónica con 0.25 mL de suspensión de eritrocitos al 5%, respectivamente.
4. Todos los viales se incubaron a 37 °C durante una hora.
5. Posteriormente, se obtuvieron las medidas de absorbancia a 415 nm y su espectro en el rango (200- 600 nm) UV-VIS de las muestras con sus respectivos barridos, en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis v4.002 2L5P026002. Por último, se realizaron los cálculos de porcentaje de hemólisis, utilizando la absorbancia de la muestra y los datos de los controles.

B. Prueba de activación plaquetaria.

Este ensayo se realizó a partir de muestras de sangre de adultos sanos (presentando valores normales de plaquetas, leucocitos y eritrocitos) donadas por pacientes que acudieron a realizarse una prueba de biometría hemática en el laboratorio clínico de CICMED.

1. Las muestras de sangre fresca contenidas en tubos vacutainer morados con anticoagulante EDTA se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 10 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). La separación de los elementos de la sangre se realizó en función de la densidad. La fracción de plasma rico en plaquetas se encontró inmediatamente encima de la serie roja.
2. Posteriormente las muestras de los biomateriales se incubaron con PRP durante 1 hora a 37 °C bajo condiciones estáticas.
3. Transcurrido el tiempo se realizó un frotis de cada tratamiento y sus controles.
4. Se realizó tinción Wright por la técnica estándar, donde se coloca el reactivo de Wright gota a gota cubriendo por completo el cubre objetos con el frotis correspondiente, al instante se termina de cubrir con gotas de agua hasta formar, en la parte superior, una capa metálica, se deja actuar por 15 minutos, se retira el colorante y por último se enjuaga con agua, se limpian y se dejan secar.
5. El porcentaje de activación plaquetaria se realizó en función del número de agregados plaquetarios observados en microscopio.

C. Prueba degranulación de leucocitos y viabilidad en células mononucleares ***❖ Degranulación de leucocitos.***

Este ensayo se realizó a partir de muestras de sangre de adultos sanos (presentando valores normales de plaquetas, leucocitos y eritrocitos) donadas por pacientes que acudieron a realizarse una prueba de biometría hemática en el laboratorio clínico de CICMED.

1. Como paso principal se obtuvieron los leucocitos, esto se realizó identificando la capa Buffy coat (BC) que se refiere a la capa leuco-plaquetaria que se encuentra en la parte inmediata superior a la capa roja y que se obtuvo centrifugando las muestras a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, como se indicó en el procedimiento anterior. Esta capa contiene menos del 1 % del volumen total de la muestra de sangre, por lo que debe manejarse cuidadosamente.

2. Posteriormente las muestras del biomaterial se incubaron con la BC durante 1 hora a 37 °C bajo condiciones estáticas, para permitir el contacto con el material evaluado. Se ha demostrado que los leucocitos tienen una importante respuesta biológica hacia los biomateriales. La respuesta inflamatoria que pueden dirigir es causada por la liberación de marcadores inflamatorios. Los gránulos leucocitarios son liberados en el proceso conocido como degranulación como respuesta a un estímulo inmunológico (16) (30)
3. La tinción de Wright nos permite teñir las células sanguíneas, lo que nos permitió observar dicho proceso por medio de la realización de un frotis de cada tratamiento y sus controles.
4. El porcentaje de degranulación leucocitaria se realizó en función del número de células degranuladas observadas en microscopio.

❖ *Ensayo de viabilidad en células mononucleares*

▪ *Obtención de células mononucleares*

Como paso principal se obtuvieron los leucocitos, esto se realizó mediante el proceso de obtención de células mononucleares por un gradiente de densidades con ayuda del Lymphoprep, este compuesto agrega los eritrocitos, lo que aumenta su velocidad de sedimentación, la sedimentación de los leucocitos se ve afectada sólo ligeramente y se puede recoger de la parte superior. Los pasos llevados a cabo con el Lymphoprep se describen a continuación:

1. Se recogió la sangre en un tubo que contiene anticoagulante (EDTA, heparina, ACD).
2. Se diluyó la sangre en tubos de centrifuga mediante la adición de un volumen igual de 0.9% de NaCl.
3. Cuidadosamente se colocaron 6 mL de la sangre diluida sobre 3 mL Lymphoprep™ (9 mL), evitando la mezcla de la sangre y la separación de líquidos, el tubo debe taparse para evitar la formación de aerosoles.
4. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en un rotor basculante.
5. Después de la centrifugación, las células mononucleares formaron una capa en la parte superior la cual se absorbió con una pipeta estéril. Las células se transfirieron a otro tubo y se agregaron 5 mL de medio de cultivo (RPMI-1640). Por último se sedimentaron las células por centrifugación durante 5 min a 2000 rpm se elimina el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en medio de cultivo. A partir de este momento las células pueden utilizarse ya que son células no adherentes.

▪ *Ensayo de viabilidad en células mononucleares*

1. Se realizó el conteo celular con una cámara de Neubauer y se colocaron en cajas de 96 pozos a una concentración de 150×10^3 células/pozo con 200 µL de medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo fenol. Las células se expusieron a los diferentes tratamientos (n=6) PEG, multi-arm PEG y PEG-chitosano y dos controles (sin hidrogel y con hidrogel de agarosa) para determinar si existe toxicidad celular. Se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad por 48 h.
2. Transcurrido el tiempo y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se colocaron 30 µL de XTT (Sigma Aldrich, USA) a cada uno de los pozos para cada uno de los tratamientos.
3. Se incubaron por 4 h. Finalmente se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro de placas a 450 nm (Epoch™, BioTek Instruments, USA).

4. Se utilizó como blanco un tratamiento de hidrogel (PEG ó PEG-multi arm ó PEG-Chitosan) + medio + XTT sin células para utilizarlo como blanco.

6.3.4 Ensayos de Citocompatibilidad.

A. Cultivo celular de fibroblastos humanos

El cultivo celular utilizado fue la línea celular de fibroblastos humanos BJ (ATCC-CRL-2522). Se utilizó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA) suplementado con suero fetal bovino (10% v/v; Gibco, USA) y antibiótico al 1 % (Penicillin-Streptomycin Solution; 50X, Corning USA). El cultivo se mantuvo a 37 °C, 5% de CO₂ en una atmosfera de 85 % de humedad.

B. Ensayo de citotoxicidad con fibroblastos humanos

Se realizó el ensayo de toxicidad de XTT (2,3-bis (2-metoxi-4 nitro-5 sulfonil) -2 H tetrazolio-5 carboxanilida; 0.1 mg/mL).

1. Para llevar a cabo este ensayo, las muestras de cada tratamiento (n=6): PEG, PEG-multi arm o PEG-CH, previamente esterilizadas o desinfectadas en etOH 70% en equilibrio en medio para el cultivo en células, se mantuvieron a 37°C.
2. Las muestras ser colocaron en platos de cultivo esterilizados y se permitió su adherencia por 24 h, antes de iniciar los tratamientos, se realizó en dos estudios diferentes.

❖ Citotoxicidad basada en masa de hidrogel (Citotoxicidad):

1. Para evaluar el efecto de la masa del hidrogel en la viabilidad celular, se evaluó la actividad metabólica de fibroblastos colocando 4.5×10^4 células/pozo en placas de 48 pozos.
2. Los tratamientos a evaluar fueron 5.4, 10.8, 16.2 y 32.4 mg de hidrogel por pozo y de cada material polimérico.
3. El tiempo de tratamiento fue de 24 h.

❖ Citotoxicidad basada en el tiempo de exposición al hidrogel (Proliferación celular) Proliferación celular:

1. Para evaluar el efecto del tiempo que se encuentra en contacto los hidrogeles con las células, en la viabilidad celular se evaluó la actividad metabólica de las células colocando 1×10^4 células/pozo en lacas de 96 pozos.
2. La viabilidad después de la exposición a los hidrogeles se evaluó a cuatro diferentes tiempos de exposición (1, 3, 7, 10 días) con la misma cantidad de hidrogel, un disco de aproximadamente 5.4 mg.

6.4 Variables de Estudio

Independientes:

Materiales poliméricos: 1) PEG, 2) multi-arm PEG y 3) PEG-CH.

Dependientes:

Viabilidad celular, activación plaquetaria, hemólisis de eritrocitos, degranulación de leucocitos.

Intervinientes:

N/A

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
INDEPENDIENTES					
Hidrogel	Superficies poliméricas con propiedades hidrofílicas, porosas y adheribles.	Según la composición polimérica del hidrogel: Polietilenglicol, Polietilenglicol—quitosano, Polietilenglicol de múltiples brazos	Categoría nominal.	Nominal 1= PEG 2= multi-arm PEG 3=PEG-CH	Prueba de Chi cuadrada (X^2)
DEPENDIENTES					
Viabilidad celular	Porción de células vivas que proliferan en el biomaterial presentando una respuesta favorable al medio que les rodea.	Porcentaje de viabilidad por medición del ensayo de citotoxicidad de MTT, de acuerdo a la cantidad de fibroblastos que proliferan y se extienden en los poros de la muestra. 1: $\geq 80\%$ 0: $\leq 79\%$	Categoría nominal.	Nominal Presenta: 1 Carece: 0	Frecuencias Porcentajes

Activación plaquetaria	Agregación y propagación de plaquetas en contacto con un material externo	Porcentaje de plaquetas que presentan agregación y propagación en contacto con las muestras. 1: $\geq 26\%$ 0: $\leq 25\%$	Categoría nominal.	Nominal Presente: 1 Ausente: 0	Frecuencias Porcentajes
Hemólisis de eritrocitos	Desintegración de los eritrocitos.	Porcentaje de hemólisis eritrocitario de acuerdo a la absorbancia de la muestra y los datos de los controles. 1: $\geq 6\%$ 0: $\leq 5\%$	Categoría nominal.	Nominal Presente: 1 Ausente: 0	Frecuencias Porcentajes
Degranulación de Leucocitos	Liberación de material interno de los leucocitos al medio celular.	Porcentaje de degranulación leucocitaria de acuerdo a la cantidad de leucocitos degranulados en la muestra. 1: $\geq 6\%$ 0: $\leq 5\%$.	Categoría nominal.	Nominal Presente: 1 Ausente: 0	Frecuencias Porcentajes

6.5 Implicaciones Bioéticas.

Todos los estudios que involucran el uso de muestras de humanos donadas, fueron realizados bajo el artículo 323 de la Ley general de Salud sobre el consentimiento expreso de la donación de sangre, la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la clasificación y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos y la declaración de Helsinki (Brasil, 2013). Los métodos utilizados para recoger muestras de sangre humana fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Centro de Investigación en Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM, 2015/15), CONBIOÉTICA: 15EI01720131119.

6.6 Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se capturaron en el paquete estadístico SPSS v22. Las diferencias entre materiales irradiados y desinfectados fueron evaluados por una prueba de t no pareada ($p < 0.05$). Para evaluar la significancia entre los tres tipos de hidrogeles se realizó una prueba de ANOVA con post-hoc de Turkey ($p < 0.05$). Lo mismo se realizará con cada prueba de hemocompatibilidad, todos con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

7. Resultados.

7.1 Anexo de artículo original.

“Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process”.

7.1.1 Página frontal del manuscrito.

Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process.

Alondra Escudero-Castellanos^{1,2,3}, Blanca E. Ocampo-García³, Ma. Victoria Domínguez-García¹, Jaime Flores-Estrada⁴, Miriam V. Flores-Merino^{1}.*

¹Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Centro de Investigación en Ciencias Médicas, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, 50120, Mexico.

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180, Mexico

³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Estado de México, 52750, Mexico

⁴Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180, Mexico,

*CORRESPONDENCE TO:

Miriam V. Flores-Merino, Ph.D.

Laboratorio de Biología Molecular y Celular

Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Universidad Autónoma del Estado de México

Jesús Carranza 200, Toluca, 50120, Mexico.

Tel. + (52) (722)-2128027

Fax. + (52) (55)-53297306

e-mail: mvfloresm@uaemex.mx

7.1.2 Carta de envío.

De: **Journal of Materials Science: Materials in Medicine (JMSM)** (em@editorialmanager.com)

Enviado: lunes, 16 de mayo de 2016 02:48:08 p.m.

Para: lorenishoop@hotmail.com

Re: "Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process."

Full author list: Alondra Escudero-Castellanos; Blanca E. Ocampo-Garcia; Ma. Victoria Dominguez-Garcia; Jaime Flores-Estrada; Miriam Verónica Flores-Merino, BSc, Ph.D.

Dear MSc Escudero-Castellanos,

We have received the submission entitled: "Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process." for possible publication in Journal of Materials Science: Materials in Medicine, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Assistant professor Miriam Verónica 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.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Journal of Materials Science: Materials in Medicine

De: em.jmsm.0.4b37da.61dc5d11@editorialmanager.com

<em.jmsm.0.4b37da.61dc5d11@editorialmanager.com> en nombre de Journal of Materials Science: Materials in Medicine (JMSM) <em@editorialmanager.com>

Enviado: lunes, 16 de mayo de 2016 02:48 p. m.

Para: Miriam Veronica Flores Merino

Asunto: JMSM-D-16-00362 - Submission Confirmation

Submission ID: JMSM-D-16-00362

Dear Assistant professor Flores-Merino,

Thank you for submitting your manuscript, Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process., to Journal of Materials Science: Materials in Medicine.

