



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

**DIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA**

# **SÍNTESIS DE UN HIDROGEL BIOCOMPATIBLE CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y  
Bioinformática

**Brian Ignacio Rivas Tiznado**

**Noviembre 2021**

**Tutor: Dr. Jorge Toledo**  
**Laboratorio de Biotecnología y**  
**Biofármacos**  
**Departamento de Fisiopatología**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Co-Tutor: Dr. Seidy Pedroso**  
**Laboratorio de Biotecnología y**  
**Biofármacos**  
**Departamento de Fisiopatología**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional.

A mi tutor Dr. Jorge Toledo por su tiempo, enseñanzas y paciencia, además de confiar en mi al permitirme desarrollar todas las ideas que propuse.; y a mi cotutor Seidy por su cooperación y apoyo en este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos por su siempre buena disposición, en especial a la señora Nancy por recibirme siempre en el laboratorio con una sonrisa; y a todos los amigos que hice en el laboratorio, por aportar con risas y momentos de distensión.

Al personal de facultad de ciencias biológicas, en especial a la Tía Marce que desde pregrado siempre me ha entregado cariño, y Paula Veloso por su siempre buena disposición para resolver dudas.

A la Dra. Eimmy Ramírez y futuro doctor Claudio Sandoval de LABTRES, por siempre estar dispuestos a analizar mis muestras y ofrecerme cafecito con galletas cuando iba; y al Dr. Abel Vásquez del ISP, por haberme ofrecido un espacio en su laboratorio de Santiago, cuando acá las restricciones por la pandemia no permitían avanzar.

A los profesores del magíster en Bioquímica y Bioinformática, por todas sus enseñanzas, en especial a la Dra. Violeta Morin, que fue mi primera tutora; y al Dr. Fernando Sepúlveda por sus consejos de vida.

A mis amigos de toda la vida, por estar siempre ahí, en especial a la ahora Dra. Rayén León, que desde Nueva Zelanda me daba consejos para enfrentar mi tesis; Pili y Gio por escucharme cuando las dudas me quitaban el sueño; y Majo, por darme el coraje para salir de mi zona de confort.

Y finalmente a mis compañeros del magíster, por aquellas juntas de “estudio” y entretenidas conversaciones que hicieron esta etapa mucho más amena.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN. ....	11
1.1 La piel humana.....	11
1.1.1 Epidermis.....	12
1.1.2 Dermis. ....	13
1.1.3 Hipodermis o tejido subcutáneo. ....	14
1.2 Regeneración epitelial.....	14
1.2.1 Coagulación. ....	15
1.2.2 Inflamación.....	16
1.2.3 Proliferación. ....	17
1.2.4 Maduración.....	17
1.3 Problemas en la regeneración epitelial. ....	18
1.3.1 Diabetes y úlceras crónicas.....	18
1.3.2 Quemaduras.....	20
1.4 Ingeniería de Tejidos.....	22
1.4.1 Hidrogeles en la ingeniería de tejidos. ....	23
1.4.2 Quitosano. ....	26
1.4.3 Almidón. ....	26
1.4.4 CuNPs como compuestos bioactivos. ....	27
2. HIPÓTESIS. ....	30
3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	31
3.1 OBJETIVO GENERAL. ....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	32

4.1 MATERIALES .....	32
4.1.1 Material biológico. ....	32
4.1.2 Reactivos.....	33
4.1.3 Equipos e instrumentos.....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento físico por método de <i>freeze-thawing</i> .....	34
4.2.2 Síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento químico con glutaraldehído. ....	35
4.2.3 Caracterización de los grupos funcionales de los hidrogeles mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.....	37
4.2.4 Caracterización de la estructura macro y microscópica de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido con detección de energía dispersiva. .	37
4.2.5 Evaluación de capacidad de hinchamiento de los hidrogeles. ....	38
4.2.6 Incorporación de nanopartículas de cobre y detección por microscopía electrónica de barrido/ transmisión acoplada con detector de energía dispersiva de rayos x.....	38
4.2.7 Evaluación <i>in vitro</i> de citotoxicidad del hidrogel en células HEP-2.....	39
4.2.8 Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad regenerativa de la matriz polimérica en un modelo animal murino. ....	39
5. RESULTADOS.....	42
5.1 Hidrogeles obtenidos por <i>freeze-thawing</i> .....	42
5.2 Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico con glutaraldehído. ...	42
5.3 Caracterización de grupos funcionales por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.....	43
5.4 Evaluación de la morfología de los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido.....	44
5.4 Capacidad de hinchamiento del hidrogel. ....	46

5.5 Resultados de la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad citotóxica del hidrogel en células HEP-2 mediante ensayo de viabilidad celular.....	49
5.6 Incorporación de CuNPs en los hidrogeles. ....	50
5.7 Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad regenerativa de los hidrogeles en un modelo animal de ratón. ....	53
6. DISCUSIÓN .....	55
6.1 Estructura, estabilidad y capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por método de <i>freeze-thawing</i> .....	55
6.2 Estructura, estabilidad y capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico.....	56
6.3 Biocompatibilidad de los hidrogeles. ....	58
6.4 Efecto de los hidrogeles en la regeneración del tejido. ....	59
7. CONCLUSIONES.....	62
8. PROYECCIONES.....	63
9. BIBLIOGRAFÍA. ....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de las capas primarias de la piel y sus componentes.....	11
<b>Figura 2</b>	Esquema de la composición y estratos de la epidermis.....	12
<b>Figura 3</b>	Esquema de las cuatro etapas del proceso de regeneración epitelial.....	15
<b>Figura 4</b>	Comparación del proceso de cicatrización.....	19
<b>Figura 5</b>	Esquema de la clasificación de heridas.....	21
<b>Figura 6</b>	Esquema del diseño de un apósito para heridas ideal.....	23
<b>Figura 7</b>	Estructura molecular del quitosano y almidón.....	27
<b>Figura 8</b>	Hidrogeles obtenidos por <i>freeze-thawing</i> .....	42
<b>Figura 9</b>	Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico.....	43
<b>Figura 10</b>	Espectros FT-IR de hidrogeles por <i>freeze-thawing</i> .....	43
<b>Figura 11</b>	Espectros FT-IR de hidrogeles por entrecruzamiento químico.....	44
<b>Figura 12</b>	Imágenes SEM de hidrogeles obtenidos por <i>freeze-thawing</i> ....	45
<b>Figura 13</b>	Imágenes SEM de hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico.....	46
<b>Figura 14</b>	Capacidad de hinchamiento de hidrogeles sintetizados por <i>freeze-thawing</i> .....	47
<b>Figura 15</b>	Capacidad de hinchamiento de hidrogeles sintetizados por <i>entrecruzamiento químico</i> .....	48
<b>Figura 16</b>	Comparación capacidad de hinchamiento.....	48
<b>Figura 17</b>	Resultados del ensayo de viabilidad celular.....	49
<b>Figura 18</b>	Análisis SEM-EDX de hidrogel 4 con CuNPs.....	50
<b>Figura 19</b>	Análisis SEM-EDX de hidrogel 5 con CuNPs.....	51
<b>Figura 20</b>	Análisis TEM-EDX de hidrogeles con CuNPs.....	52
<b>Figura 21</b>	Imágenes del proceso de cicatrización de las heridas de los ratones.....	53
<b>Figura 22</b>	Comparación del tamaño de las heridas de los ratones.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Lista de hidrogeles con aplicaciones biomédicas comercialmente disponibles.....	25
<b>Tabla 2</b>	Lista de reactivos utilizados.....	33
<b>Tabla 3</b>	Composición hidrogeles por <i>freeze-thawing</i> .....	34
<b>Tabla 4</b>	Composición hidrogeles por entrecruzamiento químico.....	36
<b>Tabla 5</b>	Cuantificación de resultados del análisis SEM-EDX del hidrogel 4.....	51
<b>Tabla 6</b>	Cuantificación de resultados del análisis SEM-EDX del hidrogel 5.....	52



## **ABREVIATURAS**

<b>CK</b>	Citocinas
<b>CuNPs</b>	Nanopartículas de cobre
<b>EDX</b>	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos x
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento endotelial
<b>FGF- <math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento de fibroblastos beta
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento de insulina 1
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PVA</b>	Polivinil alcohol
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>MTT</b>	Sal de tetrazolio
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Factor transformador de crecimiento beta
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor transformador de crecimiento alfa
<b>TIMPs</b>	Metaloproteinasas inhibidoras del tejido
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial

## RESUMEN

La cicatrización es un proceso que consta de cuatro etapas, coagulación, inflamación, proliferación y maduración. Lamentablemente, a diferencia de otros animales, nuestra regeneración de tejidos es más limitada. Las heridas más profundas o por quemaduras graves son propensas a ser infectadas por microorganismos oportunistas, empeorando el diagnóstico de los pacientes. La ingeniería de tejidos es un campo que busca desarrollar nuevos materiales que prevengan estas infecciones y aceleren el proceso de cicatrización. Los hidrogeles de polímeros biocompatibles como el quitosano y el almidón han sido propuestos como candidatos para este tipo de materiales. Bajo este contexto, en el presente trabajo se sintetizaron prototipos de hidrogeles biocompatibles, compuestos de quitosano y almidón, con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos como apósito para heridas. Los hidrogeles se sintetizaron utilizando un método que combina un entrecruzamiento químico con uno físico. Posteriormente, fueron caracterizados mediante espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se midió el porcentaje de hinchamiento de cada hidrogel y se descartaron aquellos cuya estructura no resistió el proceso. A continuación, se evaluó la biocompatibilidad de los hidrogeles, mediante un ensayo de viabilidad utilizando células humanas HEP-2. Se eligieron los hidrogeles con mejores porcentajes de viabilidad celular y se les incorporaron nanopartículas de cobre (CuNPs) con el objetivo de aportar propiedades antimicrobianas al hidrogel. La incorporación de CuNPs se corroboró mediante análisis de rayos X con energía dispersiva (EDX) y TEM. Finalmente, se estudió la capacidad regeneradora de los hidrogeles en modelos murinos. Para esto, se trabajó con tres grupos de ratones CF-1 a los que se les hizo una herida en el lomo, donde dos grupos fueron tratados con hidrogeles y uno con gasa (grupo control). Los ratones tratados con hidrogeles cicatrizaron significativamente más rápido que el grupo control, demostrando así que los hidrogeles sintetizados tienen potencial para ser aplicados en la ingeniería de tejidos como apósitos de heridas.

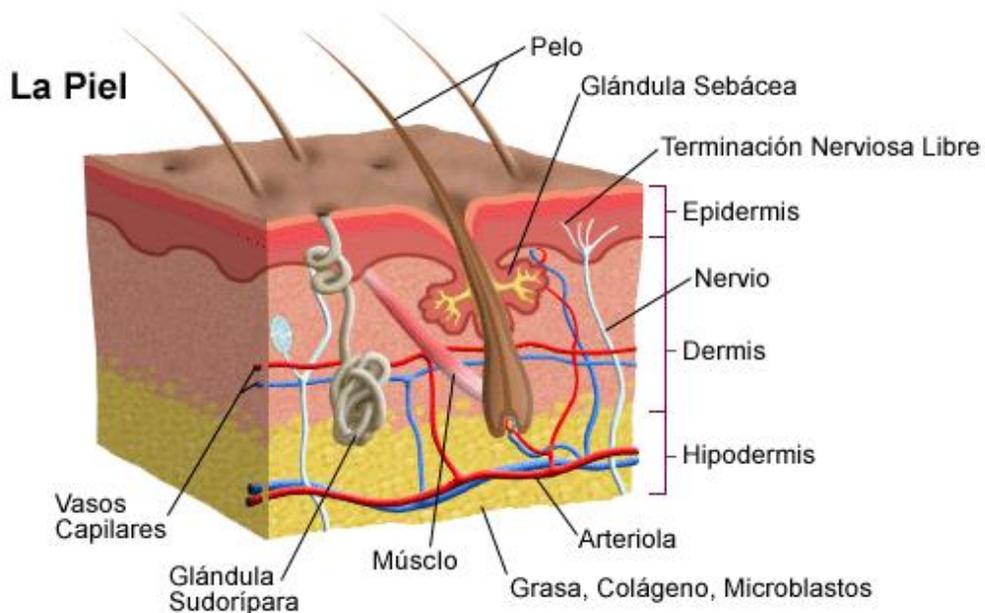
## **ABSTRACT**

Wound healing is a four stages process: Blood clot, inflammation, proliferation, and wound remodeling. Unfortunately, compared to other animals, our tissue regeneration capability is limited. Complex wounds such as a deep cut or burned skin are more susceptible to be infected by opportunist microorganisms, worsening the patient's diagnosis. Tissue engineering is a field that aims to develop new materials that can prevent these infections and thus accelerate the wound healing process. Hydrogels made of biocompatible polymers such as Chitosan and Starch have been proposed as candidates for this kind of materials. In this context, this work describes different biocompatible hydrogels prototypes made of Chitosan and Starch with potential use as wound dressings in tissue engineering. The hydrogels were synthesized using a mix of physical and chemical crosslinking methods. Then, they were characterized by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning-electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The swelling ratio percentage of each hydrogel was assessed and those whose structure did not resist the process were discarded. Subsequently, the hydrogels biocompatibility was studied with an MTT viability assay using HEP-2 cells. The hydrogels with the best cell viability results were selected and filled with copper nanoparticles with the objective of grant them antimicrobial properties. The incorporation of copper nanoparticles was confirmed by Energy Dispersive X-Ray (EDX) and TEM. Lastly, the wound healing properties of the hydrogels were studied in mice. For this, three groups of previously wounded mice were used. The wounds of two groups of mice were treated with hydrogels while the control group was treated with gauze. The wound healing process of the hydrogels-treated groups was significantly faster than the control group, thus proving the hydrogel's potential use as wound dressing in tissue engineering.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 La piel humana.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, representando aproximadamente un 15% del peso corporal. Este órgano cumple funciones fundamentales en diferentes procesos como la hidratación, síntesis de vitamina D, regulación termal y actúa como una barrera protectora contra agentes químicos y patógenos (Kanitakis, 2002; Ludriksone y col., 2014). Asimismo, a través del contacto de la piel, las personas pueden obtener información de su entorno, ya sea reconociendo la textura de un objeto o percibiendo variaciones en la temperatura ambiental (Dąbrowska y col, 2018).



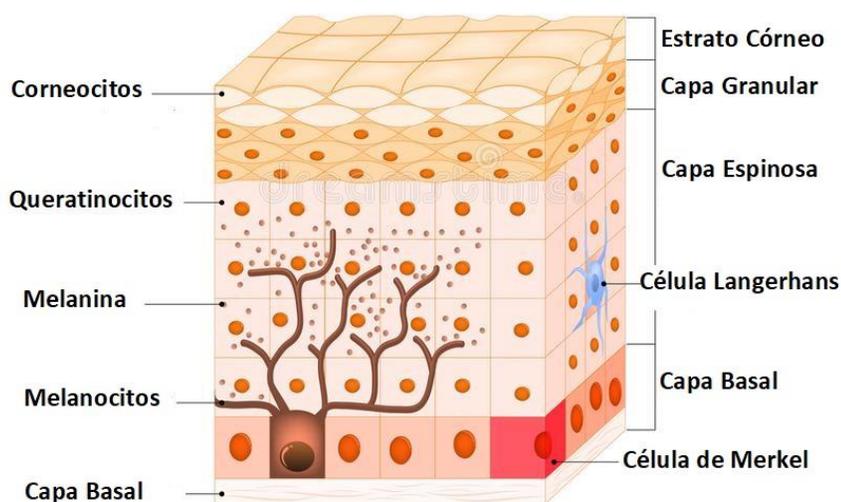
**Figura 1:** Esquema de las capas primarias de la piel y sus componentes. Fuente: Imagen obtenida desde <https://www.stanfordchildrens.org/>.

La piel está compuesta por tres capas primarias que son la epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo (Figura 1) (Gould, 2018). Cada una de estas capas posee características y funciones distintivas que se describirán brevemente.

### 1.1.1 Epidermis.

La epidermis es la capa más superficial de la piel, la cual a su vez está formada por varios estratos (Figura 2). Al ser la capa más externa, cumple una función fundamental como barrera de protección contra rayos UV, agentes patógenos y compuestos químicos (Murphy, 1997; Baroni y col., 2012). Está constituida mayoritariamente por queratinocitos (90%) y en mucho menor medida por melanocitos (5%), células de Langerhans (3-5%) y células de Merkel (>0,1%) (Kanitakis, 2002, Joshy, 2016).

## EPIDERMIS



**Figura 2:** Esquema de la composición y estratos de la epidermis. Las capas que la componen son las siguientes: capa o estrato basal, monocapa de células cúbicas o cilíndricas bajas en continua división, también encontramos melanocitos y células de Merkel; capa o estrato espinoso, formado por varias capas de células de morfología poligonal, aquí se ubican las células de Langerhans; capa granular o estrato granuloso, compuesto de dos a cuatro capas de células más aplanadas que empiezan a queratinizar; y estrato córneo, formado por queratinocitos muertos, también llamados corneocitos, que se desprenden continuamente. En las pieles más gruesas como las palmas de las manos, existe una capa extra llamada capa lúcida (Fuch y Byrnes, 1994). Fuente: Imagen obtenida desde <http://www.medicinaesteticatraseira.es/hidratacion-fisiologica-de-la-piel/>

Los queratinocitos sintetizan citoqueratinas (CK), proteínas largas y filiformes que componen los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células epiteliales, así como de las uñas y el pelo. Dependiendo del estrato donde se encuentre la célula sintetizan un tipo u otro; en el estrato basal sintetizan CK5 y CK14, en el estrato espinoso CK1 y CK10, en la capa granulosa CK9 y en la capa córnea CK6 y CK16 (Castellano, 2018). Los melanocitos se encuentran principalmente en el estrato basal y son los que producen el pigmento melanina, que aporta la coloración de la piel. Las células de Langerhans se ubican en el estrato espinoso, realizan la fagocitosis y tienen actividad inmuno-protectora, ya que captan y presentan los antígenos que llegan a la epidermis. Las células de Merkel son células neuroendocrinas de la piel y se encuentran en el estrato basal (Kolarsick y col., 2011).

