



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

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

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

MsC. IBETH MAYERLY GAITÁN TOLOSA

Comité Tutorial:

Ph D. MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO

Tutor Académico

Dra. en C. MA. VICTORIA DOMÍNGUEZ GARCÍA

Tutor Interno

Ph D. Eng. CARLOS A. GARCÍA GONZÁLEZ

Tutor Externo



ÍNDICE

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

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

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

Introducción

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

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

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

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

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

1. Antecedentes

1.1. Ingeniería de tejidos y biomateriales

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

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

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

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

12.7 Abreviaturas

AINE: Antiinflamatorio No Esteroidal

CICMED: Centro de Investigación en Ciencias Médicas

DMSO: Dimetil sulfoxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSC: Calorimetria diferencial de barrido

EE: Eficiencia de encapsulamiento

FDA: Food and Drug Administration

H: Hinchamiento

ININ: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Ket: Ketoprofeno

mM: Milimolar

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

PEG-QUITOSANO: Polietilenglicol-QUITOSANO

PEG: Polietilenglicol

PEGDA: Polietilenglicol diacrilado

RPSI: Red polimérica semi-interpenetrada

RTFI: Infrarrojo por transformada de Fourier

SAXS: Dispersión de rayos-X de ángulo pequeño

SEM: Microscopia electrónica de barrido

TEM: Transmisión electrónica

UV-Vis: Ultravioleta Visible