The submission id is: JMSM-D-16-00362

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://jmsm.edmgr.com/>

7.1.3 Confirmación: JMSM-D-16-00362 - Submission Confirmation

Journal of Materials Science: Materials in Medicine
Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering
application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: Biocompatibility assessment and effect of the sterilization process.	
Article Type:	Original Research	
Corresponding Author:	Miriam Verónica Flores-Merino, BSc, Ph.D. Universidad Autonoma del Estado de Mexico Toluca, Estado de Mexico MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma del Estado de Mexico	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Alondra Escudero-Castellanos	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Alondra Escudero-Castellanos Blanca E. Ocampo-Garcia Ma. Victoria Dominguez-Garcia Jaime Flores-Estrada Miriam Verónica Flores-Merino, BSc, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ-AS-503) Universidad Autónoma del Estado de México (3890)	DR. Blanca E. Ocampo-Garcia Assistant professor Miriam Verónica Flores-Merino
Abstract:	<p>Hydrogels are suitable materials to promote cell proliferation and tissue support because of their hydrophilic nature, porous structure and sticky properties. However, hydrogel synthesis involves the addition of additives that can increase the risk of inducing cytotoxicity. Sterilization is a critical process for hydrogel clinical use as a proper scaffold for tissue engineering. In this study, poly(ethylene glycol) (PEG), poly(ethylene glycol)-chitosan (PEG-CH) and multi-arm PEG hydrogels were synthesized by free radical polymerization and sterilized by gamma irradiation or disinfected using 70% ethanol. The biocompatibility assessment in human fibroblasts and hemocompatibility studies (hemolysis, platelet aggregation, morphology of mononuclear cells and viability) in peripheral blood from healthy volunteers (ex-vivo), were performed. The sterilization or disinfection effect on hydrogel structures was evaluated by FT-IR spectroscopy. Results indicated that hydrogels do not induce any damage to fibroblasts, erythrocytes, platelets or mononuclear cells. Moreover, there was not significant difference in the biocompatibility after the sterilization or disinfection treatment. However, after gamma irradiation, several IR spectroscopic bands were shifted to higher or lower energies with different intensity in all hydrogels. In particular, several bands associated to carboxyl or hydroxyl groups were slightly shifted, possibly associated to scission reactions. The disinfection treatment (70% ethanol) and γ-irradiation at 13.83 ± 0.7 kGy did not induce morphological damages and yielded sterile and biocompatible PEG hydrogels potentially useful for clinical applications.</p>	
Suggested Reviewers:	Juan V Cauch	
	Professor , Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan jvcr@cicy.mx	
	Raúl Montiel-Campos Professor , Universidad Autonoma Metropolitana luar@xanum.uam.mx	
	Georgina Carbajal-Torres Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo gctorre@umich.mx	

7.1.4 Manuscripto.

Abstract

Hydrogels are suitable materials to promote cell proliferation and tissue support because of their hydrophilic nature, porous structure and sticky properties. However, hydrogel synthesis involves the addition of additives that can increase the risk of inducing cytotoxicity. Sterilization is a critical process for hydrogel clinical use as a proper scaffold for tissue engineering. In this study, poly(ethylene glycol) (PEG), poly(ethylene glycol)-chitosan (PEG-CH) and multi-arm PEG hydrogels were synthesized by free radical polymerization and sterilized by gamma irradiation or disinfected using 70% ethanol. The biocompatibility assessment in human fibroblasts and hemocompatibility studies (hemolysis, platelet aggregation, morphology of mononuclear cells and viability) in peripheral blood from healthy volunteers (ex-vivo), were performed. The sterilization or disinfection effect on hydrogel structures was evaluated by FT-IR spectroscopy. Results indicated that hydrogels do not induce any damage to fibroblasts, erythrocytes, platelets or leucocytes. Moreover, there was not significant difference in the biocompatibility after the sterilization or disinfection treatment. However, after gamma irradiation, several IR spectroscopic bands were shifted to higher or lower energies with different intensity in all hydrogels. In particular, several bands associated to carboxyl or hydroxyl groups were slightly shifted, possibly associated to scission reactions. The disinfection treatment (70% ethanol) and γ - irradiation at 13.83 ± 0.7 kGy did not induce morphological and/or chemical damages and yielded sterile and biocompatible PEG hydrogels potentially useful for clinical applications.

Key words: *hydrogels, biocompatibility, sterilization methods*

1. Introduction

The study of the biocompatibility of materials applied to biomedical applications has been a cause of concern for several years. There is still a lack of regulations and uniformity in biological tests for materials that are applied to new medical approaches (*i.e.* organ and tissue engineering)[1]. Hydrogels are polymeric materials widely used in medicine due to their similarity with the biological components of the body [2]. Because of their properties (*i.e.* hydrophilicity, elasticity, etc.), hydrogels are considered biocompatible materials [3]. Several works in literature have reported the synthesis of hydrogels and their biological evaluation through cytotoxic or cell viability tests [2, 4-6]. However, a few studies compare different materials aimed for the same application or methods of sterilization [7]. An important issue is the wide variety of viability assays. On one hand, variables such as exposure time can vary depending on the laboratory. A comparison of sterilization techniques is a step that should be evaluated in order to analyze optimal parameters (*i.e.* cost and efficiency) for their fabrication. Also, the comparison of materials in early research stages could lead to better decision-making in their future application.

Poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogels have been reported for several uses, such as tissue engineering scaffolds and controlled-release devices[8, 9]. However, one of the main limitations is the lack of cell-attachment properties due to their high hydrophilicity. In order to be used as scaffold for organ and tissue engineering applications, the material must provide an optimal niche for cell proliferation and differentiation, focused on cell attachment [10]. Therefore, several physico-chemical modifications are used for this purpose. One of them is to combine PEG with other polymeric materials [4, 11]. In other cases, the use of linkers that can be functionalized with molecules such as growth factors, proteins of the extracellular matrix, among others, are employed [12]. However, the use of other chemical compounds can affect the biocompatibility of the PEG scaffolds.

In this study, three hydrogels based on PEG (PEG, multi-arm PEG, PEG-CH) were compared according to their hemocompatibility and cytotoxic properties. One of the PEG hydrogels was synthesized in combination with chitosan, which has been reported to allow cell attachment and exhibits other interesting properties (*i.e.* antimicrobial)[13]. A second hydrogel was functionalized to create a multi-arm structure, which can be useful to attach molecules with certain cellular activity. Also, they were compared depending on the employed sterilization method: gamma radiation or disinfection by 70 % ethanol.

2. Materials and Methods

2.1. Hydrogel Synthesis

2.1.1. Synthesis of Poly(ethylene glycol) hydrogels

Poly(ethylene glycol) di-acrylate (PEGDA) was obtained by microwave synthesis (DAEWO DE, Korea) of linear PEG ($M_w=4000$ g/mol; Polioles, Mexico). Briefly, an excess of methacrylic anhydride (Sigma-Aldrich, USA) was mixed with PEG. The microwave-assisted reaction required 6 min with an operating power of 1100 watts. Samples were dried under vacuum until a constant weight was achieved before being used. For the preparation of the PEG hydrogel, PEGDA (0.1 g/ml) and AIBA (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride; 0.02 g/ml; Sigma-Aldrich, USA) were homogenized in de-ionized water. Then, polymerization was carried out by long wave UV light (365 nm; UV lamp model GL-25 UVP, USA) for 15 min.

2.1.2. Synthesis of Poly(ethylene glycol)-Chitosan hydrogels

PEG-chitosan hydrogel (PEG-CH) was obtained by using chitosan (poly-1, 4-d-glucosamine; medium molecular weight; Sigma-Aldrich, USA) and PEGDA as precursors. PEGDA was prepared in the same manner as described above. First, a solution of chitosan (1% v/v) in acetic acid (Fermont, Mexico) was prepared and mixed with a solution of PEGDA (0.2 g/ml) and AIBA (0.04 g/mL) in de-ionized water. These solutions were mixed at a 1:1 molar ratio to obtain the same concentration of PEGDA, as previously described above. Finally, photopolymerization was carried out under the same conditions of PEG hydrogels.

2.1.3. Synthesis of multi-arm Poly(ethylene glycol) hydrogels

A multi-arm PEG precursor was obtained by a two-step method. First, pentaerythritol (Sigma-Aldrich, USA) and acetic anhydride (Sigma-Aldrich, USA) were reacted under nitrogen for 4 hours at 100° C in a molar ratio of 1: 4. Second, the product obtained in the previous step was mixed with linear PEG (1:4 ratio, 2 hours, 100° C). To obtain a dried sample, the precursor was left under vacuum until constant weight was reached. Then, the precursor was reacted with methacrylic anhydride under the same conditions of linear PEG, described above. Finally, a photopolymerization (15 min, long wave UV light) of a solution of multi-arm PEG acrylate (0.1 g/ml) and AIBA (0.02 g/mol) was carried out.

All hydrogels were obtained in a square mold (40 mm x 30 mm x 3 mm). Then, the samples were cut into discs of 5 mm diameter and 4 mm thickness for their analysis.

2.2. Sterilization

The following methods were carried out: 1) gamma sterilization (Irradiated Hydrogels, γ -I; 13.83 ± 0.7 kGy), 2) disinfection in 70 % ethanol (Disinfected Hydrogels, D), and 3) steam sterilization (autoclave). These methods were applied to three equal batches (n= 80 discs of hydrogel) of the three polymeric materials, each receiving a single method. The evaluated materials suffered evident morphological degeneration by effect of the high temperature and pressure, so all materials treated under steam sterilization were discarded without further biological or chemical evaluation. For disinfection in 70 % ethanol, hydrogel discs were immersed in a solution of ethanol (70%), and were then washed daily for a week.

2.2.1. Sterility test

Hydrogel samples (γ -I or D) were tested for sterility using the pharmacopoeial method MGA-0581 (FEUM, 2013). Briefly, sterilized or disinfected samples (n=3) were tested by direct inoculation in soybean casein digest broth (Pharmatest, L-S1022A203, Mexico) and fluid Sabouraud medium (Pharmatest S1034A204, Mexico) for culture of microorganisms, and maintained at 37°C for 15 days. Clear broth after incubation time indicated uncontaminated samples and an efficient sterilization procedure. Clouding of the broth after 15 days indicated contamination or an inefficient sterilization process [14].

2.3. Infrared Spectroscopy

The mid-infrared spectra of hydrogel scaffolds were acquired on a Perkin Elmer System spectrometer (Spectrum 400, USA) with an ATR platform (Diamond crystal GLADIATR, Pike Technologies, USA) using attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, from 500 to 4000 cm^{-1} . The materials were dried under vacuum and evaluated after gamma irradiation or disinfection by 70 % ethanol. Along with irradiated or disinfected hydrogels, samples without exposure to ethanol or γ - irradiation were dried under vacuum and analyzed.

2.4. In vitro evaluation

2.4.1. Hemocompatibility

Hydrogels were placed in contact with the components of peripheral blood from healthy volunteers. Blood was collected in Vacutainer heparin tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA). All the studies were carried out with irradiated and disinfected samples in triplicate. Samples were evaluated for hemolysis, platelet aggregation and morphology of mononuclear cells, as described below.

a) Hemolysis

The hemolytic assay was performed according to the standard ISO 10 993–4 and FEUM [6]. Briefly, a disc of each treatment group (n=3) was placed in contact with 5% human red blood cells (RBC). Samples were immediately incubated at 37° C for 1 h along with positive and negative controls. The absorbance was measured at 415 nm in a spectrophotometer (Lambda Bio, Perkin Elmer, USA). The hemolysis percentage was calculated according to equation (1).

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{OD_{test} - OD_{negative}}{OD_{positive} - OD_{negative}} \times 100 \quad (1)$$

Optical density (OD). OD (test) corresponds to the optical density of the test group, OD (negative) corresponds to the isotonic saline control group, and OD (positive) corresponds to the distilled water control group.

b) Platelet aggregation

Hydrogel samples were placed into contact with Platelet Rich Plasma (PRP) and incubated at 37° C for 1 h. The results were analyzed by observing the smears of the PRP in an optical microscope (Meiji Techno, Japan). PRP in contact with the hydrogel scaffolds were compared with the positive and negative controls. The smears were treated with Wright's stain (Sigma-Aldrich, USA).

c) Morphology of mononuclear cells and viability assay

Mononuclear cells were obtained by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield, Norway). Then, cells were grown for 24 h in RPMI-1640 medium (Gibco, USA) under standard cell culture conditions (37° C, 5 % CO₂ and 85 % humidity).

Morphology of mononuclear cells: Mononuclear cells were placed into contact with the hydrogel discs (37° C, 1 h).

The results were analyzed by observing the mononuclear cells in the smears, previously treated with Wright's stain, in an optical microscope (Meiji Techno, Japan). The samples were then compared with the negative controls.

Mononuclear cell viability assay: The metabolic activity of live cells in contact with hydrogels was evaluated using an XTT assay kit (Sigma-Aldrich, USA). Mononuclear cells (1.5×10^5 cells/ well) were seeded in 96-well microtiter plates (Corning, USA) and put in contact with hydrogel samples. Then, cells were incubated for 48 h (37° C, 5 % CO₂). Cell proliferation was measured according to the kit manufacturer's instructions. Briefly, mononuclear cells were incubated

for 4 h with 0.1 mg/mL of XTT solution. The absorbance was read in a spectrophotometer (450 nm; Epoch™, BioTek Instruments, USA).

2.5. In vitro cytotoxicity

2.5.1. Cell culture of human fibroblasts.

The BJ human normal fibroblasts (ATCC-CRL-2522) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, USA), supplemented with fetal bovine serum (10% v/v; Gibco, USA), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/mL; Penicillin-Streptomycin Solution; 50X, Corning USA). Cells were incubated at 37° C with a 5% CO₂ atmosphere and 85 % humidity.

2.5.2. Human fibroblast viability assay

Mitochondrial Dehydrogenase activity in living human fibroblasts was measured by the XTT (2, 3-bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt; 0.1 mg/mL) assay (Sigma-Aldrich, USA).

Cytotoxicity based on hydrogel mass: In order to quantify and evaluate the effect of the hydrogel mass on cell viability, the metabolic activity of fibroblast cells (4.5x10⁴ cell/ well in 48-well plates) was evaluated by the XTT assay. The cells were treated with 5.4, 10.8, 16.2, and 32.4 mg of hydrogel per well for 24 h.

Cell proliferation: Briefly, human fibroblasts were seeded in 96-well microtiter plates (1 x 10⁴ cells/well) and incubated overnight to allow cell attachment. The viability after exposure to hydrogels (D and γ-I) was evaluated at different time exposure (1, 3, 7 and 10 days, 37° C, 5 % CO₂ and 85 % humidity) with one hydrogel disc (5.4 mg).