La epidermis es una capa con una alta capacidad de regeneración, ya que los queratinocitos están constantemente reproduciéndose y reemplazándose. De esta manera, al producirse una lesión, los queratinocitos proliferan a partir de los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas de la dermis, así como también a partir de los propios bordes de la herida, hasta alcanzar una reepitelización completa (Chu, 2008).

### **1.1.2 Dermis.**

La dermis es el componente mesenquimal de la piel, y se encuentra separada de la epidermis por el estrato basal. Está conformada por dos capas estructuralmente diferentes, la capa papilar y la reticular (Goodwin, 2011; Rippa y col., 2019). La capa papilar, ubicada más cerca de la superficie, está organizada en su parte superior en nódulos llamados papilas dermales, los cuales contienen terminaciones nerviosas y vasos microvesiculares, necesarios para la nutrición e inervación. La dermis papilar posee una mayor densidad celular, mayor contenido de proteoglicanos y una alineación de colágeno más débil que la dermis reticular. La capa reticular está constituida por un irregularmente denso tejido conectivo, presentando fibras de colágeno densamente empacadas. Las fibras de colágeno representan el elemento más importante de la estructura de la dermis y junto con las fibras de elastina, aportan firmeza y elasticidad a la piel (Rippa y col., 2019).

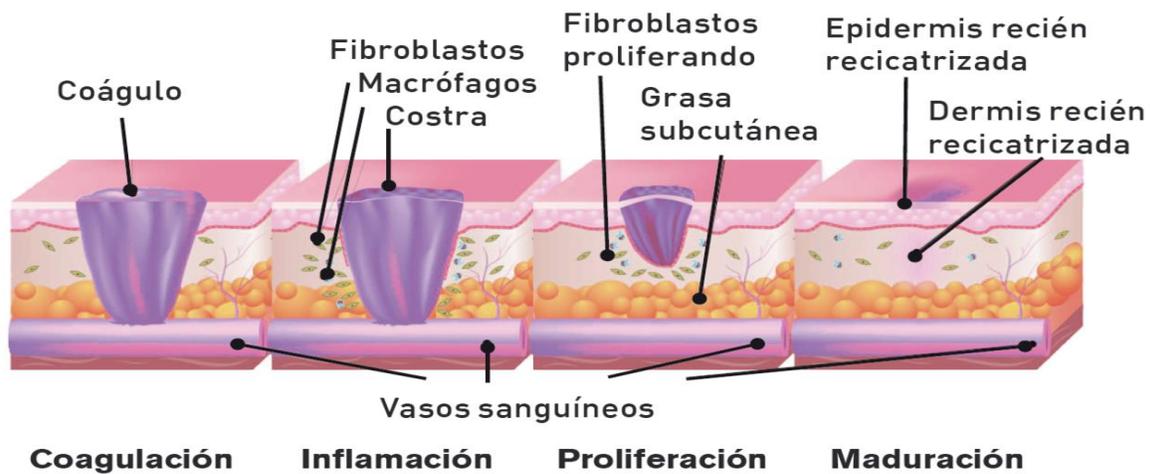
La dermis contiene células con funciones principales en la piel: fibroblastos, células principales de la dermis, que sintetizan las fibras de colágeno y elastina; mastocitos, que funcionan como mediadores de la inflamación liberando histamina, heparina y serotonina; y macrófagos. Además de estos componentes, la dermis está ampliamente vascularizada, con vasos sanguíneos que aportan nutrientes a las células de la dermis y epidermis, además de mediar en las respuestas inflamatorias locales y sistémicas tras una lesión y contribuye a regenerar parcialmente las terminaciones nerviosas (Brown, 2020). A diferencia de la epidermis, las células de la dermis no se regeneran, por ello la morfología de la cicatriz resultante tras una herida será directamente proporcional a la afectación de la dermis (Kanitakis, 2002; Castellano, 2018).

### **1.1.3 Hipodermis o tejido subcutáneo.**

La hipodermis es la capa más profunda de la piel, y está compuesta por tejido adiposo cuyo elemento celular es el adipocito, que se encuentran agrupados en forma de compartimentos trabeculados compuestos por septos que contienen fibroblastos, dendrocitos y mastocitos. En general, el adipocito es una fuente abundante de moléculas que pasan a la circulación y actúan como mensajeros moduladores y reguladores de diversas reacciones a nivel hepático, cerebral, muscular, inmunitario, de coagulación y actividad vascular (inhibidor de plasminógeno tipo I, angiotensina), órganos reproductores (estrógenos), desarrollo de resistencia a la insulina (resistina), etc. (Kanitakis, 2002; James, 2006; Kolarsick y col., 2011)

### **1.2 Regeneración epitelial.**

Al ser un órgano que actúa como barrera, la piel es susceptible a ser lesionada, sin embargo, posee la capacidad de regenerarse mediante un proceso de cicatrización, que restaura su función como barrera protectora, para prevenir mayores daños o infecciones. Este es un proceso conservado evolutivamente, mediado por muchos procesos moleculares y celulares, que cuenta con cuatro etapas: coagulación, inflamación, proliferación y maduración (Figura 3) (Singer, 1999).



**Figura 3:** Esquema de las cuatro etapas del proceso de regeneración epitelial: Coagulación, inflamación, proliferación y maduración. Fuente: Imagen obtenida de *Douglas Laboratories*. <https://www.douglaslabs.es/>.

### 1.2.1 Coagulación.

Cuando la piel se lesiona, se induce la activación de las plaquetas y la formación de un tapón plaquetario o coágulo, cuya función es evitar la pérdida de sangre desde el vaso sanguíneo. Este coágulo, formado en su mayoría por fibrina y fibronectina, facilita la migración y adhesión de células hacia la herida. Diversos factores de crecimiento como factor transformador de crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), se han encontrado en los exudados de heridas cubiertas por apósitos (Pierce y col., 1991; Dvonch y col., 1992; Barrientos y col., 2008). Estos factores actúan en el inicio de la reparación del tejido, como agentes quimiostáticos. Los fibroblastos proliferan y contribuyen a la regeneración del tejido, ya que migran hacia la zona lesionada, donde producen colágeno y otras proteínas de matriz extracelular (ECM) que favorecen la reparación del tejido. Esta fase inicial es sumamente importante para la regeneración integral del tejido dañado (Clark, 1993; Martin, 1997).

### 1.2.2 Inflamación.

En esta fase, los neutrófilos son atraídos por citocinas como interleucina 8 (IL-8); células de Langerhans, factores de crecimiento y factores de agregación plaquetaria hacia el lugar de la herida (Engelhardt y col., 1998; Hackam, 2002). Una vez allí, los neutrófilos actúan durante un periodo corto de tiempo ( $\approx$  24-48 h) liberando enzimas (elastasas y colagenasa) que degradan el tejido dañado y fagocitan bacterias presentes en la herida (Kobayashi, 2008). La presencia prolongada de los neutrófilos y la migración descontrolada hacia el sitio de la herida, han sido asociados con un retraso en el tiempo de recuperación, debido a que los neutrófilos pueden mantener una respuesta inflamatoria excesiva por la liberación de citocinas, además de una excesiva producción de especies oxígeno reactivas y proteasas que inducen la degradación de la matriz extracelular afectando el adecuado ordenamiento del colágeno, por esta razón, esta es una de las fases de mayor interés clínico (de Oliveira y col., 2016).

Posteriormente, los macrófagos son atraídos al lugar de la herida en respuesta a los factores de crecimiento y citocinas liberadas por los neutrófilos. Adicionalmente, las células endoteliales y los queratinocitos presentes en la periferia de la herida también influyen en el reclutamiento de macrófagos, mediante la secreción de quimio-atrayentes. Los macrófagos modulan la formación del tejido granular, contribuyen a la defensa del hospedero como componentes de la inmunidad innata y eliminan células apoptóticas. Además, secretan citocinas proinflamatorias como interleucina-1 e interleucina-6 (IL-1 y IL-6), factores inductores de la proliferación de fibroblastos como EGF, TGF- $\beta$  y PDGF; y de la diferenciación celular de miofibroblastos como factor transformador de crecimiento beta 1 (TGF- $\beta$ 1), que son necesarios en la reparación de la herida (López-Mata y col., 2020). Los macrófagos también actúan en la angiogénesis, que es fundamental para el proceso regenerativo del tejido dañado. Estos liberan factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, como PDGF, factor de crecimiento de fibroblastos beta (FGF-  $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gama, que estimulan la angiogénesis (Hesketh y col., 2017).

### **1.2.3 Proliferación.**

Durante la epitelización del tejido, las células madre son atraídas hacia el sitio de la herida por citocinas. Allí se diferencian en células endoteliales y fibroblastos, que se multiplican en respuesta a los factores de crecimiento liberados por plaquetas (PDGF y TGF- $\beta$ ) y macrófagos, para iniciar la formación del tejido granular (fibroplasia) (Kirby y col., 2015). Transcurridas aproximadamente 72 h desde ocurrida la lesión, comienza la formación de una matriz mediada por los fibroblastos, que, al llegar a la herida, producen colágenos tipo I y III, elastina, glucosaminoglicanos, proteoglicanos y otras proteínas de la matriz extracelular. Estos participan en la contracción de la herida, durante esta fase se requiere de un suministro de sangre constante que provea nutrientes y oxígeno, garantizándose así, la migración, proliferación y diferenciación celular (Rodrigues y col., 2019). Además, se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso se inicia con la liberación de VEGF y el factor de crecimiento de fibroblasto-2 (FGF-2), que son secretados por las células del endotelio dañadas, queratinocitos y macrófagos. En estas condiciones, las células endoteliales proliferan y migran al sitio de la herida para crear nuevas conexiones sanguíneas. A su vez, estos vasos sanguíneos facilitan la entrada de más fibroblastos y macrófagos, que seguirán proporcionados factores de crecimiento para estimular la angiogénesis y la fibroplasia en la herida (Hosgood, 2006; Sinno y Prakash, 2013).

### **1.2.4 Maduración.**

Durante esta fase ocurre la transición del tejido granular hacia la formación de la costra, y puede durar varios meses o años. El tejido de granulación está inicialmente compuesto por grandes cantidades de colágeno tipo III, y es reemplazado gradualmente por colágeno tipo I, que genera mayor fuerza de tensión en la herida. En esta fase, el proceso de angiogénesis y la proliferación celular se detienen y el exceso de células se elimina de la herida o se induce apoptosis (Serra y col., 2017). Los nuevos vasos se contraen o se induce regresión, dejando en su sitio colágeno y proteínas de matriz extracelular, que son posteriormente degradados por la acción de las metaloproteinasas de matriz extracelular y las metaloproteinasas inhibitoras del tejido (TIMPs) secretadas por los fibroblastos, macrófagos y neutrófilos (Ferranti-Ramos y col., 2017; desJardins-Park y col., 2018).

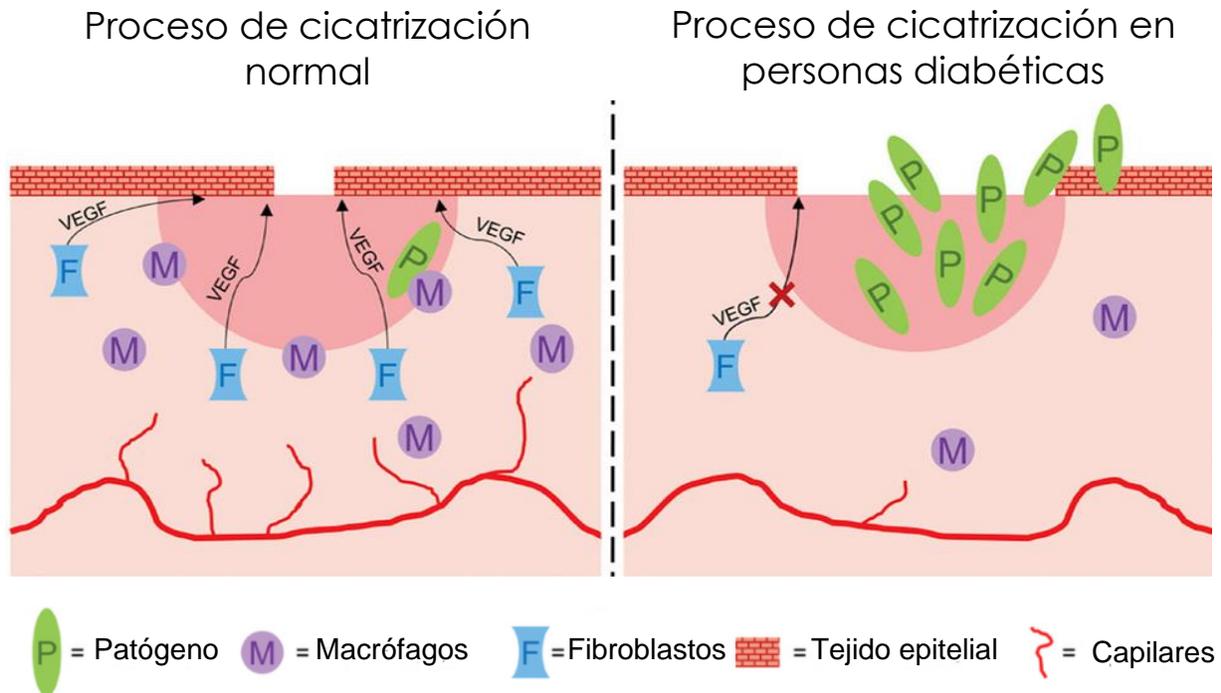
La matriz extracelular formada inicialmente por colágeno I, es reemplazada por la deposición del colágeno tipo III, que es más fuerte, grueso y permanente. Además, los fibroblastos estimulados por TGF- $\beta$  se diferencian a miofibroblastos y de esta forma pueden producir actina del músculo liso con función contráctil. Esto favorecer el movimiento de las células desde el borde hasta el centro de la herida para generar el cierre (Penn y col., 2012). Cuando la herida se cierra, el proceso de remodelación continua durante varios meses hasta alcanzar aproximadamente el  $\approx$  70-80% de la resistencia normal de la piel (Landén y col., 2016).

### **1.3 Problemas en la regeneración epitelial.**

A pesar de que la cicatrización es un proceso conservado, la eficiencia de este proceso varía de especie en especie y dentro de individuos de la misma especie. En los humanos, la regeneración del tejido no siempre es completa, pudiendo quedar cicatrices (Takeo y col., 2015). Cuando la piel presenta afecciones, tales como quemaduras, úlceras por presión, entre otros, no se regenera fácilmente por sí misma, debido a la pérdida de electrolitos, agua y proteínas, lo que además puede ser agravado por otras co-morbididades que presente el individuo como una enfermedad crónica (Serna y Molina, 2013; Xu y col., 2020). Esto provoca, la pérdida de la función de barrera que cumple la piel y puede llevar a deshidratación, infección e incluso la muerte. La *diabetes mellitus* es una de las enfermedades que afecta notoriamente el proceso regenerativo de la piel.

#### **1.3.1 Diabetes y úlceras crónicas.**

La *diabetes mellitus*, es una enfermedad metabólica compleja que tiene efectos negativos en la capacidad regenerativa de las personas. Se ha estimado que, en Chile, el 12% de la población sufre de esta enfermedad, estando sobre el promedio mundial que es de un 8% (Encuesta Nacional de Salud 2016-2017). La deficiencia de insulina en los pacientes de diabetes ha sido vinculada con una disminución en la formación de colágeno, disminución en los niveles de granulocitos y fibroblastos y menor crecimiento capilar (Figura 4). Esto provoca que la regeneración sea muy lenta, generando heridas crónicas, que son heridas que no siguen el proceso bien definido de regeneración, sino que quedan detenidas en una fase inflamatoria (Fowler; Morain y Colen, 1990; Schreml y col., 2016).



**Figura 4:** Comparación del proceso de cicatrización normal (Izquierda) de una persona diabética (derecha). En la cicatrización normal, los macrófagos se enfrentan a los patógenos en la herida, mientras los fibroblastos liberan VEGF para volver a iniciar el crecimiento de células epiteliales y así cerrar la herida. En contraste, en una persona diabética, la angiogénesis no es suficiente y los macrófagos tienen menor actividad, lo que permite una excesiva entrada de patógenos en la herida. Además, existe una menor presencia de fibroblastos, retrasando la re-epitelización y cierre de la herida. Fuente: Adaptado de *Malone-Povolny y col., 2019*.

Uno de los principales problemas en las heridas crónicas es la ocurrencia de infecciones, ya que los pacientes con heridas crónicas son susceptibles a la contaminación de diferentes agentes infecciosos. Las bacterias más comunes en heridas complejas son *Staphylococcus aureus* (93,5%), *Enterococcus faecalis* (71,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (52,2%), *Staphylococcus coagulasa-negativa* (45,7%), *Proteus spp* (41,3%), y bacterias anaeróbicas (39,1%) (Gjødsbøl y col., 2006). Estos microorganismos pueden crecer y crear colonias rápidamente en heridas abiertas, pudiendo incluso penetrar secciones más profundas de la piel, provocando una sepsis (Wenzel y Perl, 1995; Archer, 1998; Edwards y Harding, 2004). Estas infecciones ralentizan el proceso de regeneración epitelial y facilitan la

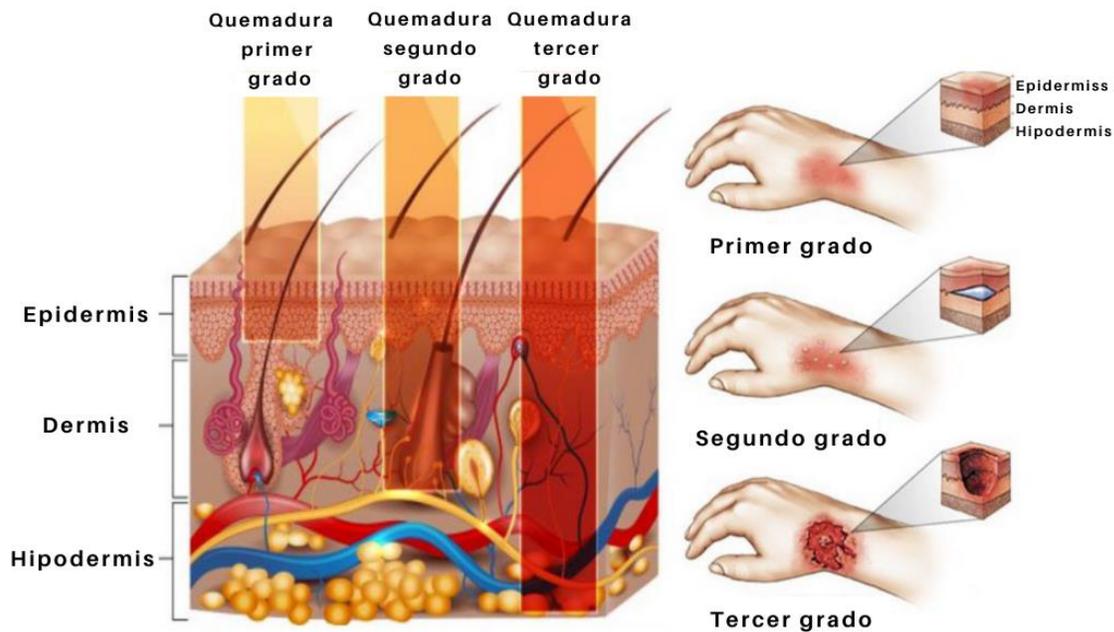
deposición incorrecta de colágeno, empeorando el diagnóstico del paciente. En pacientes con pie diabético, la infección puede ser tan grave que se debe amputar la extremidad (Jeffcoate y Harding, 2003; Xu y Hsia, 2018).

Otro factor clave que determina el grado de efectividad del proceso regenerativo, es la magnitud y tipo de daño recibido. Dentro de los daños que puede recibir la piel, las quemaduras son uno de los más difíciles de tratar.

### **1.3.2 Quemaduras.**

Se denomina quemaduras a las lesiones producidas en los tejidos vivos por agentes físicos, químicos y eventualmente biológicos, los cuales provocan alteraciones que varían desde el eritema hasta la destrucción total de las estructuras afectadas. Según su grado de profundidad (Figura 5), las quemaduras se pueden clasificar en (Nguyen, 2020):

- A. De primer grado o eritema: Afectan a la epidermis. Existe enrojecimiento e hipersensibilidad. La exposición prolongada al sol suele provocar este tipo de lesiones. No son de gran preocupación, dada las propiedades regenerativas de la epidermis. En tres o cuatro días, la epidermis muerta se desprende y es reemplazada por queratinocitos regenerados.
- B. De segundo grado superficial: Afecta la epidermis y parte de la dermis, con aparición ampollas y edema. Cicatrizan entre doce o catorce días después gracias a las células epiteliales.
- C. De segundo grado profundas: La lesión llega hasta la dermis más profunda. El lecho se torna pálido, rosáceo y seco debido a la mala perfusión vascular. La regeneración por epitelización espontánea es más lenta y costosa, demorando más de veintiún días. Son más propicias a infecciones locales que pueden complicar el diagnóstico y por ello se recomienda un tratamiento quirúrgico de la zona afectada mediante escisión y trasplante de autoinjertos.
- D. De tercer grado o espesor total: Toda la dermis está afectada e incluso puede llegar al tejido subcutáneo y muscular. Se produce una destrucción total de las terminaciones nerviosas y de los vasos sanguíneos. No hay posibilidad de reepitelización desde el lecho de la herida y por ello es totalmente inevitable la escisión e injerto de la zona afectada.



**Figura 5:** Esquema de la clasificación de heridas por quemadura según su grado de profundidad. Fuente: Adaptado de *Stoica y col., 2020*.

En general, inmediatamente después de sufrir la quemadura, se desencadena una respuesta inflamatoria que promueve la recuperación de la herida. Sin embargo, en quemaduras graves, esta respuesta inflamatoria se puede volver extensa e incontrolable, provocando una inflamación severa que genera un estado catabólico generalizado y ralentiza el proceso de sanación. Este fenómeno es conocido como respuesta hipermetabólica y se ve de manera casi exclusiva en las quemaduras, estando asociada a una mayor incidencia en la falla de órganos, infecciones e incluso la muerte (Jeschke, 2014; 2020). Al igual que en las úlceras crónicas, las infecciones son una de las principales causas de empeoramiento del diagnóstico, por lo que es necesario proteger la quemadura de microorganismos oportunistas durante esta prolongada inflamación. Por mucho tiempo se ha utilizado principalmente la gasa como apósito para estas heridas, pero este tipo de material tiene desventaja, porque no siempre son estériles, además, en el caso de heridas con muchas capas de profundidad, solo cubren la capa externa y para poder hacer las curaciones, se requiere quitar el apósito cada cierto tiempo, incrementándose las probabilidades de sufrir una infección (Algahtani y Lalonde, 2006; Wang y col., 2018; Stoica y col., 2020).

Ante este escenario, el ámbito de estudio de la ingeniería de tejidos ha ido tomando cada vez más relevancia.

#### **1.4 Ingeniería de Tejidos.**

Los grandes avances en la comprensión de la biología molecular y celular han generado un progreso importante en el tratamiento y cuidado de las heridas, permitiendo el desarrollo de la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos es un campo que mezcla áreas como la biología celular, ingeniería de biomateriales y la medicina, con el fin de desarrollar estrategias que permitan la regeneración del tejido dañado, a través del desarrollo de matrices tridimensionales sintéticas, que sirvan como soporte para el crecimiento de células nuevas que reemplacen el tejido dañado, o que puedan transportar agentes bioactivos; acelerando el proceso de reepitelización (Zhong y col., 2010; Zarrintaj y col., 2017).

Tradicionalmente se han usado apósitos como estructuras de soporte para las heridas, y que además actúan como una barrera frente a los microbios, sin tener una función más activa en la regeneración del tejido (Wang y col.,2018). El apósito ideal (Figura 6) debe ofrecer protección contra infecciones bacterianas, mantener los niveles correctos de humedad en la herida, permitir el intercambio de gases y fluidos; y no debe ser tóxico ni provocar alergias. Dentro de este contexto, los hidrogeles se han propuestos como una opción para generar matrices de soportes y apósitos para heridas. (Hoffmann, 2012)



**Figura 6:** Esquema del diseño de un apósito para heridas ideal. *Fuente: Elaboración propia.*

#### 1.4.1 Hidrogeles en la ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles son estructuras poliméricas tridimensionales, que pueden contener hasta 1000 veces su peso en agua, sin perder su estructura. Los hidrogeles, además, poseen una flexibilidad similar al tejido natural, debido a su gran contenido de agua. La presencia de grupos como  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH$  y  $SO_3H$ , les otorga características hidrofílicas (Bahram y col., 2016).

Los hidrogeles se forman a partir del entrecruzamiento físico o químico de uno o más polímeros constituyentes. Cuando el entrecruzamiento es físico, las cadenas poliméricas se mantienen unidas por enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas. A pesar de su debilidad, estas interacciones son muy numerosas y su contribución a lo largo de toda la cadena polimérica da lugar a comportamientos muy complejos (Lee y Kim, 2018). Debido a que dependen de estímulos externos como el pH, la fuerza iónica, la composición del disolvente o la temperatura, permiten gran versatilidad en el comportamiento de los hidrogeles frente al medio, a diferencia de los materiales enlazados covalentemente. Las condiciones del entorno determinan que predominen las fuerzas atractivas o repulsivas, produciéndose el colapso o el hinchamiento del gel (Zhang y Khademhosseini, 2017).

Por otro lado, cuando el entrecruzamiento es químico, las cadenas poliméricas se unen mediante enlaces covalentes, que son más fuertes que los enlaces formados por entrecruzamiento físico, generando una estructura más resistente a la degradación. Al igual que los hidrogeles físicos, los hidrogeles de entrecruzamiento químicos no son homogéneos. Generalmente, contienen regiones de alta densidad de entrecruzamiento y bajo grado de hinchamiento (*clusters*), dispersas en las regiones de baja densidad de entrecruzamiento y alto índice de hinchamiento. La presencia de estos *clusters* se debe a la agregación hidrófoba del agente entrecruzante (De France y col., 2017). En algunos casos, dependiendo de la composición, del disolvente, la temperatura y la concentración de sólidos durante la gelación, puede ocurrir separación de fases formándose macroporos. Las condiciones de síntesis y los polímeros que se usen definirán las propiedades fisicoquímicas del hidrogel, por lo que, variando las condiciones experimentales, se pueden moldear con facilidad hidrogeles con propiedades muy distintas (Ahmed, 2015; Weschler y col., 2019).

Múltiples grupos de investigación se han interesado en los hidrogeles, por su biocompatibilidad (Liang y col., 2021). Se considera que un material es biocompatible, cuando puede existir dentro del cuerpo sin dañar a las células adyacentes o sin provocar alguna reacción adversa que no le permita ejercer su función (Williams 2003, Kohane y Langer, 2010). Es por esto que los hidrogeles han sido utilizados en la ingeniería de tejidos para encapsular células y promover algunas actividades celulares, como la migración, proliferación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular. Igualmente, los hidrogeles se utilizan como vectores de compuestos bioactivos, ya que su estructura les permite encapsular moléculas y liberarlas controladamente en respuesta a algún estímulo físico o químico. (Li y Mooney, 2016; Mandal y col., 2020).

En la Tabla 1 se describen algunos hidrogeles comercialmente disponibles que se aplican en la ingeniería de tejidos (Singh y col., 2021).

**Tabla N°1:** Hidrogeles con aplicaciones biomédicas comercialmente disponibles.

<b>Producto</b>	<b>Material del hidrogel</b>	<b>Descripción</b>
ALGICELL Ag. Suprasorb A+Ag	Alginato	Hidrogel con plata incorporada, usada como apósito de heridas con propiedad antimicrobiana.
AQUACEL® Ag Hidrofibra® C/ Plata Iónica	Hydrofiber® Technology	El apósito que combina las características gelificantes favorables de la tecnología Hydrofiber® con las propiedades antimicrobianas de amplio espectro de la plata iónica (Ag +). Indicado para su uso en heridas crónicas y agudas
Prontosan	Hidroetilcelulosa	Hidrogel con polihexanida usada como apósito para heridas antiséptico.
Granugel	Pectina, carboximetilcelulosa y propilen glicol	Hidrogel para el tratamiento de heridas de espesor parcial y completas.
Intrasite Gel	Carboximetilcelulosa y propilen glicol	Hidrogel usado para heridas superficiales y profundas.
Purilon Gel	Carboximetilcelulosa de sodio	Hidrogel indicado en conjunto con un apósito secundario para heridas necróticas y quemaduras.
Woundtab	Carboximetilcelulosa y glicerol	Hidrogel superabsorbente capaz de absorber bacterias y retenerlas en su estructura.
Tegaderm Alginato Ag	Alginato + carboximetilcelulosa	Tegaderm® Alginato Ag ofrece alta capacidad de absorción de exudado con efecto antimicrobiano tópico de amplio espectro.

Para asegurar la biocompatibilidad de los hidrogeles, se favorece el uso de polímeros de origen natural, como colágeno, alginato, almidón y quitosano, siendo este último uno de los más estudiados (Wang y col., 2020).

### **1.4.2 Quitosano.**

El quitosano es un polímero producido por la desacetilación parcial de la quitina, un componente del exoesqueleto de los crustáceos e insectos. Este copolímero policatiónico presenta grupos acetamida libres e hidroxilos en el anillo de la glucopiranososa que son susceptibles al ataque nucleofílico en el anillo (Figura 7a). Esto permite realizar una amplia gama de materiales funcionales mediante la acción selectiva de grupos aminos libres (Bhattarai y col., 2010; Pellá y col., 2018).

El quitosano se considera un biopolímero biodegradable, no tóxico, antigénico, antimicrobiano, biocompatible, hemostático, filmogénico; y susceptible a ser degradado por enzimas, como la lisozima, mediante la hidrólisis de sus residuos acetilados (Anjum y col., 2016; Demirtas y col., 2017; Khan y Muhajid, 2019). Además, hay estudios que indican que, al ser degradado, el quitosano libera N-Acetilglucosamina (GlcNAc), un monosacárido que acelera el proceso de cicatrización (Sudheesh y col., 2012). Por tanto, sus usos para la elaboración de biomateriales de manera independiente o combinado con otros materiales han permitido el desarrollo de diversos sistemas en forma de gel, micro o nanopartículas, membranas, andamios, esponjas y películas (Moeini, 2020). La mayoría de estos materiales han sido propuestos para diversas aplicaciones en el área farmacéutica, médica, cosmética y la industria alimentaria, sin embargo, como se ve en la Tabla 1 y a pesar de su potencial actividad aceleradora del proceso de cicatrización, no existen hidrogeles comercialmente disponibles a base de quitosano que se apliquen en la ingeniería de tejidos.

### **1.4.3 Almidón.**

El almidón es uno de los biopolímeros más abundantes y económicos. Se presenta en la naturaleza en forma de gránulos, con diámetros en el intervalo de 2 a 100  $\mu\text{m}$ . Está compuesto por dos homopolímeros de D-glucosa: la amilosa, un polímero lineal formado por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranososa, unidas casi exclusivamente por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4); y la amilopectina, que presenta, además de las uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) en las cuales se ramifica la estructura (Figura 7b). La masa molar de la amilosa está en el intervalo de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> g/mol. La amilopectina presenta una masa molar 1000 veces mayor, entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>9</sup> g/mol y está ramificada cada 20-25 unidades de

$\alpha$ -D-glucosa (Tester y col., 2004). Debido a su origen natural, el almidón es biocompatible y ha sido usado para crear hidrogeles con una gran variedad de aplicaciones (Ismali y col., 2013). Sin embargo, sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos no han sido muy exploradas aún.

En hidrogeles compuestos de quitosano, la adición de almidón aumenta el tamaño de los poros del hidrogel, lo que conlleva que este aumente su capacidad de hinchamiento (Ngoenkam y col., 2010). Un hidrogel que tiene una elevada capacidad de hinchamiento puede ser usado para retener compuestos bioactivos como proteínas, fármacos o nanopartículas que, posteriormente, puedan ser liberados en un blanco específico. Por lo tanto, un hidrogel compuesto de quitosano y almidón podría usarse para liberar compuestos antimicrobianos en una lesión epitelial, protegiendo a la herida de agentes patógenos.

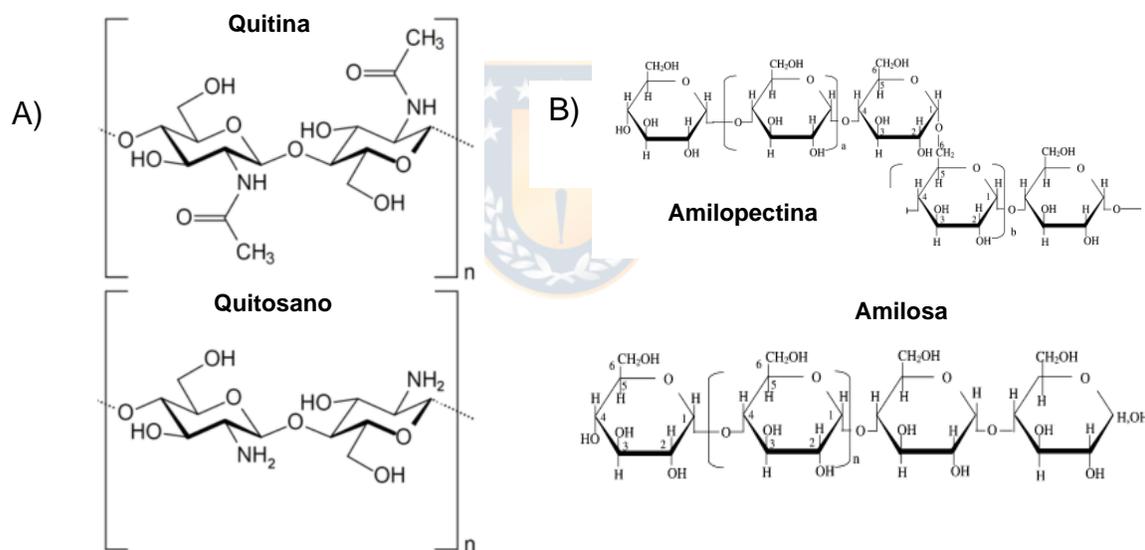


Figura 7: A) Estructura molecular de la quitina y quitosano. Fuente: Imagen adaptada de *Younes y Rinaudo, 2015*. B) Estructura de los dos homopolímeros constituyentes del almidón, amilopectina y amilosa. Fuente: Adaptado de *Tester y col., 2004*.

#### 1.4.4 CuNPs como compuestos bioactivos.

El compuesto bioactivo debe ser incorporado en el hidrogel durante el proceso de síntesis, o después mediante absorción. En el primer caso, el compuesto debe ser resistente a los reactivos y condiciones de síntesis, mientras que, en el segundo caso, el compuesto debe tener un tamaño inferior a los poros del hidrogel para poder

ingresar en su interior (Elahi y col., 2018). Además, en ambos casos, los polímeros que constituyen el hidrogel no deben verse afectados por el compuesto ni el compuesto por los primeros, por lo que encontrar un compuesto bioactivo indicado es una tarea complicada. Sin embargo, hay unos compuestos que pueden superar todos estos obstáculos, las nanopartículas.

Las nanopartículas se definen como partículas con tamaños que varían de 1 a 100 nm, cuyas propiedades son distintas a la de materiales más grandes compuestos del mismo elemento (Auffan y col., 2009). Al igual que los hidrogeles, se caracterizan por ser muy maleables, pudiendo sintetizarse una gran variedad de nanopartículas para muchas aplicaciones distintas, como adsorción de contaminantes en el agua, extracción de ADN desde un gel de agarosa y administración de fármacos dirigida (Feng y col., 2010; Gupta y Nayak, 2012)

Algunas nanopartículas son de especial interés biológico, debido a sus propiedades antimicrobianas. Las nanopartículas de oro, plata, y cobre, entre otras, han mostrado tener actividad antibacteriana, incluso cepa-específica (Baker y col., 2005; Ruparella y col., 2008; Bindhu y Umadevi, 2014). Las CuNPs tienden a liberar  $\text{Cu}^{2+}$  en solución, lo que crea radicales hidroxilos libres que dañan las membranas de los microorganismos con los que interactúan. (Morones y col., 2005; Malhotra y col., 2020). Al encapsular nanopartículas en un hidrogel, estas pueden liberarse en la herida para protegerla de infecciones. Se han sintetizado apósitos a partir de hidrogeles de quitosano con nanopartículas de óxido de zinc incorporadas, y se han estudiado sus efectos regeneradores, así como su actividad antimicrobiana, en ratones (Sudheesh y col., 2012). Siguiendo esta misma lógica, se han sintetizado hidrogeles de carboximetil celulosa, con nanopartículas de plata incorporadas, para ser aplicados como aerosol en heridas, logrando la recuperación completa de la herida y previniendo infecciones (Mao y col., 2017). El cobre ha tomado relevancia en medicina durante este último tiempo, debido a su alta disponibilidad. Su actividad antimicrobiana está bien documentada, siendo eficiente contra cepas bacterianas como la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que como mencionamos anteriormente, son los dos mayores agentes causantes de infección en heridas (Ramya Devi y col., 2012; Usman y col., 2013). En base a este contexto, en este

trabajo se desarrolló un apósito a partir de quitosano y almidón, al cual se le incorporó CuNPs. Este apósito, podría ayudar a acelerar el proceso de cicatrización, al otorgar protección antibacteriana, absorber exudado y mantener húmeda la herida. De esta forma, las personas diabéticas tendrán una mayor posibilidad de recuperarse de una herida profunda o una quemadura.