2.6. Statistical analysis

Data is expressed as mean ± SD of the results of three independent replicas of each assayed condition. Differences between irradiated and disinfected samples were analyzed through the unpaired *t-test* (p<0.05). An ANOVA with a *post-hoc* Turkey test (p<0.05) was used to evaluate significance between the three types of hydrogels (PEG, multi-arm PEG and PEG-CH). Results were analyzed using the SPSS software, version 22.

2.7. Ethical considerations

The authors certify that all research involving human samples was done under full compliance with all government policies and the Helsinki Declaration (2013). The methods used to collect human blood samples were approved by the

Ethics and Research Committee of the Research Center in Medical Sciences at the Autonomous University of the State of Mexico (UAEM, 2015/15).

3. Results and discussions

3.1. Synthesis of hydrogels

The free radical polymerization method was employed to synthesize all hydrogel samples. In all cases, a transparent hydrogel was obtained under similar polymerization conditions. This crosslinking reaction is frequently employed to prepare hydrogels [15]. Specially, radical polymerization of vinyl groups via UV light is usually employed in biomedical applications. In this case, the UV light dissociated the AIBA (initiator) to form free radicals [16]. Then, the free radicals reacted with the double chemical bonds present in the acrylate groups of PEGDA. This classical chemical pathway involves a chain transfer step that can lead to inhomogeneities in the material and therefore changes in their characteristics (*i.e.* average molecular weight between crosslinking)[17]. These inhomogeneities have not been directly linked with the biocompatibility of materials. However, they could have a role in cellular differentiation. For example, the non-idealities can emulate the non-uniform nature of the extracellular matrix [18].

For the multi-arm PEG, further chemical reactions were needed before the photopolymerization process was carried out. For this purpose, an esterification process of pentaerythritol with stannous octoate was carried out to obtain an arm core. Then, it is possible to obtain more hydroxyl groups at each terminal of the arms, after functionalization of the linear PEG. However, these methods involve more steps and the use of other chemical compounds that can be toxic to cells.

3.2. Sterility testing

Both post-manufacture gamma sterilization (γ -I), and disinfection in 70% ethanol (D) rendered sterile scaffolds as evidenced by the pharmacopeial sterility test [19]. The sterility assay demonstrated absence of aerobic and anaerobic microorganisms in thioglycolate medium and absence of fungi microorganisms in fluid Sabouraud medium. Disinfection of polymeric materials in 70% ethanol is often used for *in vitro* cell culture experiments to avoid morphological and/or chemical damages.

3.3. Infrared spectroscopy

The FT-IR spectra of the irradiated, non-irradiated and disinfected hydrogels were analyzed and compared.

The synthesized dried hydrogels without treatment (Fig. 1a) showed characteristic strong vibrational bands at 1060 cm^{-1} assigned to the C-O stretching mode. The C=O stretching mode of ester groups was observed at 1717 cm^{-1} , 1731 cm^{-1} and 1729 cm^{-1} for PEG, multi-arm PEG and PEG-CH, respectively. The bands at 1100 and $\sim 947\text{ cm}^{-1}$ can be assigned to the asymmetrical C–O–C stretching mode. The strong bands at $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$, 1467 cm^{-1} , $\sim 590\text{ cm}^{-1}$ were assigned to CH_2 and a broad band centred at ~ 3500 was a result of OH stretching vibration in the mentioned structures. It has been reported that the band at 1637 and 1627 cm^{-1} represents C=C-H in PEGDA structures [20-24].

The presence of the C=C bond was evident in irradiated materials at 1651 cm^{-1} (PEG), 1657 cm^{-1} (PEG-CH), but at 1655 cm^{-1} it was negligible in multi-arm PEG (Fig. 1c). In the multi-arm PEG, the C=C bond was assigned at 1679 cm^{-1} and 1682 cm^{-1} for disinfected hydrogel (Fig. 1A). It has been reported that a higher level of C=C will increase the hydrogel mechanical stability because of the consequent crosslinks within the matrix [25]; therefore, it can be suggested that irradiated multi-arm PEG can be less stable compared to PEG or PEG-CH γ -irradiated.

As a result of irradiation, several bands were slightly shifted or presented small changes in intensity, mainly in carboxylic and hydroxyl groups. These changes can be attributable to scission reactions induced by gamma irradiation, which results in the random cleavage of bonds [26] (Fig. 1). Since the medium band at 1680 cm^{-1} , observed in multi-arm PEG without treatment and disinfected hydrogel, is weaker in γ -irradiated multi-arm PEG, it can be concluded that the free carboxylic groups suffered esterification after irradiation (Fig. 1A). The bands at 1343 cm^{-1} and 1100 cm^{-1} , assigned to the C-O stretch, do not suffer changes after disinfection or sterilization. The same behaviour was observed in the strong bands at 2882 cm^{-1} , 1467 cm^{-1} , and $528\text{--}529\text{ cm}^{-1}$, assigned to CH_2 .

In PEG-CH, the band at 1656 cm^{-1} was not affected by gamma irradiation; therefore, chitosan could confer some stability to the hydrogel. In disinfected PEG-CH, a primary amine medium band was observed at 3281 cm^{-1} . This band is broad ($3550\text{--}3147\text{ cm}^{-1}$) in γ -irradiated hydrogel or in hydrogel without treatment, which suggests that O-H and N-H forms intermolecular and intramolecular hydrogen bonds through physical association [27].

It has been reported that many polymers are resistant to radiation at doses of up to or around 25 kGy [28]. The dose used in this research allows to keep the structure without important changes. Based on this fact, the sterilization by gamma irradiation and disinfection in ethanol (70 %) can be used to produce sterile scaffolds because they are compatible with the evaluated hydrogels by not inducing an evident damage in their chemical structure.

3.4. Hemocompatibility

3.4.1. Hemolytic assay

For medical devices intended for direct or indirect blood exposure, hemocompatibility studies are required. In this work, the potential of the hydrogels to disrupt red blood cells (RBC) was evaluated by the hemolytic assay. In fact, it has been reported that at a hemolysis percentage less than 5%, the test material is considered highly hemocompatible [29]. The quantitative study demonstrated that all hydrogels are biocompatible because they exhibited less than the 5% of hemolysis in disinfection or sterilization methods (Fig. 2). It was found that the hemolysis was significantly different in RCB treated with *irradiated* and *disinfected* polymeric biomaterials ($p < 0.01$). Also, irradiated and disinfected multi-arm PEG showed the highest percentage of hemolysis compared to the other hydrogel samples. First, the degree of hemolysis of blood cells that were in contact with the disinfected multi-arm PEG hydrogel (D) was $1.72 \pm 0.08\%$. This grade of hemolysis was significantly greater compared to that of PEG ($D = 0.77 \pm 0.01$, $p = 0.007$), but such is not the case for PEG-CH ($D = 1.12 \pm 0.01$, $p = 0.270$). Secondly, it was found that the hemolysis produced by irradiated multi-arm PEG hydrogel (γ -I; 0.41 ± 0.05) was significantly higher than the value of the PEG hydrogel γ -I ($0.03 \pm 0.04\%$, $p < 0.001$) and PEG-CH γ -I (0.25 ± 0.06 , $p < 0.01$) (Fig. 2). This could be due to the additives used in the synthesis process of multi-arm PEG. In contrast, the lowest percentages of hemolysis were observed in the PEG hydrogels (γ -I = 0.03 ± 0.05 and $D = 0.77 \pm 0.01$). In other studies, it has been established that PEG protects against the hemolysis of RBC by mechanical means. PEG is very hydrophilic and produces strong intermolecular interactions, forming dipoles that allow a more natural interaction between blood cells and the biomaterial. The results showed that all materials tested guarantee hemolysis percentage below 5%. Therefore, they can be considered compatible with human RBC according to the ISO regulation for medical devices [20-24, 29-31]. Also, they can be classified as non-hemolytic materials, because they have a hemolysis value less than 2% [32].

3.4.2. Platelet aggregation assay.

Platelet cells in contact with the hydrogel materials displayed very similar morphology compared to the negative control (saline solution). All micrographs (data not shown) showed a rounded morphology of the cells. Agglomerates were not observed in any of the samples containing the hydrogels. These results suggested the absence of platelet activity because of the presence of irradiated and disinfected hydrogel samples. The widely-reported poor cell adhesion of PEG hydrogels [30, 33] is an advantage in this case. Less-adherent platelets indicated a lesser activation of the cells [34], which in the case of biomaterial-cell interactions, can lead to complications such as thrombus

formation. On the other hand, PEG-CH hydrogel scaffolds could allow cell adhesion due to the properties of the chitosan. However, the platelet micrograph in contact with these samples did not show any aggregates of differences compared to the negative control.

3.4.3. Morphology of mononuclear cells and viability assay

Mononuclear cells were analyzed through the observation of buffy-coat smears of the blood samples. The morphology of the cells in contact with the irradiated and disinfected hydrogels was compared to that of the controls. All mononuclear cells showed a normal cellular structure. Moreover, No differences among the PEG, multi-arm PEG and PEG-CH hydrogels were found. In other studies, it has been found that the interaction of poly(ethylene glycol) with mononuclear cells inhibits their activation. Also, it can prevent activation of cytokines of the immune system [35], allowing it to function as an inert compound [36]. Chitosan, in contact with mononuclear cells, has been shown to possess properties of immunomodulation in T lymphocytes and macrophages [36].

The XTT provides the amount of viable cells proportional to the orange formazan produced, and based on the enzymatic activity of live cells. In the XTT viability assay, it was found that mononuclear cells placed in contact with the irradiated (γ -I) and disinfected (D) materials showed cell viability over 80 % at 48 h. After this time, mononuclear cells in contact with PEG hydrogels exhibited a viability of 97.4 ± 5.9 % (D) and 96.8 ± 3.6 % (γ -I). In this study, PEG hydrogels had the higher viability compared to the other two materials. Mononuclear cells in contact with PEG-CH hydrogels showed a viability of 95.7 ± 3.7 % (D) and 98.1 ± 6.3 % (γ -I). Meanwhile, multi-arm PEG hydrogel had the lowest percentage of viable cells, 84.5 ± 2.4 % (D) and 86.1 ± 3.4 % (γ -I), compared to PEG ($p=0.001$) and PEG-CH ($p=0.003$) hydrogels (Fig. 3).

The irradiated (γ -I) and disinfected (D) biomaterials showed similar results (Fig 3). The values between γ -I and D were not significantly different (PEG, $p=0.754$; multi-arm PEG, $p=0.412$; PEG-CH, $p=0.405$). These studies indicated that mononuclear cells are viable in contact with the materials in the studied conditions. Therefore, both gamma irradiation and disinfection by ethanol can be used without affecting mononuclear cell viability or morphology. Undoubtedly, the study of the cell components in the blood indicated that PEG-based biomaterials are hemocompatible as they do not damage erythrocytes, platelets or mononuclear cells.

3.5. *In vitro* cytotoxicity

3.5.1. *Cell cytotoxicity assay based on mass.*

The XTT assay was performed to measure changes in the viability of fibroblast cells after incubation with *D* and γ -I PEG, multi-arm PEG or PEG-CH hydrogels (n=3). In the cell cytotoxicity assay, it was found that all hydrogels exhibited more than 80 % of viability after 24h exposure with 5.4, 10.8, 16.2 and 32.4 mg of each hydrogel (Fig 4); therefore, a suitable cell response to the three types of biomaterial, was found. The lowest cell viability value was $86.3 \pm 3.03\%$ in fibroblasts treated with multi-arm PEG hydrogel (D). The highest cell viability value was $105.5 \pm 0.71\%$, in samples that were in contact with the PEG-CH hydrogel (γ -I) and this result correlates with the good adhesion properties of chitosan, reported previously [13].

The cytotoxicity evaluation based on the hydrogel mass demonstrated that there was not cytotoxicity due to the increase in the biomaterial amount. Irradiated and disinfected PEG and multi-arm PEG hydrogels were not significantly different. However, there were significant differences between the irradiated PEG-CH (10.8, 16.2 and 32.4 mg) and disinfected PEG-CH (10.8, 16.2 and 32.4 mg) hydrogels ($p < 0.001$). The highest fibroblast viability was obtained with irradiated PEG-CH (Figure 4), as in the cell cytotoxicity assay, because of the conferred chitosan properties [4, 30].

In PEG (γ -I), multi-arm PEG (γ -I, D) and PEG-CH (γ -I), cell viability was not significantly different, comparing the minimum amount with the highest hydrogel amount ($p < 0.05$). Figure 4 shows that there were not differences among the distinct hydrogel samples evaluated with 5.4, 10.8, and 16.2 mg. However, the fibroblast viability after exposure with 32.4 mg of irradiated PEG ($103.06 \pm 1.02\%$) was significantly higher ($p < 0.001$) compared to the resulting cell viability with the same amount of irradiated multi-arm PEG (32.4 mg; $93.6 \pm 4.95\%$) or PEG-CH (32.4 mg; $94.9 \pm 4.01\%$). All materials demonstrated viability higher than 80%.

3.5.2. *Cell proliferation assay.*

In the human fibroblast cell line evaluated, polymeric compounds (PEG, multi-arm PEG, and PEG-CH) caused no significant decrease in cell proliferation after 10 days in culture. It was found that the viability was similar in the different polymer compounds. All hydrogels showed viability higher than 80%. These results indicate that no toxicity was induced in the cells by increasing the exposure time (Fig. 5).

The fibroblast viability was not significantly different, comparing the minimum with the highest exposure time ($p < 0.05$). In PEG-CH hydrogel (D and γ -I), a viability higher than 100% (compare to that of the control) was observed at days 7 and 10, attributable to the chitosan properties that stimulate cell growth through the positive charge [4, 30]. Since the hydrogels support fibroblast proliferation, it can be used as a support structure. These results suggest that this material could be helpful in the healing of wounds, for example [29].