## 2. HIPÓTESIS.

La relativa facilidad con que se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles los convierte en una de las matrices poliméricas más estudiadas en el campo de la biomedicina e ingeniería de tejidos. Las nanopartículas comparten esta característica, ya que el tamaño y estructura de estas puede modificarse al variar las condiciones de síntesis, permitiendo generar nanopartículas con una gran diversidad de propiedades. Uno de los tipos de nanopartículas más estudiadas son las de cobre, porque poseen propiedades antimicrobianas.

Bajo este contexto, la encapsulación de CuNPs en un hidrogel, para ser liberados de manera localizada en un tejido dañado, podría proteger el tejido dañado de la infección por bacterias y ayudar a que la recuperación sea más rápida. Con base en lo anterior, nuestra hipótesis es:

**El diseño de un hidrogel polimérico, biocompatible y biodegradable, basado en quitosano-almidón y generado mediante la combinación de entrecruzamiento químico y físico acelera el proceso de cicatrización del tejido dañado en un modelo animal murino.**



### **3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

Diseñar y sintetizar un hidrogel basado en componentes biocompatibles y biodegradables y evaluar su efecto cicatrizante en heridas dérmicas en modelo murino.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Generar prototipos de hidrogeles biocompatibles y biodegradables a partir de quitosano-almidón por métodos químicos y físicos, e incorporando CuNPs.
2. Caracterizar el hidrogel mediante espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y capacidad de hinchamiento.
3. Evaluar *in vitro* la actividad biológica del hidrogel en términos de citotoxicidad celular.
4. Evaluar la actividad regenerativa del hidrogel *in vivo* en un modelo de herida dérmica en ratones.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Material biológico.

- Para los ensayos de viabilidad celular *in vitro*, se utilizó la línea celular de cáncer de epiteloma humano HEP-2. Las puntas, tubos, placas y otros elementos utilizados para manipular la línea celular fueron clasificados como desecho biológico. Los desechos biológicos fueron clasificados y eliminados de acuerdo con el manual de bioseguridad de Conicyt (cap 5.2.5).
- Para evaluar la actividad regenerativa de los hidrogeles *in vivo*, se utilizaron 15 ratones CF-1 hembras, de entre 6 a 8 semanas de edad, con un peso entre 28 y 32 g, que fueron adquiridos en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCh). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas y en cajas individuales, teniendo 5 animales por caja, y con una alimentación y suministro de agua *ad libitum*, realizando la vigilancia de la salud de los animales de forma permanente. Para el sacrificio de los animales se empleó el método de dislocación cervical, con anestesia previa (ketamina clorhidrato 100 mg/kg y xilacina 2% 10 mg/kg) siguiendo los protocolos establecidos por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

#### 4.1.2 Reactivos.

Los reactivos usados en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Listado de reactivos usados en los experimentos.

<b>Reactivo</b>	<b>Distribuidor</b>
Ácido Acético al 70%	Merck S.A, Alemania
Agua Ultrapura MilliQ	Merck S.A, Alemania
Almidón soluble	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-Difeniltetrazolio (MTT)	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Etanol 100%	Merck S.A, Alemania
Isopropil alcohol	Merck S.A, Alemania
Ketamina clorhidrato 100 mg/kg	Troy Laboratories, Australia
Medio DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, USA
Nanopartículas de cobre (CuNPs)	Schultz Ingeniería y Maquinarias LTDA, Chile
Polietilenglicol (PEG 35 K)	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Polivinil alcohol (PVA)	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Quitosano de bajo peso molecular 70% deacetilación	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Solución de Glutaraldehído 50% en agua	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Suero bovino fetal (SBF)	Biowest, Francia
Tampón fosfato salino (PBS)	Hyclone, EE. UU.
Tripsina-EDTA 0.25%	Hyclone, EE. UU.
Tritón X-100	Sigma Aldrich R, EE. UU.
Trizol	Ambio Life Technologies, EE. UU.
Xilacina 2% 10 mg/kg	Centrovet, Chile

### 4.1.3 Equipos e instrumentos

- Las líneas celulares se trabajaron en una cabina de seguridad biológica clase II, *modelo NU425400E (Nuair, EEUU)*, e incubadoras de línea celular *AutoFlow 5500 (Nuair, EE.UU.)*.
- Para pesar reactivos se utilizó una balanza analítica *Mettler Toledo AT261 y PG2002-S (Mettler Toledo, EE. UU.)*.
- La medición se realizó de resultados de MTT en el lector de multiplacas *SYNERGY HTX (BioTek, EE. UU.)*.
- Las imágenes SEM, se obtuvieron usando un microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM-6380 LV (Jeol, Japón)* equipado con un detector de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDX).
- Las imágenes TEM, se obtuvieron usando un microscopio electrónico de transmisión *TEM FEI-Tecnaí G20 Spirit Twin (Fei, EE. UU.)* equipado con una cámara Eagle 4k HR a 80 kv.
- Los espectros FT-IR se obtuvieron usando un equipo *Thermo Nicolet Nexus 670 Fourier (Thermofisher, EE. UU.)* con detector de reflectancia atenuada (ATR)

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento físico por método de *freeze-thawing*.

La síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento físico se hizo con distintas concentraciones de biopolímeros (Tabla 3) y su proceso se describe a continuación.

**Tabla 3:** Composición de hidrogeles por método *freeze-thawing*.

Hidrogel	Quitosano (g)	Almidón (g)	PVA (g)	Volumen final (mL)
<b>Hidrogel 1</b>	1	1	-	<b>40</b>
<b>Hidrogel 2</b>	-	1,6	-	<b>20</b>
<b>Hidrogel 3</b>	-	1	1	<b>20</b>

La síntesis del hidrogel 1 se hizo preparando una solución de ácido acético al 2%, pH 2.5, a partir de 2 mL de una solución de ácido acético 70% y ajustándola a 100 mL con agua desionizada en un matraz. Posteriormente se preparó una solución de quitosano al 5%, pesando 1 g de quitosano y mezclándolo con 20 mL de la solución de ácido acético al 2%, en agitación constante de 600 rpm durante 3 h a 25°C. Paralelamente, se preparó una solución de almidón al 5% en agua desionizada, mezclando 1 g de almidón con 20 mL de agua desionizada. Esta se calentó a 100°C en un microondas hasta que desaparecieran las turbiedades. Posteriormente, se mezclaron los 20 mL de solución de quitosano 5% con los 20 mL de almidón 5% en agitación constante de 600 rpm por 2 h. Una vez homogenizada, la mezcla se vertió en una placa de 96 pocillos, que fue utilizada como molde. Posteriormente, se realizaron tres ciclos de congelación a -20°C por 12 h y descongelación a 25°C, que es un método de entrecruzamiento físico conocido como *freeze-thawing*. Después de 3 ciclos, se removió el exceso de agua de las muestras con papel filtro y se procedió a congelar la muestra a -80° C por 2 h. Finalmente, las muestras congeladas, se colocaron en un liofilizador por 48 h y después se sacaron de sus moldes, obteniéndose así hidrogeles de quitosano-almidón.

La síntesis del hidrogel 2 se llevó a cabo disolviendo 1,6 g de almidón en 20 mL de agua desionizada a 100°C hasta lograr una solución transparente. Finalmente, se realizó el tratamiento por *freeze-thawing* y posterior liofilización de manera idéntica al hidrogel 1.

La síntesis del hidrogel 3 se hizo disolviendo 1 g de almidón y 1 g de PVA en 20 mL de agua desionizada, en un agitador magnético con control de temperatura a 600 rpm y 100°C, hasta lograr una solución transparente. Posteriormente, se realizó el tratamiento por *freeze-thawing* y luego se liofilizó de manera idéntica a los hidrogeles anteriores.

#### **4.2.2 Síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento químico con glutaraldehído.**

Se produjeron dos tipos de hidrogeles (ver Tabla 4) cuyo proceso de síntesis se describe a continuación.

**Tabla 4:** Composición de los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico con glutaraldehído.

Hidrogel	Quitosano (g)	Almidón (g)	PEG (g)	PVA (g)	Agente Entrecruzante (μL)	Vol. Final (mL)
Hidrogel 4	0,4	0,4	0,4	0,4	400	40
Hidrogel 5	1	1	-	-	400	20

Para la síntesis del hidrogel 4, se disolvieron 0,4 g quitosano en 20 mL de una solución de ácido acético al 2% en agitación magnética de 600 rpm por 3 h a 25°C, mientras que, en paralelo, se disolvieron 0,4 de almidón, 0,4 g de PEG y 0,4 g de PVA en 20 mL de agua desionizada en un agitador magnético con control de temperatura a 600 rpm a 100°C. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones en agitación constante a a 25°C por 2 h, hasta alcanzar una homogenización completa. Una vez homogenizada la mezcla, se agregaron 400 uL de glutaraldehído (GA), como agente entrecruzante, y se dejó actuar por 10 min en agitación constante. Terminado este proceso, la solución se vertió en placas de 96 pocillos y se realizó el proceso de *freeze-thawing*; y posterior liofilización, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Para la síntesis del hidrogel 5, se disolvió 1 g quitosano en 20 mL de una solución de ácido acético al 2% en agitación magnética de 600 rpm por 3 h a 25°C, mientras que, en paralelo, se disolvió 1 g de almidón en 20 mL de agua desionizada en un microondas a 100°C hasta lograr una solución transparente. Posteriormente se procedió mezclar ambas soluciones en agitación constante a 25°C por aproximadamente 2 h. Una vez homogenizada la mezcla, se agregaron 400 uL de GA, y se dejó actuar por 10 min en agitación constante. Terminado los 10 min, la solución se vertió en placas de 96 pocillos y en otro molde rectangular de 10 x 5 cm y se realizó el proceso de *freeze-thawing*; y posterior liofilización, descrito anteriormente.

#### **4.2.3 Caracterización de los grupos funcionales de los hidrogeles mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.**

El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarroja, generando movimientos vibracionales en los enlaces de las moléculas. Los movimientos vibracionales se conocen como vibraciones de tensión o flexión, dependiendo del tipo de desplazamiento generado en los enlaces, Todas las moléculas poseen una "huella dactilar", que corresponden a un conjunto de bandas de absorción, donde cada banda corresponde al movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, permitiendo así identificar los grupos funcionales presentes en ella. Esta técnica posee una gran sensibilidad, además de requerir una mínima preparación de la muestra y ser un procedimiento no destructivo. (Barraza-Garza., 2013; Tiernan y col., 2020).

La caracterización de los grupos funcionales de los hidrogeles se realizó utilizando un equipo FT-IR con detector ATR, usando como blanco una pastilla de KBr. Las muestras fueron analizadas a 25°C en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación de las bandas se hizo comparando los espectros obtenidos con los reportados en literatura y en bases de datos.

#### **4.2.4 Caracterización de la estructura macro y microscópica de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido con detección de energía dispersiva.**

El microscopio electrónico de barrido entrega imágenes de una muestra en alta resolución, al hacer incidir un haz de electrones de alta energía sobre la superficie de esta. Esta técnica permite obtener información sobre la topografía superficial y composición de la muestra. Para lograr esto, es necesario aplicar una diferencia de potencial que puede ir desde 50 hasta 30000 V, para acelerar los electrones en un campo eléctrico y de esta forma, sacar provecho de su comportamiento ondulatorio. Una vez que el haz de electrones incide sobre la muestra se producen muchas interacciones entre los electrones del mismo haz y los "átomos" de la muestra. La interacción más común, es la expulsión de electrones posteriormente de colisionar con la muestra, produciéndose rayos X y otro tipo de radiaciones, las cuales son captadas y utilizadas para generar la imagen (McMullan, 1989; 1995).

Las imágenes de la estructura macro y microscópica de la matriz de los hidrogeles fue obtenida por un equipo SEM acoplado con un detector EDX, que capta los rayos X que liberan los electrones de la muestra al ser chocados por el haz de electrones del SEM, lo que además permitió identificar los elementos que componen los hidrogeles, ya que cada uno posee una estructura atómica única que genera bandas características en sus espectros de emisión. La toma de muestras requirió que las muestras fueran cubiertas en oro previamente.

#### **4.2.5 Evaluación de capacidad de hinchamiento de los hidrogeles.**

La capacidad de hinchamiento se estudió sumergiendo los hidrogeles en 10 mL de PBS. Cada cierto intervalo de tiempo, eran sacados de la solución y pesados en una balanza durante un período de 24 h. Los pesos anotados durante cada muestreo se compararon con el peso de los hidrogeles seco y se calculó el porcentaje de hinchamiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$SW = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

Dónde, SW es porcentaje de hinchamiento,  $W_w$  es el peso de la muestra húmeda y  $W_d$  el peso de la muestra seca.

#### **4.2.6 Incorporación de nanopartículas de cobre y detección por microscopía electrónica de barrido/ transmisión acoplada con detector de energía dispersiva de rayos x.**

Para incorporar las nanopartículas, los hidrogeles se cortaron en trozos de aprox 2 mm de altura y 6 de diámetro. Se sumergieron por 12 h, en 300 uL de solución de PBS que contenía 0,7 mg/mL de CuNPs y posteriormente se liofilizó. Para corroborar que el hidrogel fue capaz de retener a las nanopartículas, se llevaron las muestras a un equipo SEM y otro TEM, ambos acoplados con detector EDX que permitió identificar el porcentaje de cobre en la superficie analizada del hidrogel.

El microscopio electrónico de transmisión al igual que el SEM, permite obtener imágenes en alta resolución de una muestra. Todo microscopio TEM cuenta con una fuente emisora de electrones, que puede estar compuesta de filamentos de tungsteno o cristales de hexaboruro de lantano. La técnica consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre un espécimen ultrafino. El haz de electrones es generado por un

proceso denominado emisión termoiónica, y posteriormente, es acelerado usando un potencial eléctrico medido en volts. Finalmente, mediante el uso de lentes electroestáticos y electromagnéticos, el haz es dirigido a la muestra. La interacción entre el espécimen y el haz de electrones permite formar una imagen, la cual es enfocada y magnificada en una pantalla fluorescente. La alta resolución de las imágenes se debe a la menor longitud de onda ( $\lambda$ ) de los electrones, en comparación a la de los fotones. Esta técnica permite estudiar la estructura, composición y propiedades de una muestra en detalles submicrónicos (Fultz y Howe, 2013).

#### **4.2.7 Evaluación *in vitro* de citotoxicidad del hidrogel en células HEP-2.**

La citotoxicidad de los hidrogeles fue evaluada usando un ensayo de proliferación celular MTT en células HEP-2. Para esto, las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 2% (v/v), manteniéndose en incubadoras de cultivo celular a una temperatura estable de 37°C, humedad relativa del 95% y ambiente de CO<sub>2</sub> del 5%.

La proliferación celular se midió en función de la capacidad metabólica reductora de enzimas mitocondriales, en un ensayo colorimétrico de reducción de MTT de color amarillo y soluble en agua, a una sal de formazán de color púrpura y soluble en solventes orgánicos. La cantidad de formazán producido correlaciona con el número de células metabólicamente activas y viables. El tratamiento de las células se realizó con incubación en placas de 96 pocillos por 24 h, con fragmentos de 6 mm de diámetro de los distintos hidrogeles. Como control de citotoxicidad se utilizaron células expuestas a Triton X-100 1% v/v, mientras que el control de crecimiento celular fueron células mantenidas con el medio de cultivo sin modificaciones. El ensayo de viabilidad celular se realizó agregando 50 uL del reactivo MTT (10 mg/ml) disuelto en PBS al medio de cultivo, incubándose a 37°C por 4 h. Posteriormente, los cristales de formazán precipitados se disolvieron con isopropil alcohol al 100% a 37°C por 10 min. La absorbancia se midió a 560 nm en el lector de multiplacas.

#### **4.2.8 Evaluación *in vivo* de la actividad regenerativa de la matriz polimérica en un modelo animal murino.**

La evaluación *in vivo* de la actividad regenerativa de los hidrogeles se hizo utilizando 15 ratones hembra CF-1 de entre 6 a 8 semanas de edad, divididos en tres grupos

de cinco animales cada uno. Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal, con una dosis de 80 / 120 mg/kg de ketamina / xilacina. A cada grupo, se le realizaron dos heridas por animal en la parte superior del lomo, con una separación de un centímetro entre ellas. Las heridas se realizaron con un molde filoso circular de 6 mm de diámetro, previamente esterilizado. Se retiró la epidermis, y se cubrió el espacio con los hidrogeles o solución salina (en el caso de los grupos control), posteriormente se cubrió cada herida con un apósito hospitalario estéril. Para la administración de los hidrogeles, estos fueron previamente cortados en fragmentos de 5-6 mm de diámetro por 1-2 mm de altura (tamaño de la herida provocada). A continuación, el detalle de los grupos:

**Grupo control:** Solo se le hizo una herida que fue cubierta con un apósito de gasa común usado en atención hospitalaria.

**Grupo 1:** La herida en el lomo izquierdo fue cubierta con el hidrogel 5 pero sin CuNPs incorporadas, mientras que la herida en el lomo derecho fue cubierta con el mismo hidrogel, pero con CuNPs incorporada. Se le agregó una gasa encima para evitar la caída de los hidrogeles.

**Grupo 2:** La herida en el lomo izquierdo fue cubierta con el hidrogel 4 pero sin CuNPs incorporadas, mientras que la herida en el lomo derecho fue cubierta con el mismo hidrogel, pero con CuNPs incorporadas. Se le agregó una gasa encima para evitar la caída de los hidrogeles.