It has been reported that high concentration of PEG could reduce the positive charge and decrease cell growth in the material [4]. According to our results, PEG-CH hydrogel has a higher cytocompatibility, and the proliferation in this material could be enhanced testing a higher concentration of chitosan because of the adhesion properties of chitosan and adsorption properties of PEG [30, 35].

These polymers do not have cytotoxic effects according to the method described in the ISO 10933-5:2009 standard (Part 5). It is established that a cytotoxic effect is considered if cell viability decreases more than 30% [37, 38]. In this research, we demonstrate that all biomaterials studied have an excellent biocompatibility. They do not damage cells with different material amounts and, based on the fact that the viability is higher than 80 %, it is possible to suggest that they can be used as a support for tissue regeneration [38], and therefore have the potential to act as scaffolds for tissue engineering applications.

4. Conclusion.

These results are important towards developing a biocompatible scaffold for skin tissue engineering applications, i.e. wound healing dressing. In this work, we have demonstrated that PEG hydrogel, multi-arm PEG and PEG-CH hydrogels can be sterilized without affecting its biocompatibility *in vitro* by gamma irradiation or disinfection with 70 % ethanol in order to produce sterile wound dressing materials. However, other studies need to be performed in order to evaluate the effects over physico-chemical characteristics of the hydrogels when subjected to each of the sterilization processes. Here, we proved that these hydrogels, prepared by a one-molecule photopolymerization system, (with AIBA as initiator) have promising potential for their use in tissue engineering or other biomedical applications. Also, these materials present good biocompatibility *in vitro* (hemocompatibility and cytocompatibility), and therefore can be used as a matrix for the proliferation of cells. Specially, PEG-CH hydrogels could have a potential to support cell growth and proliferation.

Acknowledgments.

The authors gratefully acknowledge financial support from UAEM (grant number: 3890/2015FS) and the ININ-AS-503 project.

Conflicts of interest.

There are no conflicts of interest.

FIGURE CAPTION

Fig. 1 FT-IR spectrum: a) without treatment b) γ -irradiated and c) disinfected hydrogels.

Fig. 2 Direct *in vitro* hemolysis assay based on ISO 10993-4 (1992). Human red blood cells (RBC, 5% in saline solution) were incubated in direct contact with PEG hydrogel samples *D* and γ -I (1 h, 37 °C). The average absorbance of the positive control is considered as 100% hemolysis and the average absorbance of the negative control is considered as 0%. (n=3, *t*-test: p<0.05, anova: p<0.05).

Fig. 3 Mononuclear cell XTT assay. Mononuclear cells obtained from human peripheral blood were incubated in direct contact with irradiated and disinfected PEG hydrogel samples (48 h, 37° C, 5% CO₂). The average absorbance of the positive control is considered as 100% of viable cells. The optical density was read at 450 nm (n=6, *t*-test: p<0.05, anova: p<0.05).

Fig. 4 Cytotoxicity assay. Fibroblasts BJ (ATCC CRL 2522; 4.5x10⁴ cell/ well in 48-well plates) were incubated in direct contact with irradiated and disinfected PEG, multi-arm PEG or PEG-CH hydrogel samples (24 h, 37 °C, 5% CO₂). The cells were treated with A) 5.4, B) 10.8, C) 16.2, or D) 32.4 mg of hydrogel sample per well. The metabolic activity was evaluated by XTT (0.1 mg/mL). The average absorbance of the positive control is considered as 100 % viability. The optical density was read at 450 nm (n=3, *t*-test: p<0.05, anova: p<0.05).

Fig. 5 Cell proliferation assay. Fibroblasts BJ (ATCC CRL 2522; 1 x 10⁴ cells/well, 96- well plates) were incubated in direct contact with irradiated and disinfected A) PEG, B) multi arm-PEG, or C) PEG-CH hydrogels. One hydrogel disc (54 mg) was placed in each well plate and incubated at different exposure times: 1, 3, 7, and 10 days (37° C, 5 % CO₂). XTT (0.1 mg / mL) was used to evaluate cell proliferation. The average absorbance of the positive control is considered as 100% viability. The optical density was read at 450 nm (n=4, *t*-test: p<0.05, anova: p<0.05)

Figure 1

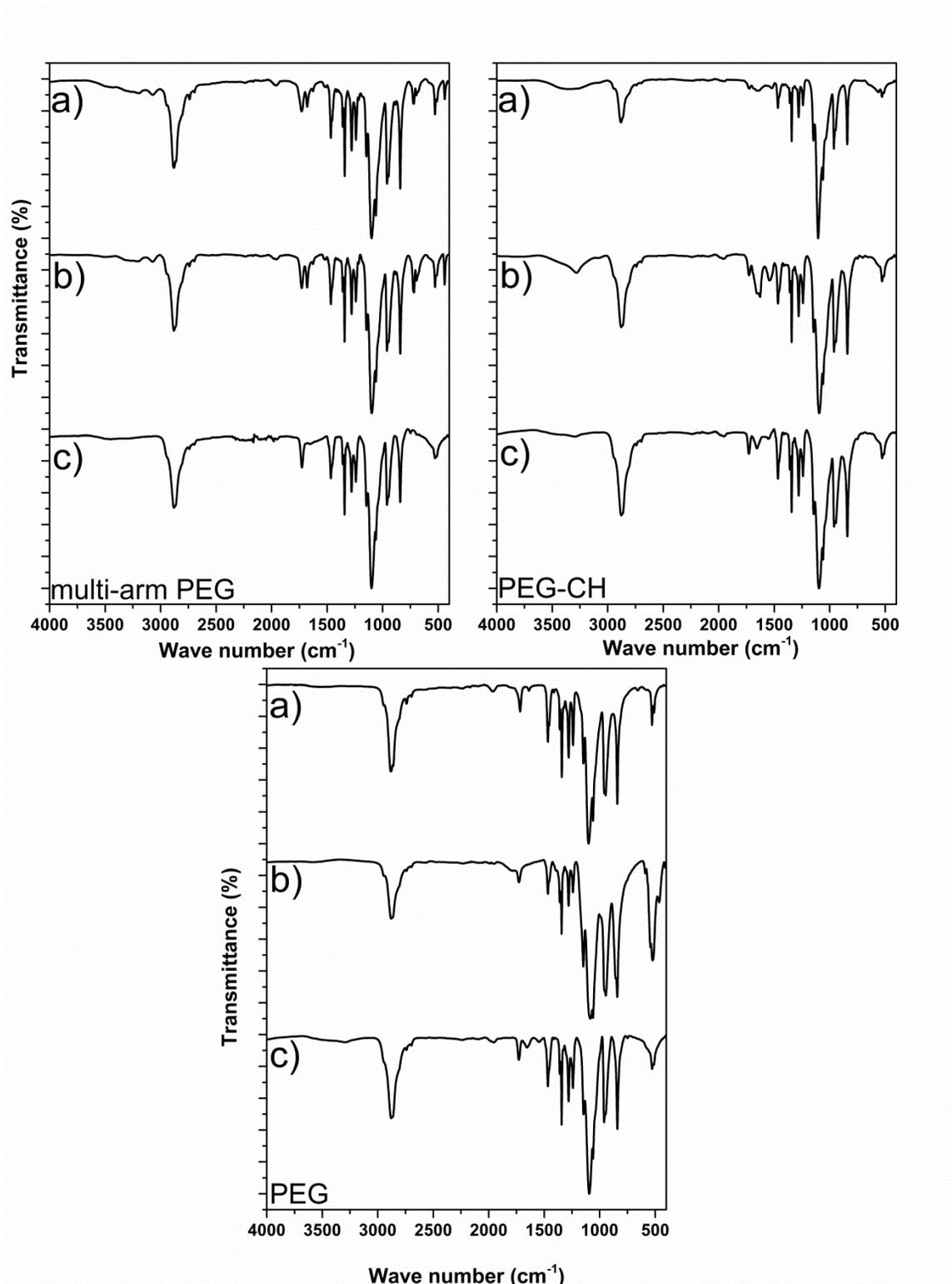


Figure 2

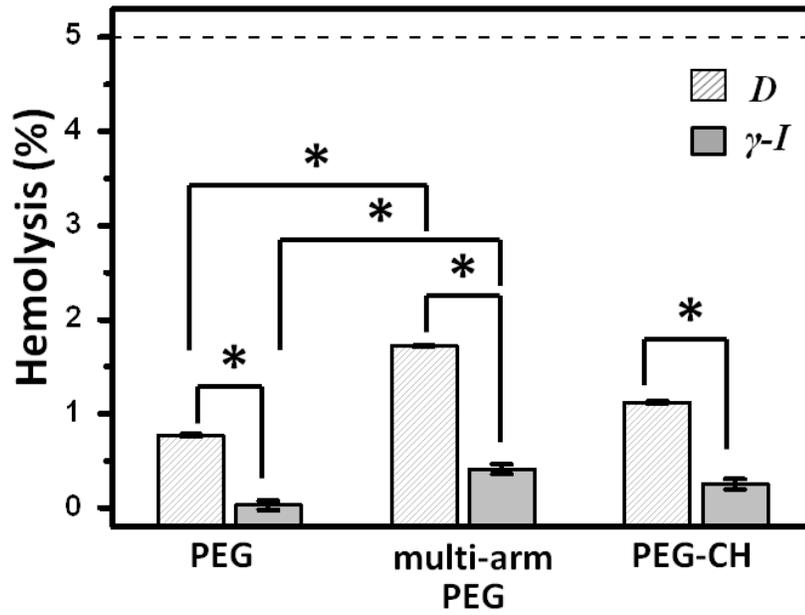


Figure 3

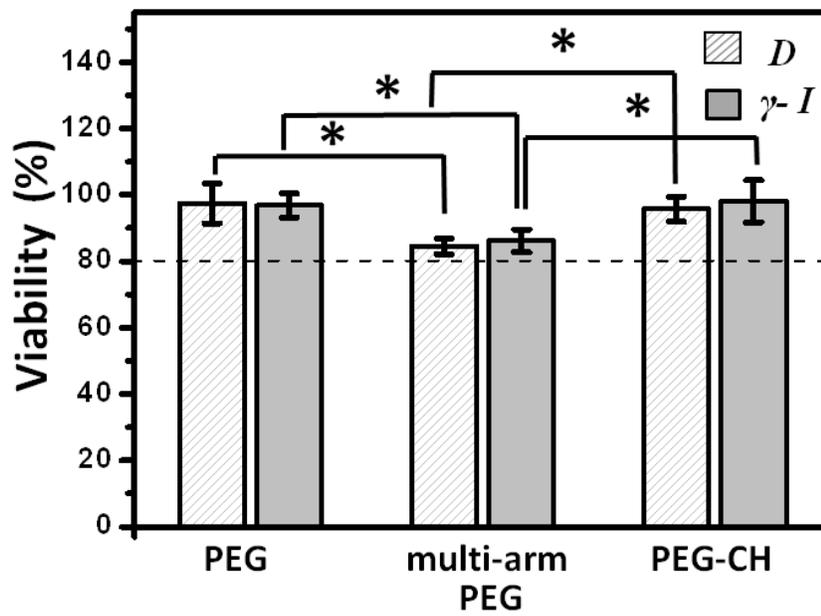


Figure 4

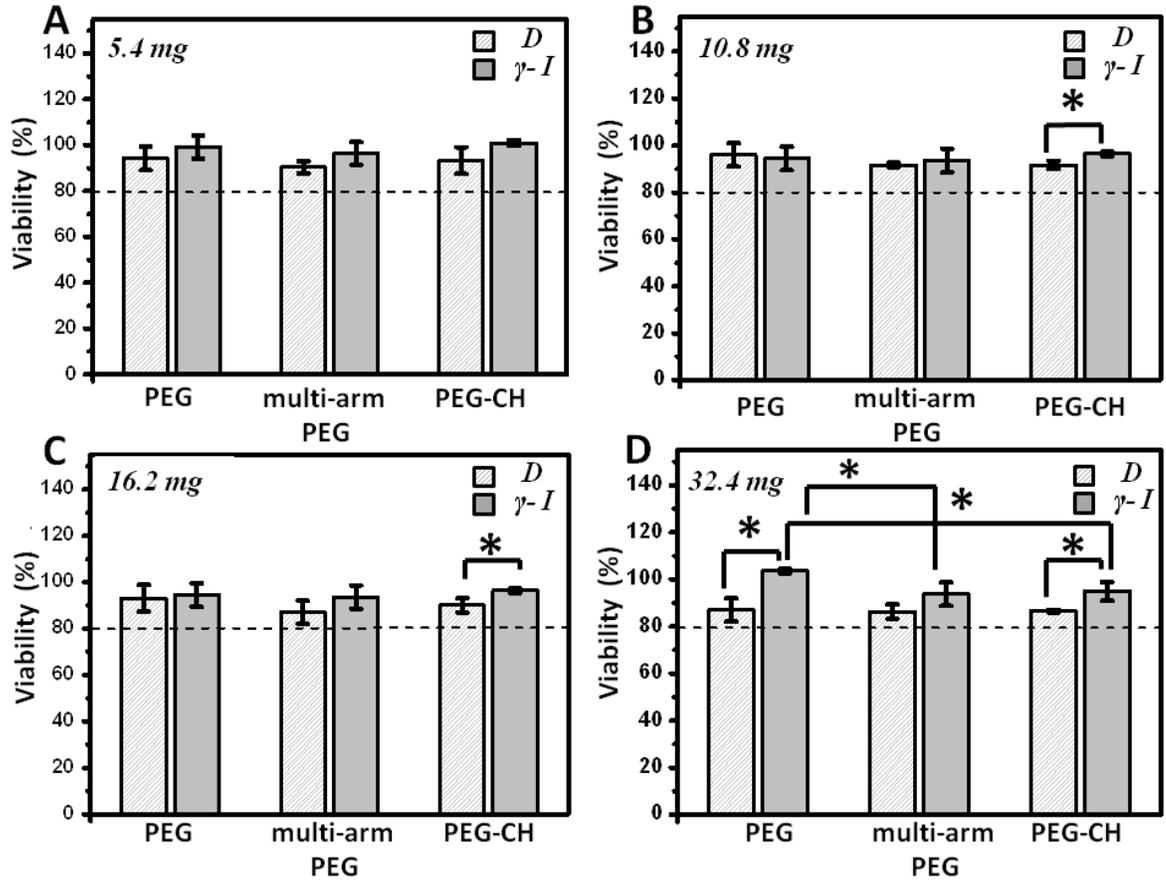
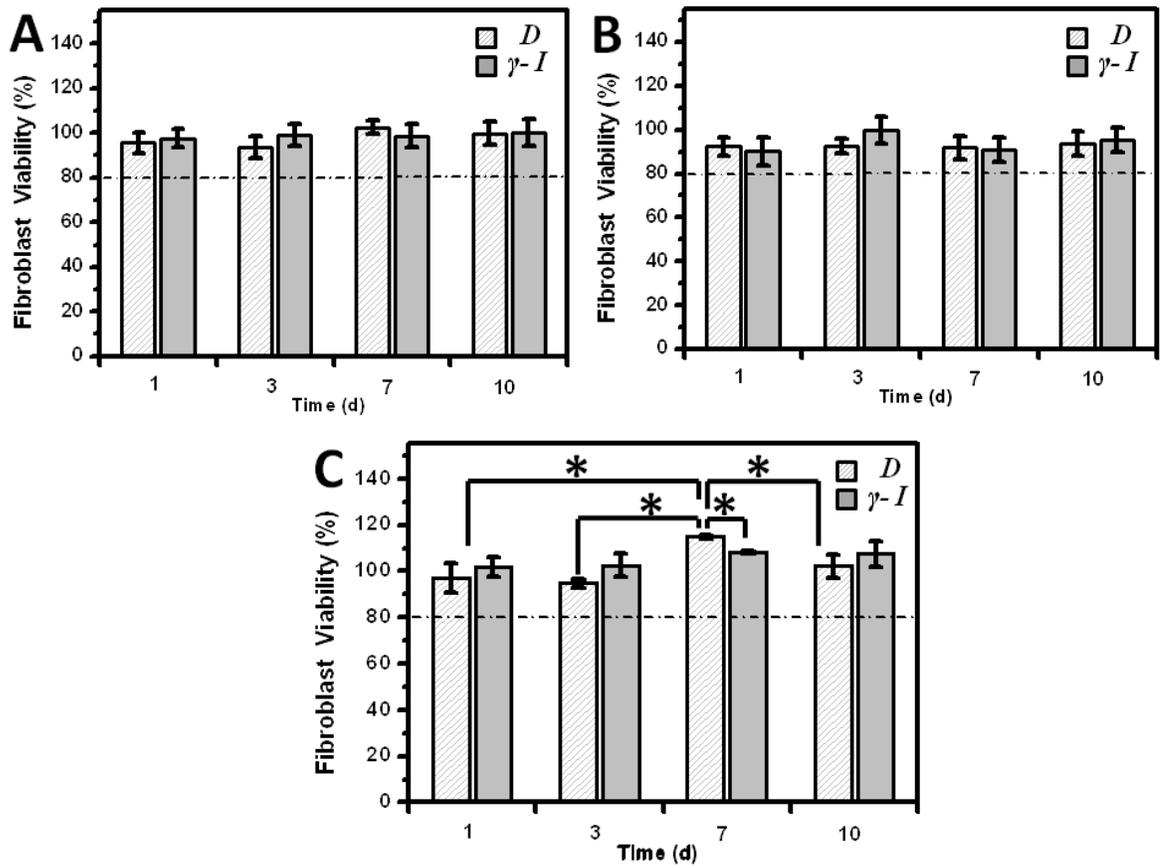


Figure 5



References

- [1] Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomater*. 2013;3:e24717.
- [2] Duffy C, Venturato A, Callanan A, Lilienkampf A, Bradley M. Arrays of 3D double-network hydrogels for the high-throughput discovery of materials with enhanced physical and biological properties. *Acta biomater*. 2015.
- [3] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:18-23.
- [4] Zhang M, Li X, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*. 2002;23:2641-8.
- [5] Franco RA, Min Y-K, Yang H-M, Lee B-T. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. *J Biomater Appl*. 2011;0885328211416527.
- [6] Aziz MA, Cabral JD, Brooks HJ, McConnell MA, Fitzpatrick C, Hanton LR, et al. In vitro biocompatibility and cellular interactions of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103:332-41.
- [7] Tohfafarosh M, Baykal D, Kiel JW, Mansmann K, Kurtz SM. Effects of gamma and e-beam sterilization on the chemical, mechanical and tribological properties of a novel hydrogel. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;53:250-6.
- [8] Zhang X, Xu B, Puperi DS, Yonezawa AL, Wu Y, Tseng H, et al. Integrating valve-inspired design features into poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds for heart valve tissue engineering. *Acta Biomater*. 2015;14:11-21.

- [9] Kar M, Shih Y-RV, Velez DO, Cabrales P, Varghese S. Poly (ethylene glycol) hydrogels with cell cleavable groups for autonomous cell delivery. *Biomaterials*. 2016;77:186-97.
- [10] Zhu J. Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31:4639-56.
- [11] Hamid ZA, Lim K. Evaluation of UV-crosslinked Poly (ethylene glycol) Diacrylate/Poly (dimethylsiloxane) Dimethacrylate Hydrogel: Properties for Tissue Engineering Application. *Procedia Chem*. 2016;19:410-8.
- [12] Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99:623-36.
- [13] Zhang X, Yang D, Nie J. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. *Int J Biol Macromol*. 2008;43:456-62.
- [14] Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;22:25-31.
- [15] Jovančić P, Vilchez A, Molina R. Synthesis of Thermo-Sensitive Hydrogels from Free Radical Copolymerization of NIPAAm with MBA Initiated by Atmospheric Plasma Treatment. *Plasma Process Polym* 2015.
- [16] Yildiz S, Sahiner M, Sahiner N. Ionic liquid hydrogel templates: Bulk gel, cryogel, and microgel to be used for metal nanoparticle preparation and catalysis. *Eur Polymer J*. 2015;70:66-78.
- [17] Li R, Liu N, Li B, Wang Y, Wu G, Ma J. Synthesis and properties of temperature-sensitive and chemically crosslinkable poly (ether-urethane) hydrogel. *Polymer Chem*. 2015;6:3671-84.
- [18] He C, Cheng C, Ji H-F, Shi Z-Q, Ma L, Zhou M, et al. Robust, highly elastic and bioactive heparin-mimetic hydrogels. *Polymer Chem*. 2015;6:7893-901.
- [19] Secretaría de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11^a. ed. Mexico 2014.
- [20] Guo X, Wang W, Wu G, Zhang J, Mao C, Deng Y, et al. Controlled synthesis of hydroxyapatite crystals templated by novel surfactants and their enhanced bioactivity. *New J Chem*. 2011;35:663-71.
- [21] Chieng BW, Ibrahim NA, Yunus WMZW, Hussein MZ. Poly (lactic acid)/poly (ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*. 2013;6:93-104.
- [22] Cao Y, Guan Y, Du J, Luo J, Peng Y, Yip C, et al. Hydrogen-bonded polymer network—poly (ethylene glycol) complexes with shape memory effect. *J Mater Chem*. 2002;12:2957-60.
- [23] Mansur HS, Oréfice RL, Mansur AA. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*. 2004;45:7193-202.
- [24] Lee SY, Zhong X, Valtchev P, Dehghani F. Synthesis of a biodegradable polymer in gas expanded solution: effect of the process on cytocompatibility. *Green Chem*. 2013;15:1280-91.
- [25] Mellott MB, Searcy K, Pishko MV. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly (ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials*. 2001;22:929-41.
- [26] Faucitano A, Buttafava A, Montanari L, Cilurzo F, Conti B, Genta I, et al. Radiation-induced free radical reactions in polymer/drug systems for controlled release: an EPR investigation. *Rad Phys Chem*. 2003;67:61-72.
- [27] Jiang Y, Meng X, Wu Z, Qi X. Modified chitosan thermosensitive hydrogel enables sustained and efficient anti-tumor therapy via intratumoral injection. *Carbohydr Polym*. 2016;144:245-53.
- [28] da Silva Aquino KA. Sterilization by gamma irradiation: INTECH Open Access Publisher; 2012.
- [29] Pal K, Banthia A, Majumdar D. Biomedical evaluation of polyvinyl alcohol–gelatin esterified hydrogel for wound dressing. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:1889-94.
- [30] Ghobril C, Grinstaff M. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. *Chem Soc Rev*. 2015;44:1820-35.
- [31] Dobić SN, Jovašević JS, Vojisavljević MD, Tomić SL. Hemocompatibility and swelling studies of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid-co-poly (ethylene glycol) dimethacrylate) hydrogels. *Hemijaska industrija*. 2011;65:675-85.

- [32] Kumar A, Jaiswal M. Design and in vitro investigation of nanocomposite hydrogel based in situ spray dressing for chronic wounds and synthesis of silver nanoparticles using green chemistry. *J Appl Polym Sci*. 2016;133.
- [33] Balakrishnan B, Kumar D, Yoshida Y, Jayakrishnan A. Chemical modification of poly (vinyl chloride) resin using poly (ethylene glycol) to improve blood compatibility. *Biomaterials*. 2005;26:3495-502.
- [34] Amarnath LP, Srinivas A, Ramamurthi A. In vitro hemocompatibility testing of UV-modified hyaluronan hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27:1416-24.
- [35] Jang JY, Lee DY, Park SJ, Byun Y. Immune reactions of lymphocytes and macrophages against PEG-grafted pancreatic islets. *Biomaterials*. 2004;25:3663-9.
- [36] Farace C, Sánchez-Moreno P, Orecchioni M, Manetti R, Sgarrella F, Asara Y, et al. Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol. *Sci Rep*. 2016;6.
- [37] Naves AF, Motay M, Mérindol R, Davi CP, Felix O, Catalani LH, et al. Layer-by-Layer assembled growth factor reservoirs for steering the response of 3T3-cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;139:79-86.
- [38] Pires F, Ferreira Q, Rodrigues CA, Morgado J, Ferreira FC. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850:1158-68.

7.2 Resultados Adicionales.

7.2.1 HEMOCOMPATIBILIDAD

A. ENSAYO CUALITATIVO DE HEMÓLISIS.

La prueba cualitativa de hemólisis dio un resultado negativo en todas las muestras que estuvieron en contacto con los biomateriales poliméricos (Figura 4). Lo cual demostró que los materiales tienen una actividad hemolítica muy baja. Estos resultados permiten sugerir que estos materiales son altamente compatibles con componentes sanguíneos y son buenos candidatos para ser empleados en andamios que estén en contacto directo con sangre.

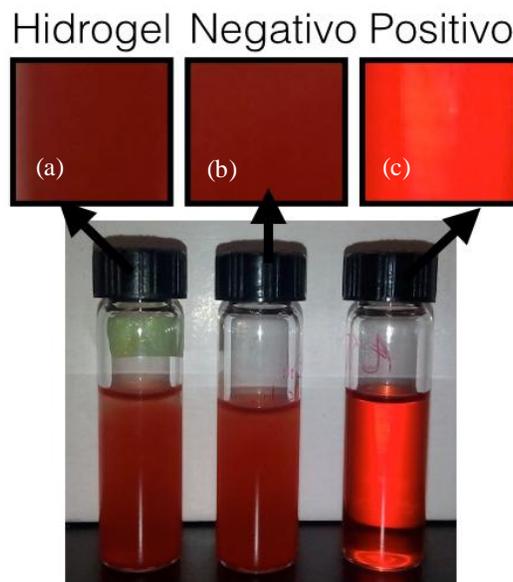


Figura 4. Evaluación cualitativa de hemólisis. Cada tubo contiene solución de eritrocitos al 5% y (a) muestra de hidrogel (PEG, multi-arm PEG ó PEG-CH), (b) solución salina isotónica [control (-)]; (c) agua destilada [control (+)].

B. ENSAYO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA(MICROGRAFÍAS)

En el estudio de agregación plaquetaria, se observa que las muestras de PRP colocadas en contacto con los tres diferentes biomateriales (PEG, multi-arm PEG, PEG-CH), no muestran aglomeraciones de plaquetas, además las células mostraron una morfología similar comparada con el control negativo (Figura 5). Estos resultados demuestran que con el método utilizado los hidrogeles sintetizados no inducen la agregación plaquetaria por lo que los biomateriales son buenos candidatos para utilizarse en andamios que estén en contacto directo con componentes sanguíneos sin favorecer la generación de trombos en un individuo sano.

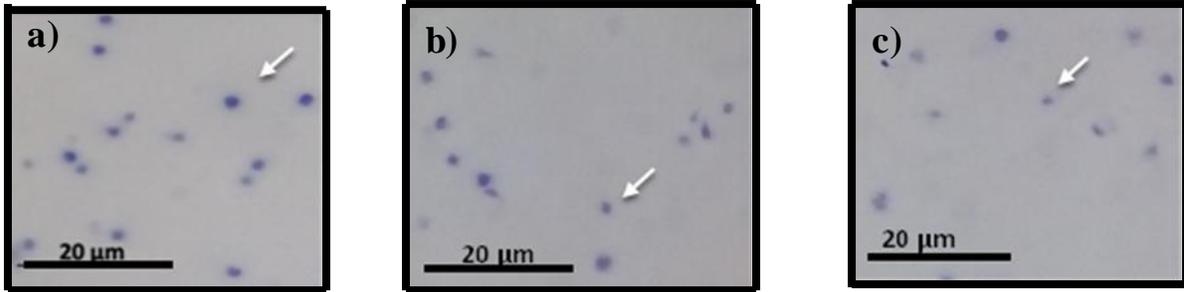


Figura 5. Micrografía de los frotis de plasma rico en plaquetas (PRP) con tinción Wright. Plaquetas en contacto con a) PEG, b) multi-arm PEG y c) PEG-CH, mostrando plaquetas no agregadas y con forma redondeada. Indica ausencia de actividad plaquetaria. Tinción de Wright. Observado a 100 X.