Los apósitos fueron cambiados cada 2 días, y se tomaron fotos a las heridas a fin de medir el progreso de la cicatrización. Los tratamientos se mantuvieron durante 15 días, esperando el cerrado total de las heridas. Se monitorearon diariamente los parámetros de estrés y alimentación de los animales. Estos se mantuvieron en estado de analgesia, administrando ibuprofeno en el agua durante todo el ensayo y se les realizó seguimiento clínico diario, evaluando signos clínicos como: protección del área con dolor, apetito, actividad, agresividad, expresión facial y corporal; vocalización y respuesta al manejo. Se utilizó la escala "mueca del ratón" (Langford y col., 2010), un sistema de codificación conductual estandarizada con gran precisión y fiabilidad que permite reconocer la sensación física de dolor en ratones, donde clasifican de 0-2 la intensidad de dolor, donde el 0 representa ausencia de dolor, el

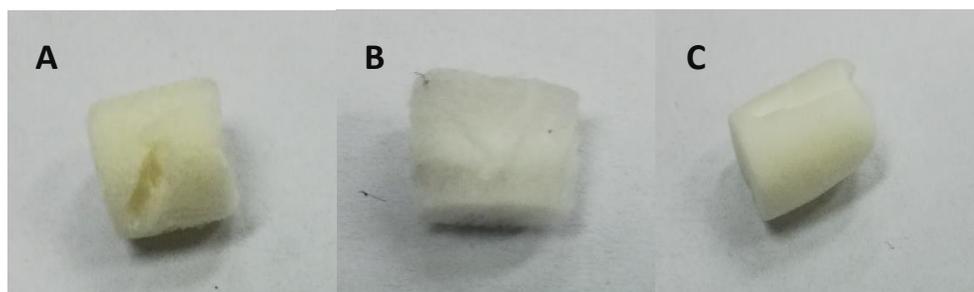
1, un dolor moderado y el 2 un dolor intenso, lo que se refleja en la posición de ojos, el abultamiento de mejillas, en el arrugamiento de la nariz, la posición de las orejas y de los bigotes. La protección del área con dolor se evaluó monitoreando la frecuencia con que el ratón se rascó la zona herida. Se observó si el ratón presentaba cambios en su apetito, monitoreando la cantidad de veces que comía durante el día. También se monitoreó activamente si el ratón presentaba estereotipias de comportamiento como morder las barras, dar vueltas en círculos o excavar repetitivamente. Al final del período de tratamiento, todos los animales fueron eutanasiados. Los procedimientos experimentales con los animales fueron adecuados para no generar sufrimiento o dolor a los mismos, realizando observaciones y mediciones diarias a fin de detectar alteraciones, estrés o sufrimiento animal, que obligaran a detener el ensayo. Para esto el personal encargado del manejo animal siguió la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de Conicyt; y las indicaciones del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Hidrogeles obtenidos por *freeze-thawing*.

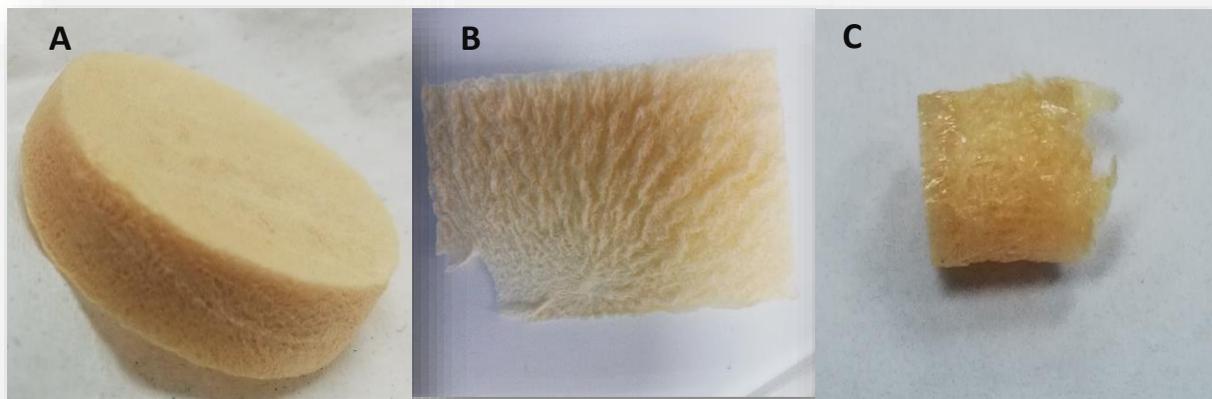
Se obtuvieron tres tipos de hidrogeles mediante la síntesis por método de *freeze-thawing* (Figura 8). Los hidrogeles obtenidos fueron de un tamaño de 0,5 x 0,5 cm y con la forma del molde en el que se liofilizaron, correspondiente a una placa de 96 pocillos. El hidrogel 1 (Figura 8.A) que contenía 5% de quitosano tomó un color amarillo, mientras que los compuestos de almidón (Figura 8.B y 8.C) fueron de un color blanco.



**Figura 8:** Hidrogeles obtenidos por método *freeze-thawing*. A) Hidrogel 1: quitosano-almidón. B) Hidrogel 2: almidón C) Hidrogel 3: almidón-PVA.

### 5.2 Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico con glutaraldehído.

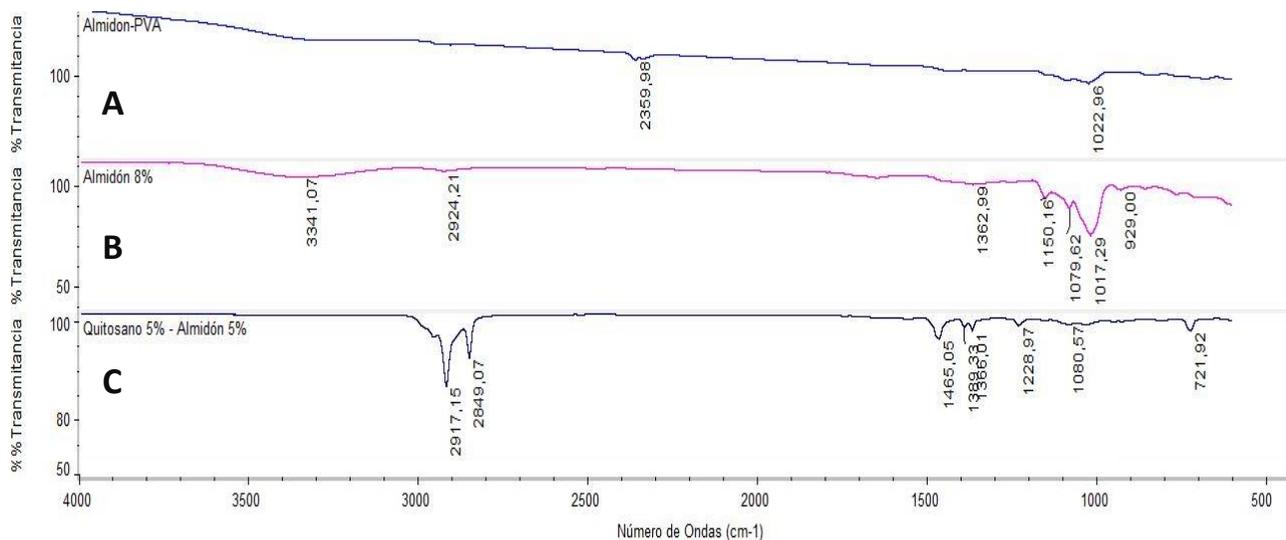
Se obtuvieron dos tipos de hidrogeles mediante entrecruzamiento químico con glutaraldehído (Figura 9). Los dos tipos de hidrogeles fueron de un color anaranjado, marcando una diferencia con los hidrogeles anteriores. El hidrogel 4 correspondiente a quitosano-almidón-PVA-PEG tuvo un tamaño de 2 x 2 cm debido al molde en que se liofilizó (Figura 9.A). Del hidrogel 5 obtuvimos dos modelos: Un modelo de 5 cm de ancho y 10 cm de largo que pese a tener un grosor de 0,5 mm (Figura 9.B), mantenía su estructura al sacarlo del molde; y otro modelo de 0,5 x 0,5 cm similar a los hidrogeles obtenidos por *freeze-thawing*, ya que se usó el mismo molde, la placa de 96 pocillos.



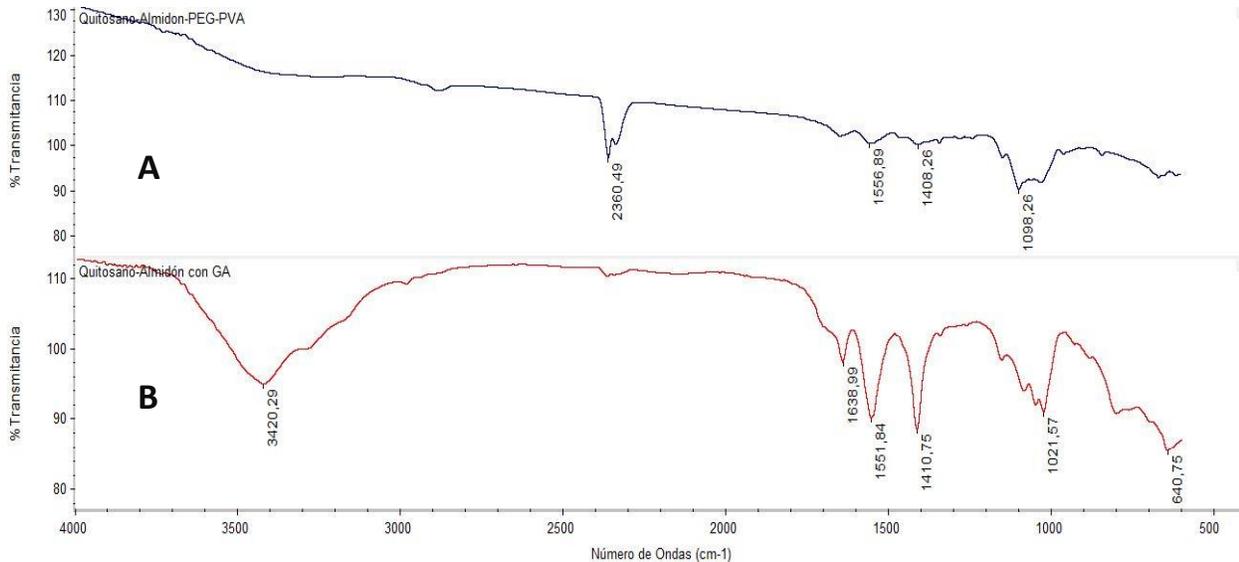
**Figura 9:** Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico con glutaraldehído. A) Hidrogel 4: quitosano-almidón-PVA-PEG B) Hidrogel 5: quitosano-almidón en molde de 10 x 5 cm C) Hidrogel 5: quitosano-almidón en molde de placa de 96 pocillos.

### 5.3 Caracterización de grupos funcionales por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.

Se obtuvieron los espectros FT-IR de los hidrogeles obtenidos por método *freeze-thawing* (Figura 10) y los obtenidos por entrecruzamiento químico con glutaraldehído (Figura 11). Con estos espectros fue posible identificar los grupos funcionales que componen los hidrogeles y relacionarlos con algunas de las propiedades observadas.



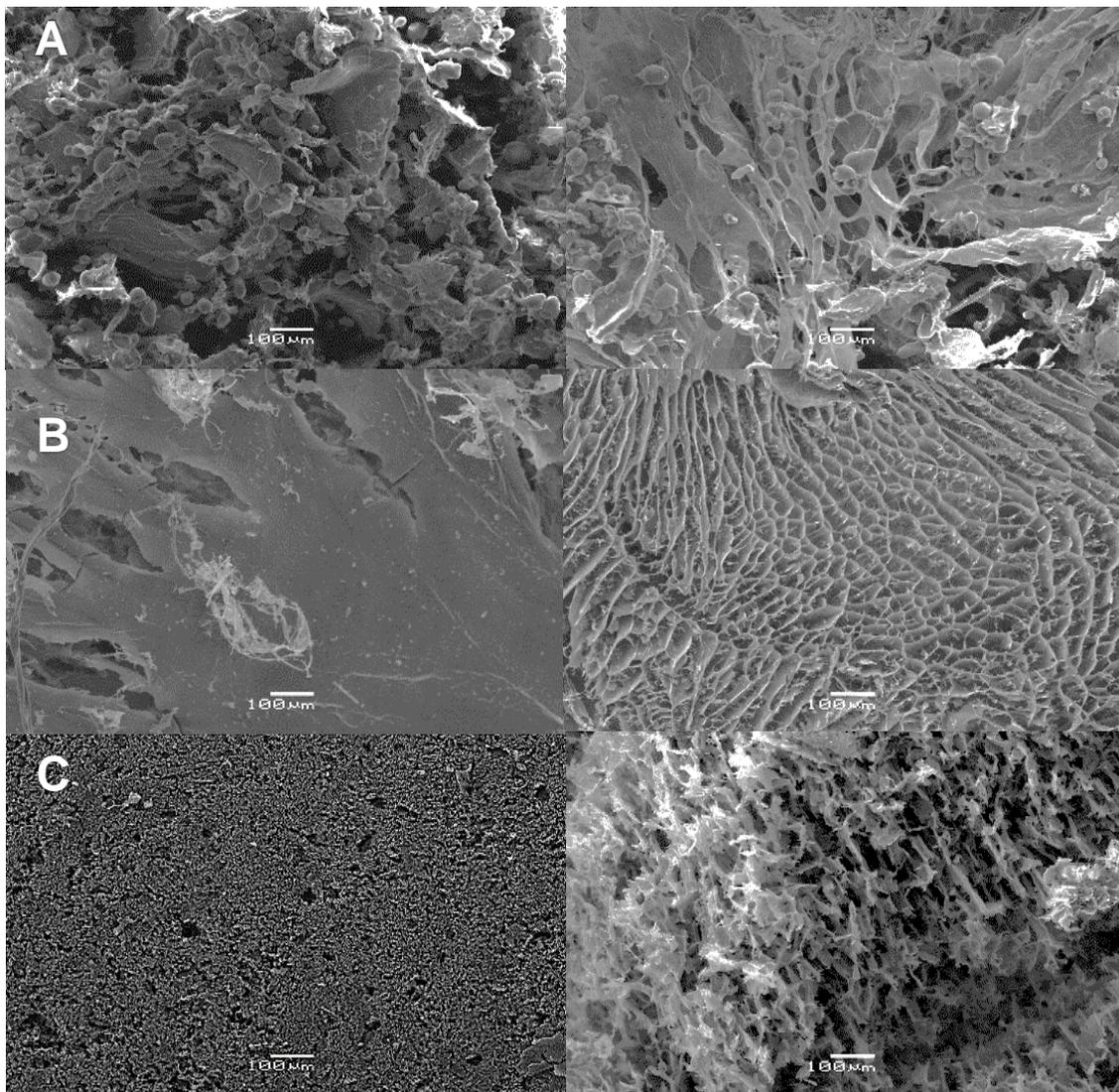
**Figura 10:** Espectros FT-IR de hidrogeles por método de *freeze-thawing*. A) Hidrogel 3: almidón-PVA. B) Hidrogel 2: almidón. C) Hidrogel 1: quitosano-almidón.



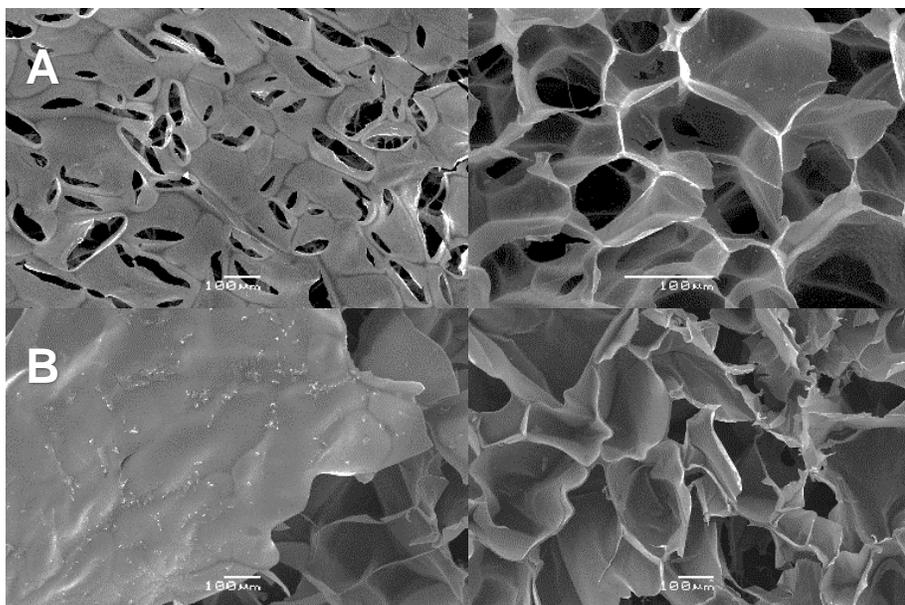
**Figura 11:** Espectros FT-IR de hidrogeles por entrecruzamiento químico con glutaraldehído. A) Hidrogel 4: quitosano-almidón-PEG-PVA. B) Hidrogel 5: quitosano-almidón.

#### 5.4 Evaluación de la morfología de los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido.

Al analizar los hidrogeles sintetizados mediante SEM, se obtuvieron imágenes de la matriz polimérica y morfología tanto del interior como de la superficie de los hidrogeles generados por el método de *freeze-thawing* (Figura 12) y por entrecruzamiento químico con glutaraldehído (Figura 13). Se observó la formación de redes no homogéneas en los hidrogeles sintetizados por método *freeze-thawing*, mientras que, en aquellos hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico, se observó una estructura tridimensional más ordenada y uniforme.