C. DEGRANULACIÓN DE LEUCOCITOS.

En el ensayo, degranulación de leucocitos, se realizaron frotis de la capa leuco-plaquetaria para observar su morfología en contacto con los hidrogeles y compararlos contra los controles. Todos los frotis mostraron linfocitos con una estructura normal, indicando que con este método no se observa reacción inmunológica por parte de los linfocitos en las condiciones evaluadas (Figura 6). Indicando a los biomateriales utilizados (PEG, multi-arm PEG y PEG-CH), como buenos candidatos para estar en contacto directo con componentes sanguíneos, sin causar rechazo inmunológico.

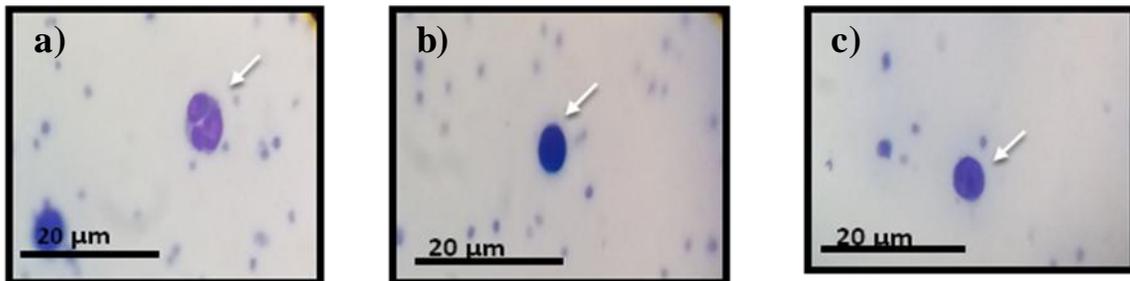


Figura 6. Micrografías de los frotis de la capa leuco-plaquetaria con tinción Wright. Linfocitos humanos en contacto directo con los hidrogeles a) PEG, b) multi-arm PEG y c) PEG-CH, mostrando una estructura normal de los componentes celulares. Tinción de Wright. Observado a 100 X.

7.2.2 CITOCOMPATIBILIDAD.

A. FOTOGRAFÍAS DEL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN FIBROBLASTOS.

Las figuras 7, 8 y 9 muestran el crecimiento de fibroblastos humanos BJ (ATCC-CRL-2522) en contacto con los hidrogeles PEG, multi-arm PEG y PEG-CH respectivamente, a un tiempo de 24 h. Estos resultados demuestran que los fibroblastos crecen a pesar de estar en contacto directo con los tres biomateriales, e incluso se induce un mejor crecimiento en PEG-CH y PEG (Figura 7 y 9), mostrando que estos materiales son muy buenos candidatos para utilizarse en andamios dirigidos a piel. Se observó una contracción de los componentes celulares y un menor crecimiento en los

tratamientos con multi-arm PEG, lo que sugiere que el proceso de síntesis o algún aditivo utilizado puede estar causando una toxicidad celular (Figura 8).

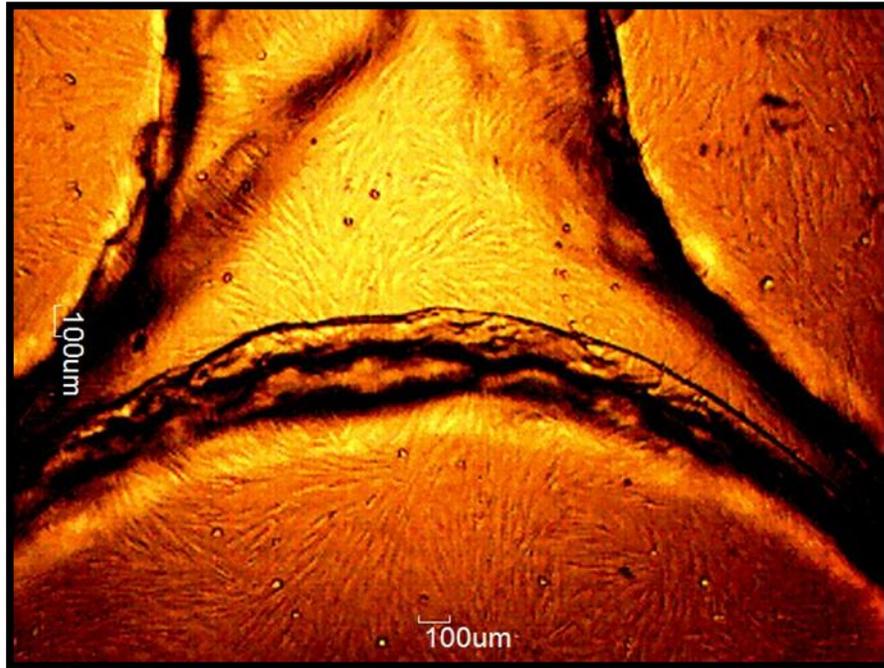


Figura 7. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel PEG. Se observan tres discos de hidrogeles en contacto con las células.



Figura 8. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel multi-arm PEG. Se observan dos discos de hidrogeles en contacto con las células.

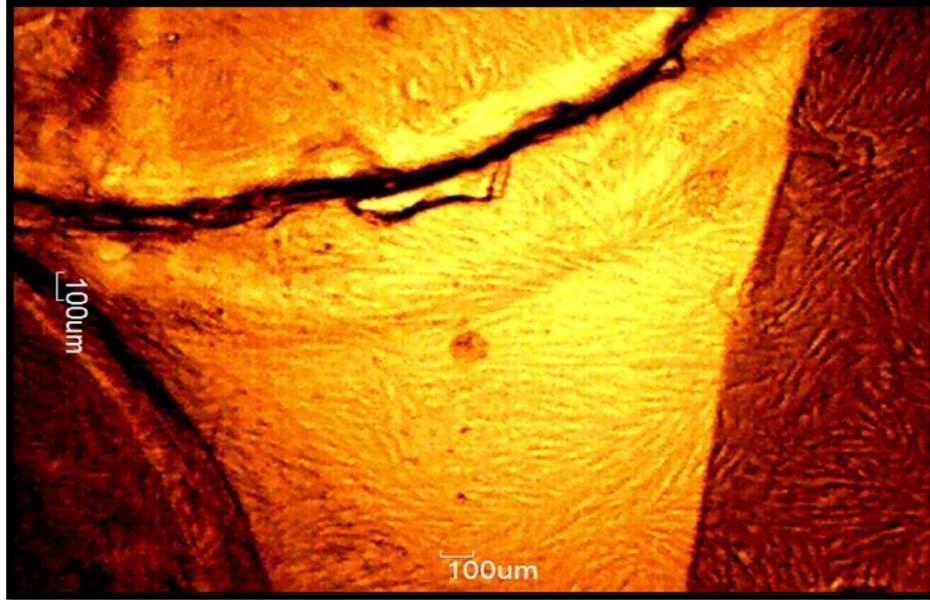


Figura 9. Fibroblastos BJ en contacto con el hidrogel PEG-CH. Se observan tres discos de hidrogeles en contacto con las células.

8. Conclusiones Generales

8.1 Conclusiones

En este trabajo, se ha demostrado que los hidrogeles de *PEG*, *multi-arm PEG* y *PEG-CH* se pueden esterilizar sin afectar su biocompatibilidad *in vitro*, ya sea por irradiación gamma a una dosis de radiación de 13.83 ± 0.7 kGy o por desinfección en etanol al 70% con el fin de producir andamios estériles.

Se demostró que estos hidrogeles, preparados por un sistema de fotopolimerización (con AIBA como iniciador) tienen un potencial prometedor para su uso en la ingeniería de tejidos u otras aplicaciones biomédicas. Ya que estos materiales presentan una buena biocompatibilidad *in vitro* (hemocompatibilidad y citocompatibilidad), y por lo tanto se pueden utilizar como una matriz para la proliferación de las células. Estos polímeros no tienen un efecto citotóxico de acuerdo con el método estándar de la ISO 10933-5: 2009 (Parte 5).

Debido a que no dañan a los fibroblastos con diferentes cantidades de material y en contacto directo a diferentes tiempos se observa que se permite el crecimiento celular, poseen un uso potencial como un soporte para la regeneración de tejidos (viabilidad superior al 80% en todos los biomateriales). Los hidrogeles *PEG*, *multi-arm PEG* y *PEG-CH* poseen un potencial prometedor para ser usados en la ingeniería de tejidos. Especialmente, el hidrogel de PEG-CH, que podrían tener mayor potencial para apoyar el crecimiento y la proliferación celular.

8.2 Limitaciones

Se realizó una contribución en la evaluación de la biocompatibilidad de tres hidrogeles (PEG, multi-arm PEG y PEG-CH). Sin embargo existen otros estudios para evaluar la hemocompatibilidad, específicamente en el ensayo de activación plaquetaria y degranulación de linfocitos, que nos permitan observar datos más específicos. Se pueden realizar pruebas biológicas para medir marcadores, tales como citocinas que nos permitan observar si en efecto no existe una activación de coagulación o del sistema inmune.

De igual forma en la parte de citotoxicidad celular sería adecuado evaluar el contacto sobre el material para observar si el material soporta la proliferación celular, sin embargo se aportan datos preliminares para este fin.

Se observó que el método de esterilización por irradiación gama a dosis baja (13.83 ± 0.7 kGy) permite mantener las propiedades de biocompatibilidad del biomaterial. Sin embargo para recomendar por completo la esterilización por radiación gamma, otros estudios necesitan ser realizados con el fin de evaluar las propiedades reológicas en función del proceso de esterilización.

8.3 Recomendaciones

En primer lugar se podría recomendar que debido a que el hidrogel PEG-CH, demuestra tener mayor potencial para apoyar el crecimiento celular, se podría aumentar la cantidad de quitosano en la síntesis del hidrogel, para observar si existe de esta forma una mejora significativa. Ya que en los experimentos se demuestra una biocompatibilidad mayor sin embargo no muestra una diferencia significativa.

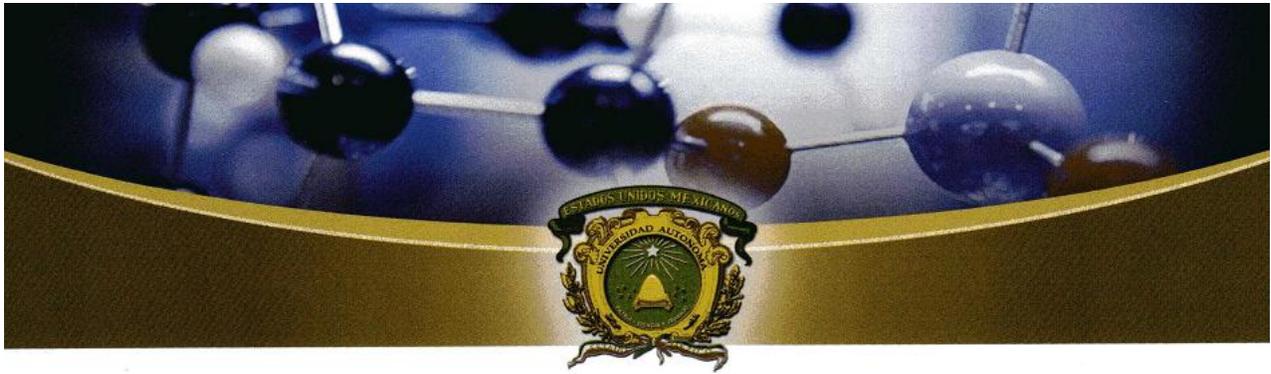
Debido a que una limitación fueron los ensayos de hemocompatibilidad se podría recomendar que en el caso de la activación plaquetaria, podría ser útil realizar otros análisis ya reportados en literatura donde se siembra directamente el PRP sobre los biomateriales y después de la incubación se lava el biomaterial, se fija y se observa en microscopio electrónico de tal forma que se aprecie solamente aquellas células que se adhirieron al biomaterial y en su caso se agreguen sobre el hidrogel, de igual forma evaluar citocinas segregadas por las plaquetas cuando tienden a generar agregaciones. Y en el caso de las células blancas sería conveniente evaluar citocinas expresadas por células blancas de la respuesta inmune primaria (neutrófilos, NK, macrófagos) que nos permitan observar si en efecto no existe una activación del sistema inmune.

Y por último se podría recomendar que debido a que las pruebas *in vitro* de estos hidrogeles se han realizado, se propone continuar con la evaluación *in vivo* y continuar con el desarrollo del andamio, para que sea desarrollado con fines de aplicación lo más pronto posible.