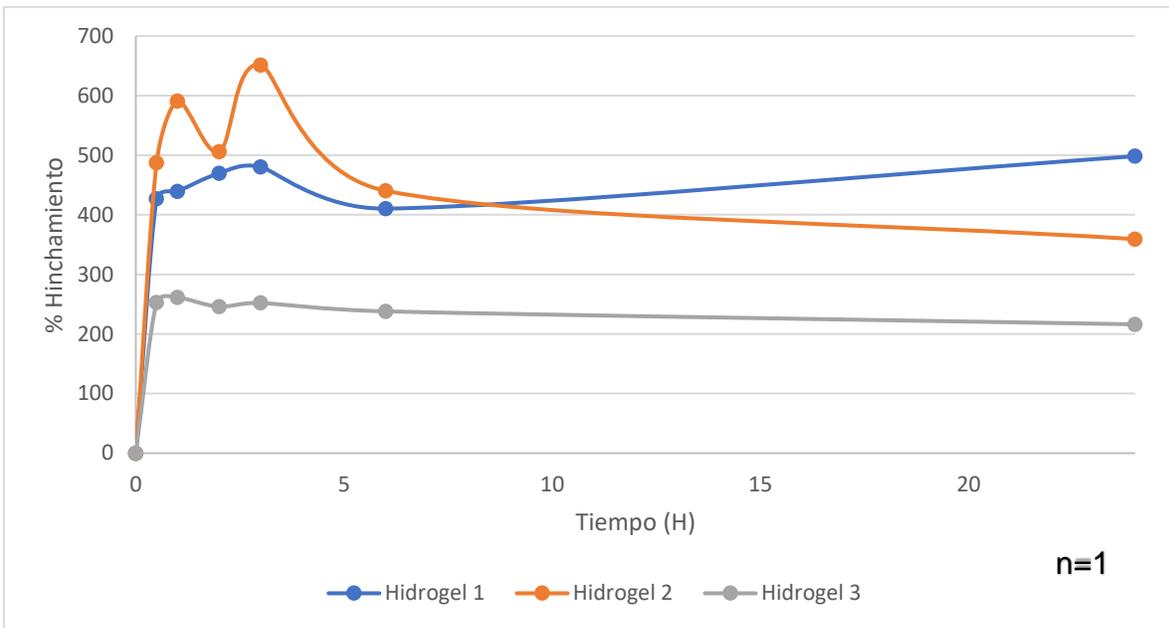
**Figura 12:** Imágenes SEM de hidrogeles obtenidos por el método de *freeze-thawing*. A la izquierda una imagen de la superficie y a la derecha una imagen del interior de los hidrogeles de A) Hidrogel 1: quitosano-almidón. B) Hidrogel 2: almidón. C) Hidrogel 3: almidón-PVA.



**Figura 13:** Imágenes SEM de hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento con glutaraldehído. A la izquierda una imagen de la superficie y a la derecha una del interior de los hidrogeles de A) Hidrogel 4: quitosano–almidón–PEG-PVA. B) Hidrogel 5: quitosano-almidón.

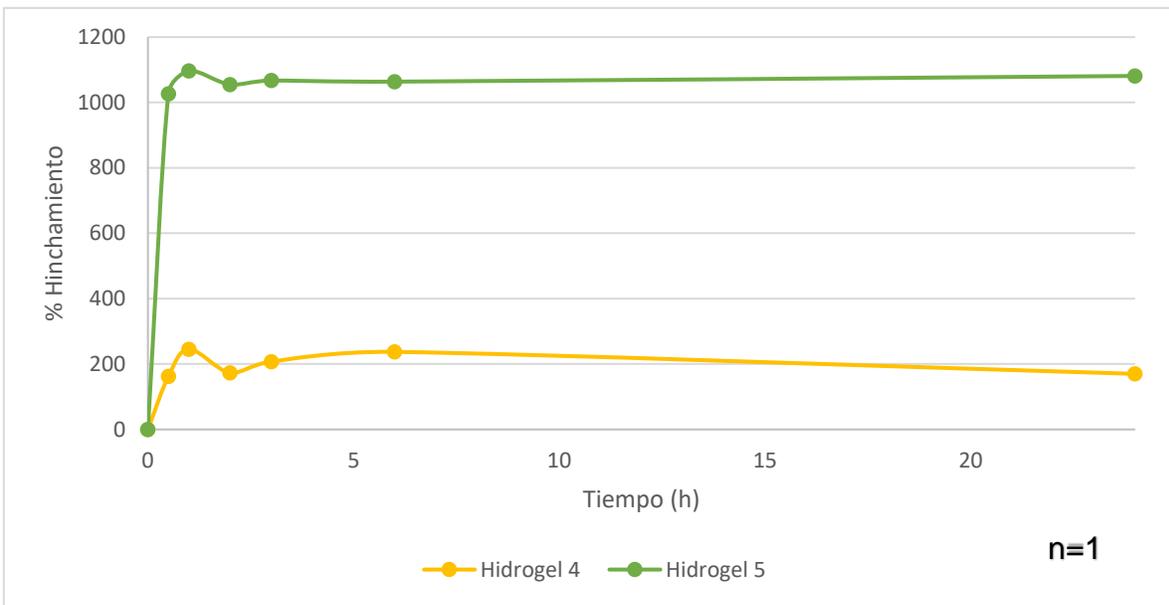
#### 5.4 Capacidad de hinchamiento del hidrogel.

De los hidrogeles sintetizados por el método de *freeze-thawing*, el hidrogel 1 fue el que mostró mayor capacidad de retener líquido durante las 24 h que duró el experimento (Figura 14). Los tres hidrogeles obtenidos por el método físico tuvieron problemas para mantener su estructura, perdiendo parte de ella en el proceso y dificultando su manipulación con las pinzas, ya que se hacía difícil sacarlos de la solución de PBS con ellas sin poner en riesgo su integridad estructural. En contraste, los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído mantuvieron su rigidez durante todo el experimento y, además, en el caso del hidrogel 5, hubo una capacidad de hinchamiento superior a la de los hidrogeles generados por *freeze-thawing* (Figura 15).

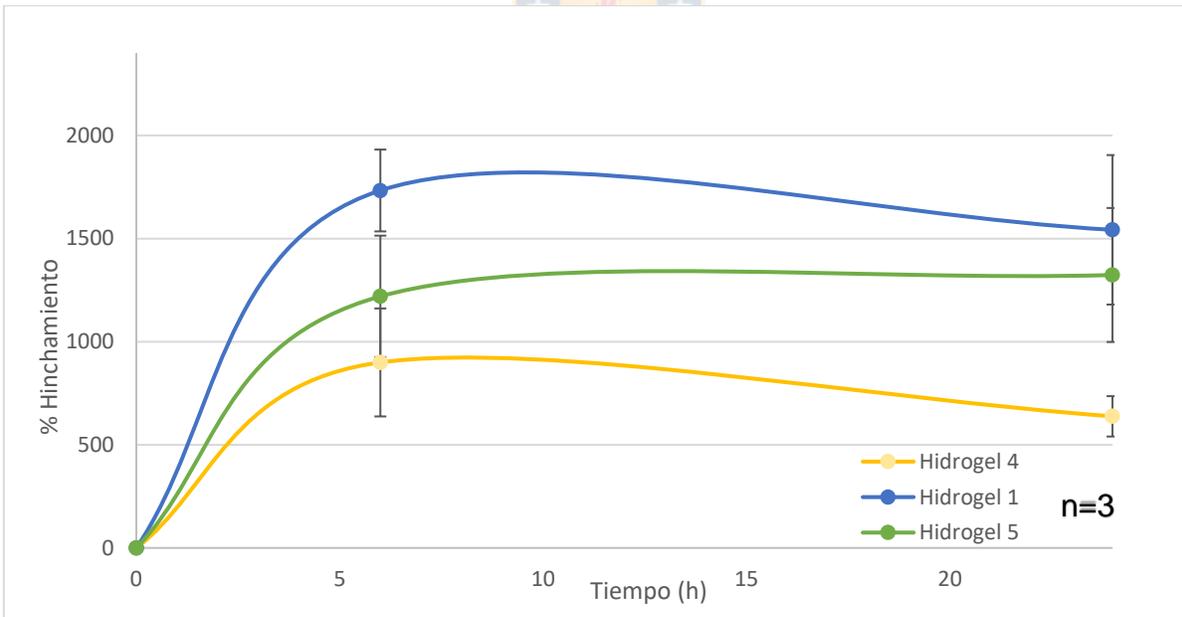


**Figura 14:** Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por método de *freeze-thawing* durante un período de 24 h. Los hidrogeles liofilizados se sumergieron en solución hidrofílica (PBS) y se masaron a distintos intervalos de tiempo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió repetir la evaluación de hinchamiento del hidrogel 1, ya que fue el que tuvo un mayor porcentaje de hinchamiento / estabilidad morfológica de los hidrogeles sintetizados por *freeze-thawing*, en comparación a los dos hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído (hidrogel 4 y 5). En esta segunda evaluación, los hidrogeles de 1 y 5 fueron los que alcanzaron los porcentajes de hinchamiento más altos, superando ambos al hidrogel 4 (Figura 16). Sin embargo, la estructura del hidrogel 1 se vió debilitada y perdió parte de ella, mientras que los hidrogeles 4 y 5 mantuvieron su estructura sin problemas.



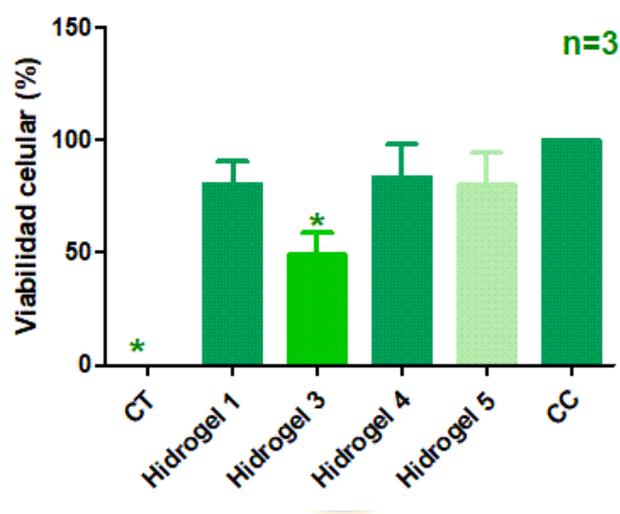
**Figura 15:** Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico con glutaraldehído durante un período de 24 h. Los hidrogeles liofilizados se sumergieron en solución hidrofílica (PBS) y se masaron a distintos intervalos de tiempo.



**Figura 16:** Comparación de la capacidad de hinchamiento del hidrogel quitosano-almidón obtenido por método *freeze-thawing* (hidrogel 1), con los hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento químico con glutaraldehído (hidrogeles 4 y 5) durante un período de 24 h. Los hidrogeles liofilizados se sumergieron en solución hidrofílica (PBS) y se masaron a distintos intervalos de tiempo.

### 5.5 Resultados de la evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica del hidrogel en células HEP-2 mediante ensayo de viabilidad celular.

Los ensayos de viabilidad en células HEP-2 demostraron que los hidrogeles 1, 4 y 5 no resultan tóxicos para las células (Figura 17), ya que no se encontraron diferencias significativas entre la viabilidad de las células incubadas con fragmentos de los hidrogeles por 24 h y el control de crecimiento celular (CC). En contraparte, el hidrogel 3 disminuyó significativamente la viabilidad del cultivo celular, con un porcentaje viabilidad inferior al 50%, lo que indica que no es biocompatible.

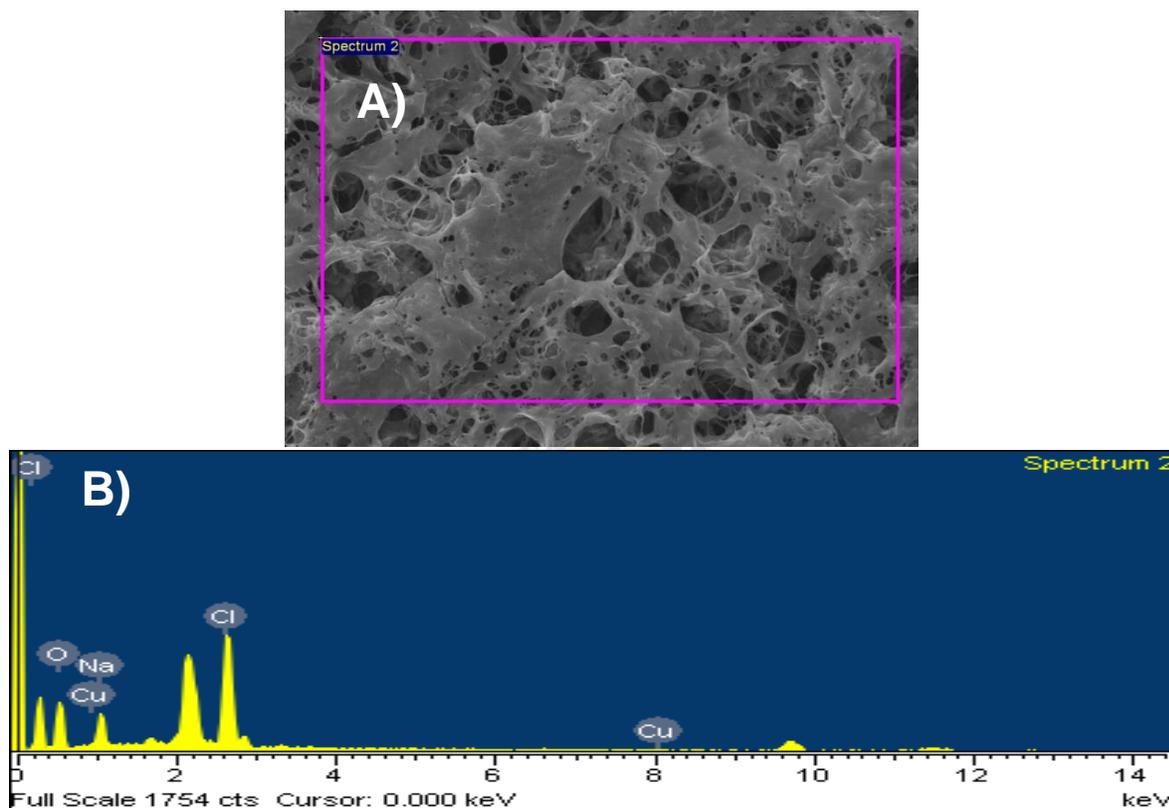


**Figura 17:** Evaluación de la viabilidad en la línea celular HEP-2 tratadas con los diferentes tipos de hidrogel sintetizados. Se midió la actividad metabólica celular mediante el ensayo MTT. Los resultados fueron normalizados, tomándose el control de toxicidad como 0% de viabilidad y el de crecimiento celular como 100%. (\* Diferencia estadísticamente significativa detectada por análisis ANOVA de con  $p < 0,05$ ).

A partir de estos resultados, se decidió no continuar haciendo pruebas con el hidrogel 3, ya que la biocompatibilidad es esencial para validar cualquier tipo de material que se desee utilizar en la ingeniería de tejidos.

## 5.6 Incorporación de CuNPs en los hidrogeles.

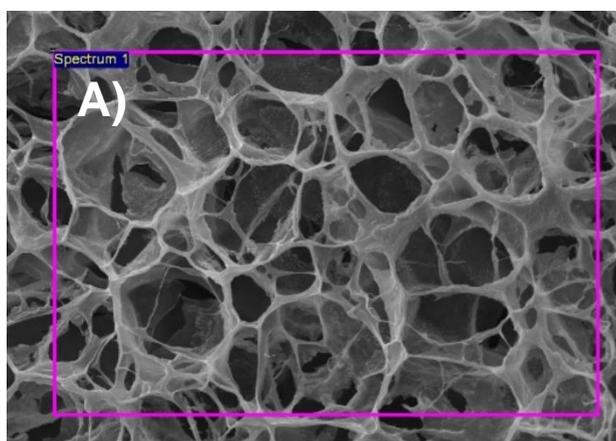
La incorporación de CuNPs se corroboró mediante análisis SEM-EDX (Figura 18 y 19) y también por TEM-EDX (Figura 20). El espectro EDX del hidrogel 4 (Figura 18. B) evidencia señales equivalentes al 0,56% del peso del hidrogel (Tabla 5). El espectro EDX del hidrogel 5 (Figura 19.B) también detectó señales de cobre equivalentes al 1,11% del peso total del hidrogel (Tabla 6), mientras que el análisis EDX de la muestra enviada a TEM (Figura 20) detectó cantidades de cobre equivalentes a 1,51% del peso total del hidrogel.



**Figura 18:** Análisis de energía dispersiva del hidrogel 4. A) Zona del hidrogel a la que se le realizó el análisis EDX; B) Espectrograma EDX de la composición química del hidrogel , donde se puede observar que se detectó cobre en la zona analizada.

**Tabla 5:** Evaluación cuantitativa de la composición química de la zona analizada del hidrogel 4 mediante energía dispersiva de rayos X.

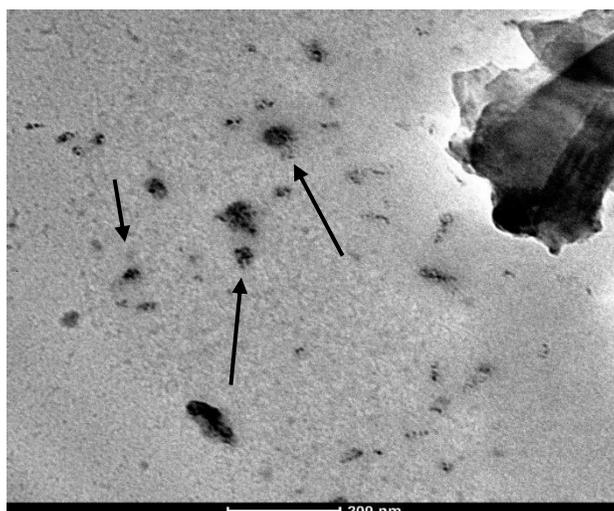
Elemento	%Peso	%Atómico
O K	68.86	80.44
Na K	11.45	9.30
Cl K	19.13	10.09
<b>Cu K</b>	<b>0.56</b>	<b>0.17</b>
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	



**Figura 19:** Análisis de energía dispersiva del hidrogel 5. A) Zona del hidrogel a la que se le realizó el análisis EDX; B) Espectrograma EDX de la composición química del hidrogel, donde se puede observar que se detectó cobre en la zona analizada.