9. Productos de la investigación.

Presentación de trabajo:

Abril 2015	<i>7º Congreso Internacional de Investigación en Salud “Evidencia de Impacto Social”</i>	Presentación de cartel
Junio 2015	<i>V Foro de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa.</i>	Presentación de cartel
Septiembre 2015	<i>27th European Conference on Biomaterials</i>	Presentación de cartel
Mayo 2016	<i>XV Coloquio de Investigación de la Maestría en Ciencias de la Salud.</i>	Presentación oral



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados
Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Otorga la presente

Constancia

ALONDRA ESCUDERO CASTELLANOS, VICTORIA DOMINGUEZ GARCIA, BLANCA ELI OCAMPO
GARCIA, MIRIAM V. FLORES MERINO

Por su participación en la presentación en cartel del trabajo:
**EVALUACIÓN DE LA HEMOCOMPATIBILIDAD IN VITRO DE BIOMATERIALES
POLIMÉRICOS A BASE DE POLIETILENGLICOL**

7° Congreso Internacional de Investigación
en Salud "Evidencia de Impacto Social"
que se llevó a cabo los días 28, 29 y 30 de abril de 2015

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2015, Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón"
Toluca, México, abril de 2015

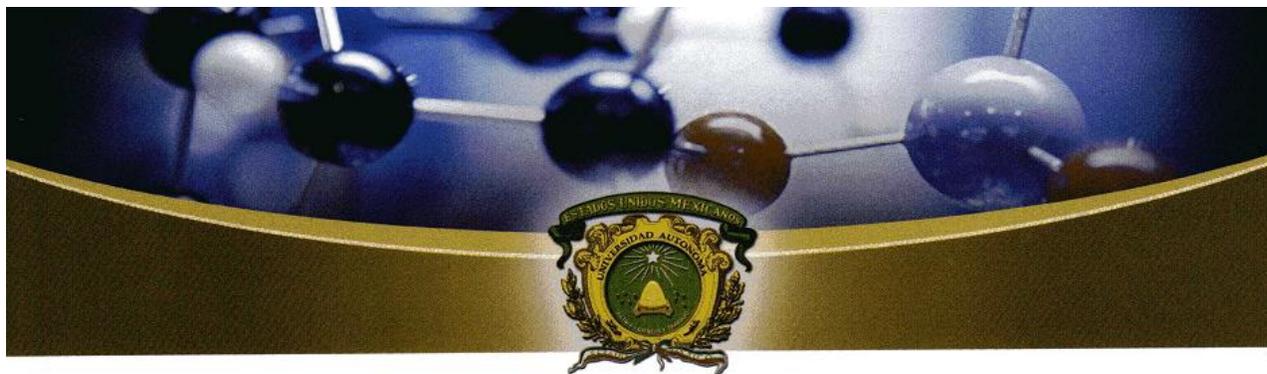


M. en ED. J. Amado López Arriaga
Coordinador



SI EA
Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados





UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados
Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Otorga la presente

Constancia

DE TERCER LUGAR DE TRABAJOS LIBRES A:

ALONDRA ESCUDERO CASTELLANOS, MARÍA VICTORIA DOMÍNGUEZ
GARCÍA, BLANCA ELI OCAMPO GARCÍA, MIRIAM V. FLORES MERINO
Por su participación en la presentación en cartel del trabajo:

**EVALUACIÓN DE LA HEMOCOMPATIBILIDAD IN VITRO DE BIOMATERIALES
POLIMÉRICOS A BASE DE POLIETILENGLICOL**

7º Congreso Internacional de Investigación
en Salud "Evidencia de Impacto Social"
que se llevó a cabo los días 28, 29 y 30 de abril de 2015

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2015, Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón"
Toluca, México, abril de 2015




Centro de Investigación
en Ciencias Médicas
UAEM

M. en ED. J. Amado López Arriaga
Coordinador

SI EA
Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados





UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

LA VERDAD OS HARÁ LIBRES

La Universidad de Guanajuato

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

ALONDRA ESCUDERO-CASTELLANOS, VICTORIA DOMÍNGUEZ-GARCÍA, BLANCA ELÍ
OCAMPO-GARCÍA, MIRIAM V. FLORES-MERINO

Por la presentación del trabajo:

Hemocompatibilidad in vitro de biomateriales poliméricos a base de polietilenglicol para su aplicación potencial en
ingeniería de tejidos

En el V Foro de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa,
llevado a cabo del 25 al 27 de junio de 2015.

Guanajuato, Guanajuato a 27 de junio de 2015

Dr. Birzabith Mendoza Novelo
Presidente del Comité Organizador

Director de la División de Ciencias Naturales Exactas

27th European Conference on Biomaterials



www.esb2015.org

FINAL PROGRAMME AND BOOK OF ABSTRACTS

ESB 2015

30 August–3 September
Kraków, Poland

Address of the Organizing Committee

Polish Society for Biomaterials
 AGH University of Science and Technology
 Faculty of Materials Science and Ceramics
 Department of Biomaterials

Al. Mickiewicza 30
 30-059 Krakow, Poland



© Copyright by the Polish Society for Biomaterials, Kraków 2015

Printed in Poland

ISBN 978-83-63663-63-6



Issue: 1000

Publishing:



Scientific Publishing House „Akapit”, Kraków, Poland
 phone 48 608 024 572; www.akapit.krakow.pl
 e-mail: wn@akapit.krakow.pl

-
- 731** **iPS-Derived Neural Cells in a 3D Collagen Scaffold as a Tool for Investigating Interrelations Between Biomaterials and Nerve Tissue**
Marzena Zychowicz, Jose Luis Gerardo Nava, Krystyna Pietrucha, Hanna Winiarska, Martyna Podobińska, Gary Brook, Leonora Bużańska
Poland
-
- 732** **Carbon Nanofiber Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering**
Anna Magiera, Joanna Konko, Jaroslaw Markowski, Jan Pilch, Elzbieta Menaszek, Marta Blazewicz
Poland
-
- 733** **Collagen and Carboxymethyl Cellulose Bilayers for Skin Tissue Repair**
Cemile Kilic Bektas, Ilgin Kimiz, Aylin Sendemir Urkmez, Vasif Hasirci, Nesrin Hasirci
Turkey
-
- 734** **In vitro Studies of Novel PLDA/Mg Composites Processed by Injection Moulding**
Sandra Cifuentes, Marcela Lieblich, Rosario Benavente, José Luis González-Carrasco
Spain
-
- 735** **Quantification of Cell Migration on Culture Substrates—the Effect of the Surrounding Cells on Direction of Chondrocyte Migration**
Yotaro Nakane, Kumpei Sano, Kenji Isshiki, Akihisa Otaka, Kazuya Takahashi, Katsura Kojima, Yasushi Tamada, Naohide Tomita
Japan
-
- 736** **Quantification of Cell Migration on Culture Substrates—Proposal of New Parameters for Co-Migration**
Hiroataka Nakamura, Kumpei Sano, Akihisa Otaka, Kazuya Takahashi, Yotaro Nakane, Oki Shimizu, Katsura Kojima, Yasushi Tamada, Naohide Tomita
Japan
-
- 737** **Wet Spun Scaffolds of PHA-PLA Blend for Bone Tissue Engineering**
Ayse Selcen Alagoz, Jose Carlos Rodriguez-Cabello, Nesrin Hasirci, Vasif Hasirci
Turkey
-
- 738** **Bone Formation in a Rat Tibial Defect Model Using Carboxymethyl Cellulose/BioC/Bone Morphogenic Protein-2 Hybrid Materials**
Young-Pil Yun, Sang-Heon Song, Hak-Jun Kim, Kyeongsoon Park, Sung Eun Kim, Hae-Ryong Song
Republic of Korea
-
- 739** **Acellular Periodontal Ligament Matrix for Artificial Tooth Implant**
Naoko Nakamura, Tsuyoshi Kimura, Ai Ito, Toshiya Fujisato, Takashi Tsuji, Akio Kishida
Japan
-
- 740** **Extracellular Matrix Hydrogels from CNS and Non-CNS Tissues Developed for Neural Tissue Repair**
Karel Vyborny, Zuzana Koci, Oleg Lunov, Eva Sykova, Sarka Kubinova
Czech Republic
-
- 741** **A Novel Human Plasma-Derived Medium Supplement for Xeno-Free Culture of hMSC**
Ewa Bauman, Cristina C. Barrias, Arantxa Blázquez, José M Diez, Rodrigo Gajardo, Salvador Grancha
Portugal
-
- 742** **In vitro Hemolysis Assay and Platelet Aggregation Test of PEG Hydrogels for Tissue Engineering Applications**
 Alondra Escudero-Castellanos, Jaime Flores-Estrada, Victoria Domínguez-García, Blanca Elí Ocampo-García, Miriam V. Flores-Merino
Mexico
-



***In vitro* hemolysis assay and platelet aggregation test of PEG hydrogels for tissue engineering applications**

Alondra Escudero-Castellanos^{1,2}, Jaime Flores-Estrada³, Victoria Domínguez-García¹, Blanca Elí Ocampo-García⁴,
Miriam V. Flores-Merino¹

¹Research Center in Medical Sciences, Autonomous University of the State of Mexico (UAEM), México, ²School of Medicine, UAEM, Mexico, ³School of Chemistry, UAEM, México

⁴ININ, National Institute of Nuclear Research, México.

[mv.flores.merino@gmail.com](mailto:m.v.flores.merino@gmail.com)

INTRODUCTION

Biocompatibility is an essential characteristic that all biomaterials must have for their use in the field of tissue engineering¹. One type of widely used biomaterials are hydrogels matrices, however their preparation involves mixing of various additives, which increase the risk of inducing cytotoxicity². Hemocompatibility tests are important because they allow to evaluate the potential damage of blood cells due to its exposure to biomaterials³. Therefore, in this study three different hydrogels based on Polyethylene glycol (PEG) were studied.

EXPERIMENTAL METHODS

PEG-chitosan, PEG-arm, and PEG-4000 hydrogels were embedded in blood samples from healthy volunteers. Subsequently, they were evaluated under the following *in vitro* hemocompatibility studies: hemolysis assay and platelet aggregation in blood samples of healthy volunteers, according to ISO 10 993-4 (1992). The authors certify that all research was done under full compliance with the Helsinki Declaration (2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Qualitative evidence of hemolysis was negative in samples that were in contact with the polymeric biomaterials. In the quantitative study it was found that all hydrogels exhibited less than 5% hemolysis. The higher hemolysis value was 1.72% in samples that were in contact with PEG-arm hydrogel (Fig. 1). In the study of platelet aggregation cells displayed a very similar morphology compared with the negative control and agglomerates were not observed (Fig. 2).

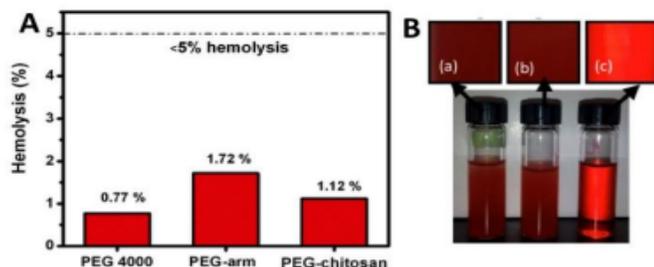


Fig.1. Direct *in vitro* hemolysis assay based on ISO 10993-4 (1992). A) Quantitative evaluation: 5% of human red blood cells (RBC) were incubated in direct contact with PEG hydrogel samples (60 min, 37 °C). The average absorbance of the positive control (+C) is considered as 100% hemolysis and the average absorbance of the negative control (-C) is considered as 0%, for each sample (n=3, *t* test: p<0.05). B) Qualitative assessment. Each tube contains 5% of RBC and (a) PEG hydrogel sample (b) isotonic saline solution (-C) and (c) distilled water (+C).

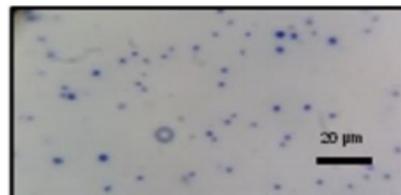


Fig 2. Micrograph of wright-stained platelet rich plasma (PRP) smear. Human platelets were in direct contact with PEG-chitosan hydrogel showing non-aggregated and rounded platelet. It indicates the absence of platelet activity (wright staining)

PEG has the characteristic of reducing cell adhesion⁴, this characteristic make it an excellent biocompatible material. In this study PEG-arm showed the higher percentage of hemolysis in direct contact with blood cells, this could be due to the additives used in the synthesis process. Although, the results showed that all PEG hydrogels guarantee a percentage of hemolysis below five and can be considered compatible with RBC.

CONCLUSIONS

Studies showed that PEG based biomaterials are hemocompatible as they do not damage erythrocytes or platelets in the conditions studied, therefore PEG hydrogels have promising potential for their use in tissue engineering. Finally, it is necessary to expand studies evaluating blood cells in direct contact with PEG hydrogels and generate studies to study leukocyte behaviour in direct contact with PEG biomaterials.

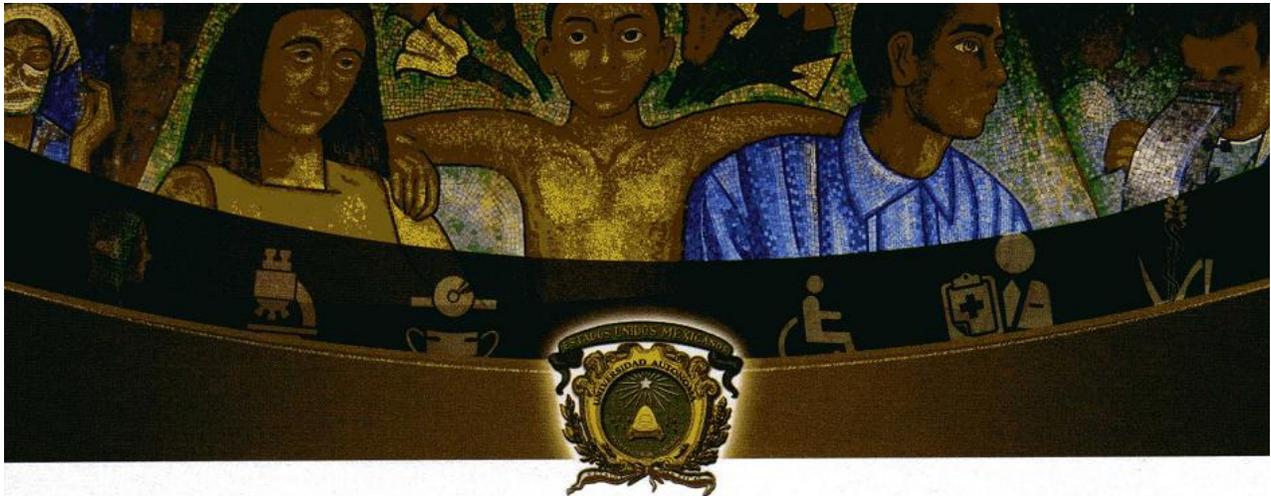
REFERENCES

- Atala A, Lanza R, Thomson J, Nerem R. Principles of Regenerative Medicine. Canada: Academic Press, Elsevier. Canada; 2011
- Franco RA, Min Y, Yang H, Lee B. J Biomater Appl., 27(5): 605-615, 2011
- Motlagh D, Yang J, Lui KY, Webb AR, Ameer GA. Bio materials, 27: 4315 – 4324, 2006
- Balakrishnan B, Kumar DS, Yoshida Y, Jayakrishnan A. Bio materials, 26: 3495–3502, 2005

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the project UAEM 3890/2015FS and CONACYT for providing financial support to this project.





UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México
Facultad de Medicina

Otorga la presente

Constancia

A:

Alondra Escudero Castellanos,
*Miriam Verónica Flores Merino, Ma. Victoria Domínguez
García y Blanca Elí Ocampo García.*

Por haber participado como ponente del trabajo oral, titulado:
**"Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de materiales
poliméricos para la regeneración de tejido cutáneo."**
en el XV Coloquio de Investigación de la Maestría en Ciencias de la Salud, que
tuvo verificativo los días 30 y 31 de mayo del presente año.

Toluca, México; mayo de 2016

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"
"2016, Año de Leopoldo Flores Voldés"


U.A.E.M.
FACULTAD DE MEDICINA
DIRECCIÓN

M. en I.C. Mario Alfredo Jaramillo García
Director de la Facultad de Medicina



0329/2016



10. Referencias Bibliográficas:

1. Atala A, Lanza R, Thomson JA, Nerem R. Principles of regenerative medicine: Academic Press; 2010.
2. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomater*. 2013;3(3):e24717.
3. Williams D. Essential biomaterials science: Cambridge University Press; 2014.
4. Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(2):623-36.
5. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002;295(5557):1014-7.
6. Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds—current status and future directions. *Expert opinion on drug delivery*. 2014;11(5):767-89.
7. Wong T, McGrath J, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*. 2007;156(6):1149-55.
8. General Q. 7ma edición (2002) Raymond Chang Ed. Mc Graw-Hill Interamericana.
9. Jagur-Grodzinski J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polymers for Advanced Technologies*. 2006;17(6):395-418.
10. Kohane DS, Langer R. Polymeric biomaterials in tissue engineering. *Pediatric research*. 2008;63(5):487-91.
11. Piña Barba MC. Biocompatibilidad de materiales. *Revista Mexicana de Física*. 1999(to 1):105-11.
12. Ghobril C, Grinstaff M. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(7):1820-35.
13. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:18-23.
14. Sánchez A, Ballesteros MRS, Vega-Baudrit JR, Rojas M. Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (pleuroncodes planipes) para el crecimiento "in vitro" de fibroblastos humanos. *Revista iberoamericana de Polímeros*. 2007;8(5):347-62.
15. Zhu J. Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(17):4639-56.
16. Sharma CP. Blood-compatible materials: a perspective. *Journal of biomaterials applications*. 2001;15(4):359-81.
17. Kanjickal D, Lopina S, Evancho-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D. Effects of sterilization on poly (ethylene glycol) hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87(3):608-17.
18. Karajanagi SS, Yoganathan R, Mammucari R, Park H, Cox J, Zeitel SM, et al. Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. *Biotechnology and bioengineering*. 2011;108(7):1716-25.
19. da Silva Aquino KA. Sterilization by gamma irradiation: INTECH Open Access Publisher; 2012.
20. Ocampo-García BE. Desarrollo de un radiofármaco específico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con HYNIC-peptido/mannosa para la detección de ganglio centinela en cáncer de mama. Facultad de Medicina-UAEMex. 2012.

21. Hirschmugl CJ, Gough KM. Fourier transform infrared spectrochemical imaging: review of design and applications with a focal plane array and multiple beam synchrotron radiation source. *Applied spectroscopy*. 2012;66(5):475-91.
22. Rhim J-W, Kanmani P. Synthesis and characterization of biopolymer agar mediated gold nanoparticles. *Materials Letters*. 2015;141:114-7.
23. Veloso MN, Santin SP, Benetti C, Pereira TM, Mattor MB, Politano R, et al., editors. Evaluation of ionizing radiation effects in bone tissue by FTIR Spectroscopy and Dynamic Mechanical analysis. *International Nuclear Atlantic Conference-INAC*; 2013.
24. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Microbiology*. 1991;137(1):69-79.
25. Sundaram J, Park B, Hinton Jr A, Yoon SC, Windham WR, Lawrence KC. Classification and structural analysis of live and dead *Salmonella* cells using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and principal Component Analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(4):991-1004.
26. Franco RA, Min Y-K, Yang H-M, Lee B-T. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. *Journal of biomaterials applications*. 2011;0885328211416527.
27. Keong LC, Halim AS. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(3):1300-13.
28. Decker EM. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Letters in applied microbiology*. 2001;33(3):188-92.
29. Li X, Kong X, Zhang Z, Nan K, Li L, Wang X, et al. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N, O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application. *International journal of biological macromolecules*. 2012;50(5):1299-305.
30. Motlagh D, Yang J, Lui KY, Webb AR, Ameer GA. Hemocompatibility evaluation of poly (glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(24):4315-24.
31. Zhang X, Xu B, Puperi DS, Yonezawa AL, Wu Y, Tseng H, et al. Integrating valve-inspired design features into poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds for heart valve tissue engineering. *Acta Biomater*. 2015;14:11-21.
32. Kar M, Shih Y-RV, Velez DO, Cabrales P, Varghese S. Poly (ethylene glycol) hydrogels with cell cleavable groups for autonomous cell delivery. *Biomaterials*. 2016;77:186-97.
33. Zhang M, Li X, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*. 2002;23(13):2641-8.
34. Balakrishnan B, Kumar D, Yoshida Y, Jayakrishnan A. Chemical modification of poly (vinyl chloride) resin using poly (ethylene glycol) to improve blood compatibility. *Biomaterials*. 2005;26(17):3495-502.
35. Zhang X, Yang D, Nie J. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. *International journal of biological macromolecules*. 2008;43(5):456-62.
36. Kim J, Kong YP, Niedzielski SM, Singh RK, Putnam AJ, Shikanov A. Characterization of the crosslinking kinetics of multi-arm poly (ethylene glycol) hydrogels formed via Michael-type addition. *Soft matter*. 2016.
37. Tohfafarosh M, Baykal D, Kiel JW, Mansmann K, Kurtz SM. Effects of gamma and e-beam sterilization on the chemical, mechanical and tribological properties of a novel hydrogel. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;53:250-6.

38. Gibbs S, Van Den Hoogenband H, Kirtschig G, Richters C, Spiekstra S, Breetveld M, et al. Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds. *British Journal of Dermatology*. 2006;155(2):267-74.
39. Castro G, Liceaga G, Arrijoja A, Calleja JM, Espejel A, Flores J, et al. Guía clínica basada en evidencia para el manejo del pie diabético. *Medicina Interna de México*. 2009;25(6):483-526.

11. Anexos:

11.1 Anexo 1 - REGISTRO DE PROTOCOLO DE TESIS



CONSTANCIA

Registro de Protocolo de Tesis

Toluca, México, a 22 de enero de 2015

Número de Registro. MACSSD-0715

Nombre del Programa Académico: Maestría en Ciencias de la Salud

Tema de Tesis de Grado: Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de materiales poliméricos para la regeneración de tejido cutáneo

Nombre del Alumno: Escudero Castellanos Alondra

No. de cuenta: 0724823

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. Miriam Verónica Flores Merino

Tutores Adjuntos: Dra. Victoria Domínguez García
Dra. Blanca Elí Ocampo García



DIRECCION DE
ESTUDIOS AVANZADOS

DRA. CARMEN ÁLVAREZ LOBATO
DIRECTORA DE ESTUDIOS AVANZADOS

SEEA



11.2 Anexo 2 - APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DEL CICMED. REGISTRO CONBIOÉTICA: 15EI01720131119.



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Toluca, Estado de México, a 13 de noviembre de 2015.

**BIOL. ALONDRA ESCUDERO CASTELLANOS
P R E S E N T E**

Por este conducto se les comunica que el Comité de Investigación y Ética del CICMED en la sesión del día 5 de agosto del año en curso, **acordó aprobar** el protocolo de investigación, que tiene como título:

Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de materiales poliméricos para la regeneración de tejido cutáneo

Ya que cumplen con los aspectos bioéticos y metodológicos acorde a la investigación científica, quedando registrada con el número **2015/15**. Dicha investigación se desarrollará bajo su responsabilidad, con el compromiso de hacer llegar un informe a éste Comité al concluirla. Registro CONBIOÉTICA 15CEI01720131119.

A T E N T A M E N T E

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2015, Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón"

**Comité de Investigación y Ética
Centro de Investigación en Ciencias Médicas**

Dra. Marcela Veytia López

Dra. Laura Patricia Montenegro Morales

Dra. María del Socorro Camarillo Romero

[Firma]
M. en Ed. J. Amado López Arriaga
Presidente del Comité

c.c.p. Archivo.



[Firma]
[Firma]
**CICMED
UAEM**



www.uaemex.mx

Av. Jesús Carranza No. 205, Col. Universidad, Toluca, Méx. C. P. 50130

Tels. (01 722) 212 80 27 y 219 41 22



11.3 Anexo 3 -

UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE MUESTRAS DE SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

Título del protocolo: Evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* de materiales poliméricos para la regeneración de tejido cutáneo

Investigador Responsable: Dra. Miriam Verónica Flores Merino y Biól. Alondra Escudero Castellanos

Sede donde se realizará el estudio: Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de la muestra de sangre, con el fin de utilizarla en la investigación relacionada con el estudio de materiales biomédicos para regeneración de piel. El objetivo de este estudio es utilizar la muestra de su sangre para separar los componentes celulares y ponerlos en contacto con muestras de materiales poliméricos biomédicos para evaluar si son compatibles.

Usted como donante puede donar su muestra para que sea utilizada en investigación. La finalidad de la donación es dotar a los investigadores de sangre para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre la regeneración de piel, para disponer en un futuro de mejores herramientas predictivas y terapéuticas.

PROCEDIMIENTO

Si decide donar la muestra biológica para nuestra investigación, inmediatamente tras la extracción de la misma se asignará un código alfanumérico que será el único identificador de la muestra; siempre y cuando cumpla con los parámetros requeridos: niveles óptimos de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, de lo contrario serán desechadas y se informará al donador para que sea recibida una asesoría. El procedimiento para la obtención de las muestras no implica ninguna otra intervención, aparte de la propia extracción de sangre a la que usted será sometido para el respectivo estudio. Una vez otorgado su consentimiento y obtenida la muestra habrá concluido su participación en el proyecto de investigación y no se le exigirá que dedique ningún tiempo extra al mismo.

La donación de esta muestra es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de revocación, su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte del archivo. Su decisión, sea cual fuere, no comportará penalización alguna, ni afectará en ningún modo a los cuidados médicos y a la asistencia que usted pueda necesitar en el futuro.





RIESGOS

Los tipos de muestra donados serán de la sangre periférica que se le toma para el estudio de biometría hemática: su obtención es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual.

BENEFICIOS

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que Ud. no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información que se obtenga al analizar las muestras que nos ha donado, así como toda la información clínica referente a usted, será considerada confidencial y tratada en consecuencia. Para garantizar el anonimato de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el momento mismo de la extracción con un código. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por alguna persona autorizada del equipo investigador, adoptándose medidas estrictas para que tal información no esté disponible más que para este personal autorizado, que en ningún caso podrá develar su identidad a terceros. Así, podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras biológicas será confidencial.

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.

Yo,
Sr./Sra.....de.....
.....años de edad.
(Nombre y dos apellidos del paciente)

Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el Consentimiento que ahora presto. Por ello, manifiesto que me considero satisfecho/a con la información recibida.

Firma	Fecha
-------	-------

Este documento debe ser remitido a:
CICMED –Jefa del Laboratorio de Biología Molecular. Ph. D. Miriam Verónica Flores Merino
Toluca, Edo. de México - México.



11.4 Anexo 4 - CERTIFICADO DE IRRADIACIÓN DE LOS HIDROGELES.





instituto nacional de investigaciones nucleares
 Departamento del Irradiador Gamma


Certificado de Irradiación No. IR2015005237


Fecha de emisión: 22-10-2015

Se certifica que el lote descrito a continuación fue procesado con rayos gamma de Cobalto-60 con fecha 21-10-2015, del intervalo de dosis solicitado (9 a 18 kGy), se obtienen los siguientes resultados:

Dosis Mínima: 13.12 kGy Dosis Máxima: 13.23 kGy




Datos del cliente

Empresa: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES **Clave:** 02612
Dirección: CARRETERA MEXICO-TOLUCA S/N LA MARQUESA OCOYOACAC
Responsable: EDILBERTO GARZA VIELMA **Teléfono:** 53 29 72 52

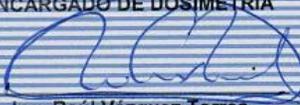
Producto:
 1.- 1 CAJAS OVEROL Y MATERIAL POLIMERICOS

Lote:
 1.- SIN LOTE


 22 OCT 2015
 Depto. del Irradiador
 GAMMA

Nº de Contenedores empleados: 1
Dosímetros de Perspex Rojo 4034 Lote: MX

Nota: El presente certificado únicamente es válido para la cantidad, producto, lote descritos y fecha que fueron procesados en el Irradiador Industrial JS-6500 del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

ENCARGADO DE DOSIMETRÍA

 Ing. Raúl Vázquez Torres






Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, México, C.P. 52750
 Tel. Conmutador: 5329-7200 ext. 14293 Tel. Directo / Fax: 5329-7305
 e-mail: raul.vazquez@inin.gob.mx URL: http://www.inin.gob.mx

Este documento no será válido si presenta enmendaduras, borraduras o anotaciones que alteren sus datos originales.
 Esta prohibida la reproducción total o parcial sin autorización del ININ.

FP-IG(D)-2/6/1