**Tabla 6:** Resultado EDX cuantitativo de la composición química de la zona analizada del hidrogel 5.

Elemento	% Peso	%Atómico
O K	59.10	74.21
Na K	11.47	10.03
Cl K	25.19	14.28
K K	0.72	0.37
<b>Cu K</b>	<b>3.52</b>	<b>1.11</b>
<b>Totals</b>	100.00	



	C	N	O	Cl	Cu
Promedio % masa	38,83	14,39	23,02	22,52	1,51
S.D.	4,92	2,80	3,57	6,35	0,78

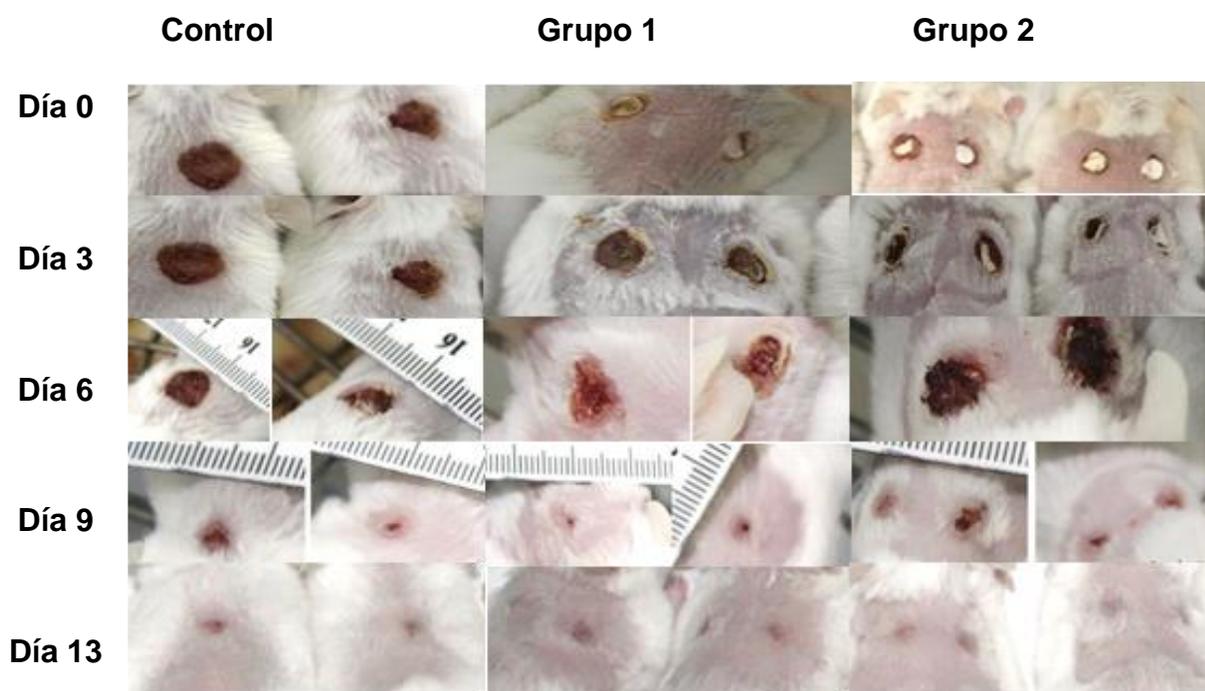
**Figura 20:** Evaluación de la incorporación de CuNPs a los hidrogeles, imagen obtenida por TEM. Las flechas señalan las CuNPs agregadas encontradas en una muestra del hidrogel 5. Abajo se muestra el resultado del análisis EDX indicando un 1,51% masa de cobre total en la muestra.

Estos resultados confirman que los hidrogeles pudieron incorporar las CuNPs, ya que no existe ningún otro componente en los hidrogeles que pudiese haber dado origen a las señales de cobre detectadas por el equipo.

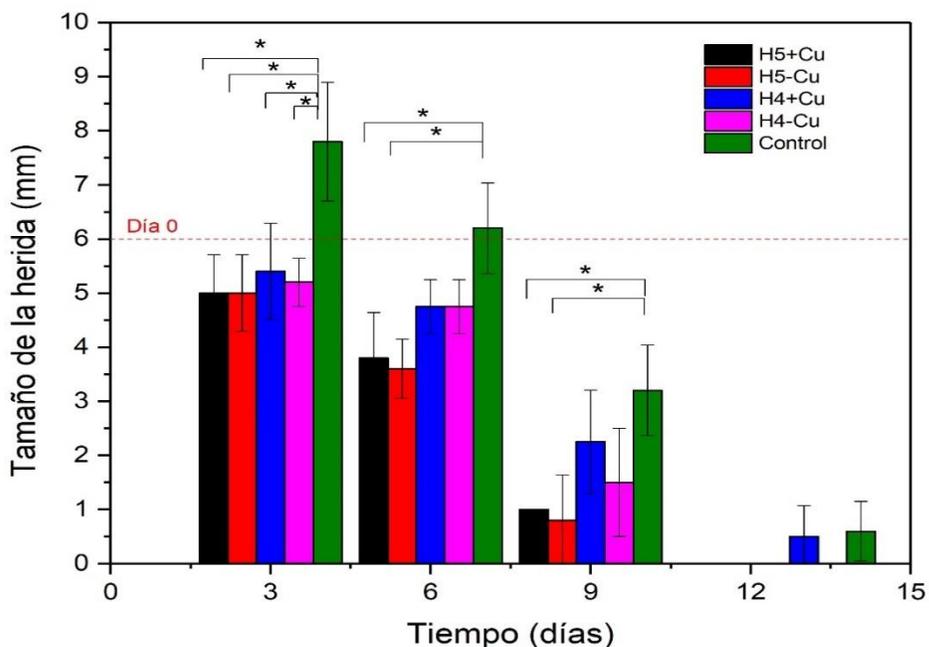
### 5.7 Evaluación *in vivo* de la actividad regenerativa de los hidrogeles en un modelo animal de ratón.

Se trabajó con ratones hembra CF-1 a los que se les realizaron heridas en el dorso y posteriormente fueron recubiertas con diferentes combinaciones de hidrogeles sintetizados. Se observó la rapidez de cicatrización de la herida y el comportamiento de los animales.

Los dos grupos tratados con hidrogeles tuvieron una cicatrización más rápida que el grupo control. Al sexto día, los hidrogeles ya habían sido degradados y las heridas estaban más cerradas que el grupo control (Figura 21). El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía con  $p < 0,05$  determinó que, al tercer día, el tamaño de las heridas tratadas con hidrogeles era significativamente menor (Figura 22) que las del grupo control.



**Figura 21:** Evaluación del proceso de cicatrización de las heridas tratadas con diferentes tipos de hidrogel. Ratones del grupo control, cuya herida fue cubierta con gasa; grupo 1 cuya herida fue tratada con el hidrogel 5 y grupo 2 cuya herida fue tratada con el hidrogel 4, durante el transcurso de 13 días.



**Figura 22:** Comparación del tamaño de las heridas en los ratones control con respecto a los animales que fueron tratados con hidrogeles. La nomenclatura H5+Cu/H5-Cu corresponde a las heridas tratadas con el hidrogel 5 con y sin CuNPs respectivamente, mientras que H4+Cu/H4-Cu corresponde a las heridas tratadas con el hidrogel 4 con y sin CuNPs respectivamente. (\* Diferencia estadísticamente significativa detectada por análisis ANOVA con  $p < 0,05$ ).

No se observaron conductas de estrés, dolor u otro malestar en los animales del grupo 1. Sin embargo, en algunos animales del grupo 2, específicamente aquellos con hidrogeles incorporados con CuNPs varios ratones intentaron rascarse la herida y mostraron comportamientos similares a los del grupo control.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Estructura, estabilidad y capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por método de *freeze-thawing*.

El método de síntesis seleccionado tuvo implicancias determinantes en las propiedades y estructura de los hidrogeles generados, los cuales mostraron distinto color, resistencia y capacidad de hinchamiento. La decisión de sintetizar un hidrogel solo de almidón y otro de almidón-PVA fue analizar las posibilidades que ofrecía este polímero en ausencia de quitosano. La evaluación por SEM de los hidrogeles entrecruzados por método de *freeze-thawing* (Figura 12), indican la presencia de estructuras variadas. El hidrogel 1 (Figura 12.A) presentó una estructura superficial irregular y un interior formado de pequeñas redes irregulares similar a otros hidrogeles de quitosano reportados (Ribeiro y col., 2009). Su espectro FT-IR (Figura 10.C) muestra una banda característica del quitosano en  $2920\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión de los enlaces C-H y se observaron algunas bandas, aunque de menor intensidad, en  $1465\text{ cm}^{-1}$ , que puede atribuirse a las vibraciones C-H de ambos polímeros. En el hidrogel 2 (Figura 12.B) se observó una estructura superficial lisa y un interior formado por redes uniformes bien definidas de aproximadamente  $150\text{ nm}$  de diámetro, dando un aspecto rugoso. No obstante, a pesar de tener una estructura ordenada, fue el que más rápido perdió se deformó al entrar en contacto con el agua. Esto puede deberse a que las interacciones iónicas entre las cadenas poliméricas otorgan rigidez a la estructura del hidrogel, pero en presencia de un solvente, estas interacciones se debilitan y las cadenas forman puentes de hidrógeno con el solvente, provocando su disolución. De hecho, en su espectro FT-IR (Figura 10.B), tenía una banda con tres picos entre  $1017\text{ cm}^{-1}$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$  la cual es característica de los polisacáridos y es atribuida a las deformaciones de tensión de C-O-C y la flexión de -OH (Ruiz, 2006). También se identificó una banda en  $3281\text{ cm}^{-1}$  que puede corresponder a la vibración de tensión de grupos -OH del almidón o del agua (humedad) (Henaó, 2018). Una alta presencia de estos grupos en su superficie es la que podría facilitar su afinidad con el solvente, comprometiendo su estructura. Mientras que en el hidrogel 3 (Figura 12.C) se observó una estructura superficial más porosa, y una interior también con algunas redes, pero no tan definidas como las del hidrogel 2. Se observaron dos bandas en su espectro FT-IR (Figura 10.A), siendo la

más notoria  $2359\text{ cm}^{-1}$ , una banda característica de PVA correspondiente al estiramiento simétrico de grupos  $-\text{CH}_2$  (Ghabboun, 2012). Este espectro difiere bastante al del hidrogel 2 a pesar de que ambos tienen almidón como componente, sugiriendo una fuerte interacción entre este polímero y el PVA, que le permitió resistir mejor la exposición al agua

Se sabe que, en los entrecruzamientos físicos, las fuerzas que gobiernan el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas son fuerzas de Van der Waals, iónicas e hidrofóbicas. Como consecuencia, la estructura de este tipo de hidrogeles tiende a ser menos rígida, lo que no es necesariamente un problema dependiendo del uso que se le quiera dar. En algunos casos, estructuras menos rígidas permiten una mayor capacidad de hinchamiento, que puede usarse para encapsular mayores cantidades de algún compuesto bioactivo. Sin embargo, los hidrogeles entrecruzados físicamente no tuvieron una capacidad de hinchamiento superior a la de los hidrogeles entrecruzados químicamente. La única excepción fue el hidrogel 1, que demostró tener una mayor capacidad de hinchamiento que el hidrogel 4 (Figura 16). En el caso de los hidrogeles 1 y 3, la interacción entre los grupos  $-\text{NH}$  y  $-\text{OH}$  del quitosano y PVA respectivamente, con los grupos  $-\text{OH}$  del almidón, les proporcionó mayor estabilidad que al hidrogel 2, pero en general los tres hidrogeles deformaban con mayor facilidad en contacto con PBS que aquellos sintetizados por entrecruzamiento químico. Estos resultados sugieren que un hidrogel compuesto solamente de almidón por entrecruzamiento físico no presenta una estructura adecuada para ser usado como apósito para heridas.

## **6.2 Estructura, estabilidad y capacidad de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico.**

Para asegurar que la estructura del hidrogel fuera resistente al contacto con solventes hidrofílicos (PBS), fue necesario utilizar un método de entrecruzamiento químico. El glutaraldehído ha sido frecuentemente utilizado para entrecruzar quitosano (Prashanth y Tharanathan, 2006; Kildeeva y col., 2009), por lo que se decidió utilizar este agente. La cantidad de glutaraldehído que se debía agregar se determinó mediante ensayo experimental, probando concentraciones recomendadas en literatura (Mirzaei y col., 2013) hasta obtener un hidrogel con estructura estable.

Los resultados fueron los esperados, ya que se obtuvieron hidrogeles con una estructura interior de redes uniformes bien definidas, con porosidades de tamaño similar y homogéneos (Figura 13), que mantuvieron su estructura sin problemas al estar en contacto con PBS. La superficie del hidrogel 5 (Figura 13.B) fue más lisa que la del hidrogel 4 (Figura 13.A), que presentó algunas porosidades. Con respecto a los espectros FT-IR (Figura 11), en ambos hidrogeles se detectaron bandas entre  $1021\text{ cm}^{-1}$  y  $1098\text{ cm}^{-1}$  que podrían corresponder a la flexión -OH y tensión C-O-C proveniente del almidón, mientras que entre  $1550\text{ cm}^{-1}$  y  $1639\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas de estiramiento de C=O del grupo amida II provenientes de grupos glucosamina del quitosano (Henaó y col., 2018). También se detectaron bandas pronunciadas en  $1410\text{ cm}^{-1}$  (Figura 11.B) y  $1408\text{ cm}^{-1}$  (Figura 11.A), que pueden corresponder a las vibraciones de flexión de grupos C-H de quitosano y almidón. Una particularidad del espectro FT-IR del hidrogel 4 (Figura 11.A) fue la presencia de una banda en pico  $2360\text{ cm}^{-1}$ , característico del PVA y ausencia de bandas característica de quitosano y almidón sobre  $3000\text{ cm}^{-1}$ , indicando la formación de nuevos enlaces entre estos polímeros que no están presentes ni en los hidrogeles por *freeze-thawing* ni en el hidrogel 5. El espectro FT-IR del hidrogel 5 (Figura 11.B) presentó una banda distintiva en  $3420\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones de tensión de grupos OH del almidón y estiramiento de N-H del grupo amida I del quitosano respectivamente (Brugnerotto y col., 2001; Escobar, 2014). Resulta interesante comparar este espectro con el hidrogel 1 debido a que están compuestos por los mismos polímeros y en la misma concentración, difiriendo solo en la adición de glutaraldehído. Esto sugiere un reordenamiento de los grupos -OH y  $\text{NH}_2$  debido a la presencia de nuevos enlaces covalentes que no existen en los hidrogeles sintetizados por *freeze-thawing* y que le otorgaron mayor rigidez a la estructura polimérica (Gulrez y col., 2011).

La evaluación de la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles (Figura 15), mostró diferencias entre el hidrogel 4 que tuvo porcentajes de hinchamiento cercanos al 200%, en comparación a los más de 1000% alcanzados con el hidrogel 5. Como el hidrogel 1 fue el que mostró mejores resultados anteriormente, se comparó su capacidad de hinchamiento con la de los hidrogeles 4 y 5 (Figura 16). Esta vez, con un análisis estadístico, se determinó que los hidrogeles compuestos solamente de quitosano-almidón (hidrogel 1 y 5), tuvieron una capacidad de hinchamiento

significativamente mayor al hidrogel 4, sugiriendo de esta forma que la combinación quitosano-almidón es la más efectiva.

### **6.3 Biocompatibilidad de los hidrogeles.**

Asegurar la biocompatibilidad de los hidrogeles fue lo más importante. Por esta razón, el glutaraldehído se mantuvo en las concentraciones más bajas posibles. Este compuesto puede reaccionar con los grupos amino y tiol de ciertas proteínas lo que le otorga efectos bactericidas (Monticello y Askew, 2012), pero también a concentraciones superiores a un 8% de solución se han reportado efectos citotóxicos en las células (Lin y col., 1998).

Los resultados del ensayo de viabilidad por MTT (Figura 17) comprobaron que la cantidad de glutaraldehído no causó una disminución significativa en la viabilidad celular, demostrando que los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento químico son biocompatibles. Por otro lado, el hidrogel 1 también demostró ser biocompatible, apoyando nuestra hipótesis de que la combinación quitosano-almidón resulta en un hidrogel con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos. No obstante, el hidrogel 3 tuvo un efecto citotóxico significativo en las células. Considerando que tanto el PVA como el almidón son biocompatibles de forma natural (Mansur, 2009; Perez, 2018), otros factores relacionados a la estructura del hidrogel podrían estar contribuyendo a este resultado. La estructura rígida del hidrogel 3 podría estar afectando el flujo de sustancias que atraviesan sus poros, dando origen a áreas con menor acceso a nutrientes en la placa. Específicamente, la formación de redes rígidas en hidrogeles de PVA indica la existencia de enlaces intra e inter poliméricos que disminuyen el número de grupos hidrofílicos expuestos y reducen su capacidad de hinchamiento, manteniendo al hidrogel más seco. Esto crea una barrera para el crecimiento celular, lo que se traduce en menores valores de viabilidad celular (Mansur, 2009; Tang y Alavi, 2011). En algunos estudios de hidrogeles de PVA-almidón se ha observado que mayores concentraciones de almidón, aumentan la capacidad de hinchamiento (Hsie y Liau, 2013), mientras que mayores concentraciones de PVA tiene efectos negativos en la viabilidad celular (Bernal-Ballen y col., 2019). De acuerdo con estos antecedentes, para mejorar la viabilidad del hidrogel, se podría aumentar la cantidad de almidón y disminuir la de PVA. Sin embargo, considerando los buenos resultados

que se obtuvieron con los hidrogeles quitosano-almidón, se descartó seguir trabajando con el hidrogel 3.

#### **6.4 Efecto de los hidrogeles en la regeneración del tejido.**

La adición de CuNPs se hizo pensando no solo en otorgar una actividad antimicrobiana (Correa y col., 2020) , sino también porque se ha reportado que la interacción entre estas y el quitosano disminuye la cantidad de citoquinas proinflamatorias, incrementa la expresión de VEGF; y estimula la proliferación y migración de fibroblastos (Gopal y col., 2014).

Los hidrogeles se adhirieron inmediatamente al entrar en contacto con el tejido de la herida y adsorbieron la sangre que estaba en la superficie epitelial. Esta adhesión instantánea puede ser atribuida al grado de desacetilación (DD) del quitosano usado, que era del rango de 75-85%. Un alto DD permite la interacción de grupos catiónicos  $\text{NH}_3^+$  con glucosaminoglicanos, proteoglicanos y otras moléculas cargadas negativamente presentes en la membrana celular (Ribeiro y col., 2009). De esta forma, los hidrogeles se unieron de manera electroestática a la piel, que tiene carga negativa (Hong y col., 2008).

Hay elementos importantes a señalar con respecto al tercer día del experimento. En el grupo 1 y 2, los hidrogeles que contenían cobre estaban mucho más hidratados y/o absorbidos que aquellos sin cobre. Las heridas estaban secas, no se observó exudado y en todas había presencia de una costra dura. Tampoco se observó inflamación ni enrojecimiento en los alrededores de la lesión. En varios casos se observó reducción del área de la herida y un recogimiento del tejido. Esto se registró no solamente de manera visual (Figura 21, día 3), sino que al cuantificarlo (Figura 22), se obtuvieron diferencias significativas en comparación al grupo control, cuyas heridas tenían exudado y no estaban cubiertas totalmente por una costra. Además, presentaban inflamación y enrojecimiento en los alrededores, observándose incremento del diámetro de las heridas. En el ámbito conductual, en el grupo 2 los ratones trataron de sacarse la gasa, sugiriendo una reacción alérgica al hidrogel, posiblemente al que contenía CuNPs.

Al sexto día las diferencias entre los grupos tratamiento y control seguían siendo significativas (Figura 22). Por otro lado, los hidrogeles ya se habían desintegrado, quedando la costra protectora en los ratones descubierta (Figura 21, día 6). Se observó aparición de nuevo tejido en varios ratones de los grupos tratamiento, indicando una transición a la fase proliferativa, mientras que los ratones del grupo control seguían con síntomas de la etapa de inflamación. No se observaron diferencias significativas entre los hidrogeles con y sin CuNPs.

Al noveno día, los ratones del grupo 1 seguían manteniendo un ritmo de regeneración significativamente superior al grupo control (Figura 22), con heridas casi totalmente sanadas indicando etapa de maduración. Por el contrario, los ratones del grupo 2 y control redujeron sus diferencias, con este último grupo aún mostrando algunos ratones con enrojecimiento. Ya al decimotercer día, la mayor parte de los ratones de los tres grupos se encontraba con heridas cicatrizadas.

Lo que sucedió con el grupo 2 pudo ser un efecto causado por la propia composición del hidrogel 4, o en su combinación con CuNPs, que se sabe pueden generar iones de cobre con actividad citotóxica (Song y col., 2015). Estos iones pueden producirse por la oxidación de CuNPs expuestas al aire o por el contacto con un solvente, que en este caso pudo ser el exudado y sangre de la herida. Se ha visto que estos iones incluso pueden tener efectos dañinos en los hígados de ratones (Cholewinska y col., 2018). Esta toxicidad es dosis dependiente y ocurre por la disolución de iones de cobre que se acumulan en el tejido y resultan en la generación de ROS. Si las CuNPs llegan hasta la capa dermis, donde las NPs pueden entrar a la vasculatura sanguínea, puede ocurrir una toxicidad sistémica (Mohandas y col., 2018). Como los ratones fueron eutanasiados posteriormente de transcurridos 15 días, no es posible determinar si las CuNPs pudieron tener un efecto tóxico a largo plazo en los ratones, pero si nos permite tener cuidado con regular la dosis de CuNPs que se debe aplicar en futuros experimentos. Así mismo, puede que la ausencia de una reacción alérgica a los hidrogeles con CuNPs en el grupo 1, se deba a que el hidrogel 5 posee una concentración más alta de quitosano que puede interactuar con las CuNPs. Podría haber un efecto antimicrobiano de los hidrogeles, aunque esto no fue estudiado.

Tanto en presencia del cobre como en su ausencia, este efecto puede ocurrir también por la presencia de quitosano

En general, los hidrogeles disminuyeron el tiempo de cicatrización en comparación con los controles negativos sin hidrogel, acelerando el proceso de regeneración epitelial, siendo el hidrogel 5 con y sin CuNPs el que obtuvo los mejores resultados. Además, disminuyeron los efectos adversos asociados al proceso de inflamación, controlaron la aparición de exudados y garantizaron un secado más rápido de las heridas, lo que resultó conveniente para la aparición de la costra protectora y la cicatrización. La adición de CuNPs no demostró tener efectos significativos en los grupos de tratamientos e incluso pudo haber generado un efecto alérgico en los ratones del grupo 2. Finalmente, este trabajo fue la primera aproximación de este laboratorio en el desarrollo de hidrogeles en la ingeniería de tejidos, obteniéndose resultados prometedores. En el futuro se hace necesario estudiar con mayor detalle este efecto acelerador de la regeneración epitelial, midiendo la expresión de proteínas como TGF- $\beta_1$ , VEGF, EGF y TNF- $\alpha$ ; estudiar la posibilidad de encapsular proteínas y otros compuestos bioactivos para aplicar en heridas y hacer ensayos en un modelo de animal diabético para determinar si este efecto acelerador es capaz de revertir los efectos negativos de esta enfermedad en el proceso de cicatrización.

## 7. CONCLUSIONES.

En esta investigación se logró generar y estandarizar un protocolo para la síntesis de un hidrogel compuesto de quitosano-almidón previamente no descrito en literatura. Además, se caracterizó este hidrogel y se evaluó su actividad regenerativa *in vivo*, demostrando tener una potencial aplicación en la ingeniería de tejidos. De esta investigación se puede concluir que:

- El quitosano y almidón pueden formar hidrogeles biocompatibles, con alta capacidad de hinchamiento, que pueden incorporar CuNPs y acelerar significativamente el proceso de cicatrización en los ratones.
- La mezcla del método de *freeze-thawing* con entrecruzamiento químico con glutaraldehído genera hidrogeles con estructuras más ordenadas, uniformes y rígidas que los sintetizados solamente por el método *freeze-thawing*.

De esta manera, se demostró que los hidrogeles sintetizados tienen potencial aplicación en la ingeniería de tejidos como apósito para heridas, corroborando nuestra hipótesis y cumpliendo los objetivos propuestos en esta tesis.

## 8. PROYECCIONES.

- Se ha solicitado formalmente patentar los hidrogeles en INAPI y se ha estudiado su potencial comercialización.
- Se está trabajando en un protocolo que permita incorporar de una manera más eficiente las nanopartículas de cobre en los hidrogeles. Este protocolo consiste en agregar una concentración conocida de CuNPs durante el proceso de síntesis y de esta manera, cuando ocurra el entrecruzamiento químico, las nanopartículas queden atrapadas en la red tridimensional.
- Como ya quedó demostrado que estos hidrogeles aceleran significativamente el proceso de regeneración en ratones sanos, nuestro próximo desafío es probar los hidrogeles en un modelo de animal diabético, cuyo protocolo ya se encuentra terminado y está basado en Furman, 2015. Brevemente, los animales serán inyectados con una dosis de 100  $\mu$ L de 40 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal, un agente citotóxico de células  $\beta$  del islote pancreático por 5 días consecutivos. Durante estos días, se proveerá comida normal y agua con 10% de sacarosa a los ratones. Al sexto día, se reemplazará el agua con sacarosa por agua normal. En el día 14, se someterá a los ratones a un ayuno y se analizará la glucosa en una muestra de sangre, proveniente de una vena de la cola, mediante un medidor de glicemia. Posteriormente de haber inducido la diabetes, se volverá a evaluar las propiedades regenerativas del hidrogel siguiendo el mismo protocolo descrito en esta tesis, pero esta vez por 28 días y agregando un grupo control no diabético. Al final del período de tratamiento, se extirpará el tejido de las heridas, se fijará con formalina al 10%, y se teñirá con hematoxilina-eosina (H&E) para hacer observaciones histológicas.

- Se considera que estos hidrogeles además presentan la oportunidad de ser utilizados en un proyecto bioinformático para estudiar la expresión diferencial de genes en distintas fases del proceso de cicatrización de las heridas en los ratones diabéticos, que por motivos de pandemia no se pudo llevar a efecto. En breve, se planea tomar muestras del tejido de los ratones cada 3 días, a los cuales se les extraerá el ARN y se enviará a secuenciar. Los datos serán analizados por Fastqc para conocer la calidad de la secuenciación. Posteriormente serán alineados con Tophat2 al transcriptoma de referencia de *Mus musculus*. Se obtendrán los archivos BAM para ser ordenados e indexados utilizando Samtools. La calidad del alineamiento se evaluará con el programa RseqC, calculando los sesgos de PCR, sesgo 3' 5', y splicing. Después se hará un análisis de expresión diferencial de genes utilizando HTSeq-count. Los resultados de HTSeq-count, serán en un documento separado por tabulación e ingresados como metadata a R. Los archivos serán graficados, utilizando el comando plot MA, tomándose como condición control, a los ratones del grupo control. También se hará un rlog de los datos para elaborar un heatmap con los 10 genes más diferencialmente expresados, entregados por el comando topVarGenes. De esta forma podremos estudiar que genes están siendo promovidos por la acción de los hidrogeles y así identificar posibles blancos terapéuticos en el futuro.
- Por último, con este trabajo se estableció una nueva línea de investigación en el laboratorio, logrando incluso sentar las bases para un proyecto Fondef que fue adjudicado recientemente por el equipo de investigación y que permitirá continuar validando este hidrogel

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), 105-121.

Alqahtani, M., & Lalonde, D. H. (2006). Sterile versus nonsterile clean dressings. *Canadian Journal of Plastic Surgery*, 14(1), 25-27.

American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals (2013 Edition)

Anjum, S., Arora, A., Alam, M. S., & Gupta, B. (2016). Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. *International journal of pharmaceutics*, 508(1-2), 92-101.

Archer Gordon, L. (1998). *Staphylococcus aureus: A Well-Armed Pathogen*. 1998. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 1179-81.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10), 634.

Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. In *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*. IntechOpen.

Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J., & Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(2), 244-249.

Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., and Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin. Dermatol.* 30, 257–262. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007

Barraza-Garza, G., de la Rosa, L. A., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 41(3), 125-148.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic - Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5), 585-601.

Bernal-Ballen, A., Lopez-Garcia, J.-A., & Ozaltin, K. (2019). (PVA/Chitosan/Fucoidan)-Ampicillin: A Bioartificial Polymeric Material with Combined Properties in Cell Regeneration and Potential Antibacterial Features. *Polymers*, 11(8), 1325. <https://doi.org/10.3390/polym11081325>.

Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 83-99.

Bindhu, M. R., & Umadevi, M. (2014). Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. *Materials Letters*, 120, 122-125.

Brown, T. M., & Krishnamurthy, K. (2020). Histology, dermis. StatPearls [Internet].

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569–3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8).

Castellano Izquierdo, D. (2018). Evaluación de Biopolímeros como Superficie de Regeneración de Tejidos Dérmico y Cardíaco. (Doctoral dissertation, Universitat de València)

Cholewińska, E., Ognik, K., Fotschki, B., Zduńczyk, Z., & Juśkiewicz, J. (2018). Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One*, 13(5), e0197083.

Chu, D. H. (2008). Overview of biology, development, and structure of skin. K. Wolff, LA Goldsmith, SI Katz, BA Gilchrest, AS Paller, & DJ Leffell.

Clark, R. A. (1993). Biology of dermal wound repair. *Dermatologic clinics*, 11(4), 647-666.

Correa, M. G., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J., & de Dicastillo, C. L. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(1), 1450-1469.

De France, K. J., Yager, K. G., Chan, K. J., Corbett, B., Cranston, E. D., & Hoare, T. (2017). Injectable anisotropic nanocomposite hydrogels direct in situ growth and alignment of myotubes. *Nano letters*, 17(10), 6487-6495.

Demirtaş, T. T., Irmak, G., & Gümüşderelioğlu, M. (2017). A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication*, 9(3), 035003.

Dvonch, V. M., Murphey, R. J., Matsuoka, J., & Grotendorst, G. R. (1992). Changes in growth factor levels in human wound fluid. *Surgery*, 112(1), 18-23.

Edwards, R., & Harding, K. G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases*, 17(2), 91-96.

Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537-556.

Escobar Sierra, D. M., Castro Ramírez, A. M., & Vergara Castrillón, N. A. (2014). Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Revista de Ciencias*, 18(1), 73-88.

Feng, Y., Gong, J.-L., Zeng, G.-M., Niu, Q.-Y., Zhang, H.-Y., Niu, C.-G., ... Yan, M. (2010). Adsorption of Cd (II) and Zn (II) from aqueous solutions using magnetic hydroxyapatite nanoparticles as adsorbents. *Chemical Engineering Journal*, 162(2), 487-494.

Fuchs, E., & Byrne, C. (1994). The epidermis: rising to the surface. *Current opinion in genetics & development*, 4(5), 725-736.

Fultz, B., & Howe, J. M. (2012). *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. Springer Science & Business Media.

Furman, B. L. (2015). Streptozotocin - induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*, 70(1), 5-47.

Ghabboun, J., Hussein, G. A., Faroun, M., Karmi, A., Hawash, Z., Hayek, I., & Sowwan, M. (2012). Mapping of embedded functionalized carbon nanotubes in poly (vinyl alcohol)/nanotube composite using electrostatic force microscopy. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 17(4), 268-277.

Gjødsbøl, K., Christensen, J. J., Karlsmark, T., Jørgensen, B., Klein, B. M., & Krogh, K. A. (2006). Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal*, 3(3), 225-231.

Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.

Gopal, A., Kant, V., Gopalakrishnan, A., Tandan, S. K., & Kumar, D. (2014). Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *European journal of pharmacology*, 731, 8-19.

Gould, J. (2018). Superpowered skin. *Nature* 563, S84–S85. doi: 10.1038/d41586-018-074293

Gulrez, S. K., Al-Assaf, S., & O, G. (2011). Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In A. Carpi (Ed.), *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/24553>.

Gupta, V., & Nayak, A. (2012). Cadmium removal and recovery from aqueous solutions by novel adsorbents prepared from orange peel and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 180, 81–90.

Hackam, D. J., & Ford, H. R. (2002). Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surgical infections*, 3(S1), s23-s35.

Henao, E., Delgado, E., Contreras, H., & Quintana, G. (2018). Polyelectrolyte Complexation versus Ionotropic Gelation for Chitosan-Based Hydrogels with Carboxymethylcellulose, Carboxymethyl Starch, and Alginate. *International Journal of Chemical Engineering*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3137167>.

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18-23.

Hosgood, G. (2006). Stages of wound healing and their clinical relevance. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 36(4), 667-685.

Hsieh, W.-C., & Liao, J.-J. (2013). Cell culture and characterization of cross-linked poly(vinyl alcohol)-g-starch 3D scaffold for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 98 (1), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.020>.

Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-based hydrogels: present status and applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric*

James, W.D., Berger, T.G., & Elston, D.M. (2006). *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology* (10th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders

Jeffcoate, W. J., & Harding, K. G. (2003). Diabetic foot ulcers. *The lancet*, 361(9368), 1545-1551.

Jeschke, M. G. et al. Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PLoS One* 6, e21245 (2011)

Jeschke, M. G., van Baar, M. E., Choudhry, M. A., Chung, K. K., Gibran, N. S., & Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 1-25.

Jiang, D., Christ, S., Correa-Gallegos, D., Ramesh, P., Kalgudde Gopal, S., Wannemacher, J., et al. (2020). Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat. Commun.* 11:5653. doi: 10.1038/s41467-020-19425-1

Joshy, K. S. (2016). *Cutaneous Wound Care: Grafts to Tissue Engineered Skin Substitutes*. In *Nanomedicine and Tissue Engineering* (pp. 519-546). Apple Academic Press.

Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390–401

Khan, M. A., & Mujahid, M. (2019). A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *International journal of biological macromolecules*, 124, 138-147.

Kildeeva, N. R., Perminov, P. A., Vladimirov, L. V., Novikov, V. V., & Mikhailov, S. N. (2009). About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. *Russian journal of bioorganic chemistry*, 35(3), 360-369.

Kirby, G. T., Mills, S. J., Cowin, A. J., & Smith, L. E. (2015). Stem cells for cutaneous wound healing. *BioMed research international*, 2015.

Kohane, D. S., & Langer, R. (2010). Biocompatibility and drug delivery systems. *Chemical Science*, 1(4), 441-446.

Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.

Langford, Dale J., Andrea L. Bailey, Mona Lisa Chanda, Sarah E. Clarke, Tanya E. Drummond, Stephanie Echols, Sarah Glick et al. "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse." *Nature methods* 7, no. 6 (2010): 447.

Lee, J. H., & Kim, H. W. (2018). Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418768285.

Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 1-17.

Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS nano*.

Lin, F. H., Yao, C. H., Sun, J. S., Liu, H. C., & Huang, C. W. (1998). Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials*, 19(10), 905-917.

López-Mata, M. A., Valdez-Melchor, R. G., Quihui-Cota, L., & Osuna-Amarillas, P. S. (2020). Recubrimientos para heridas con Aloe-gel combinado con alginato, pectina y quitosano: aplicaciones in vivo. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23.

Ludriksone, L., Bartels, N. G., Kanti, V., Blume-Peytavi, U., & Kottner, J. (2014). Skin barrier function in infancy: a systematic review. *Archives of dermatological research*, 306(7), 591-599.

Malhotra, N., Ger, T. R., Uapipatanakul, B., Huang, J. C., Chen, K. H. C., & Hsiao, C. D. (2020). Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish. *Nanomaterials*, 10(6), 1126.

Malone - Povolny, M. J., Maloney, S. E., & Schoenfisch, M. H. (2019). Nitric oxide therapy for diabetic wound healing. *Advanced healthcare materials*, 8(12), 1801210.

Mandal, A., Clegg, J. R., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2020). Hydrogels in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(2), e10158.

Mansur, H. S., de S. Costa, E., Mansur, A. A. P., & Barbosa-Stancioli, E. F. (2009). Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*, 29 (5), 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.012>.

Mao, C., Xiang, Y., Liu, X., Cui, Z., Yang, X., Yeung, K. W. K., & Wu, S. (2017). Photo-inspired antibacterial activity and wound healing acceleration by hydrogel embedded with Ag/Ag@ AgCl/ZnO nanostructures. *Acs Nano*, 11(9), 9010-9021.

Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.

McMullan, D. (1989). SEM—past, present and future. *Journal of Microscopy*, 155(3), 373-392.

Mirzaei B, E., Ramazani SA, A., Shafiee, M., & Danaei, M. (2013). Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(11), 605-611.

Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & d'Ayala, G. G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate polymers*, 233, 115839.

Mohandas, A., Deepthi, S., Biswas, R., & Jayakumar, R. (2018). Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. *Bioactive materials*, 3(3), 267-277.

Monticello, R. A., & Askew, P. D. (2012). *Russell, Hugo and Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*.

Morain, W. D., & Colen, L. B. (1990). Wound healing in diabetes mellitus. *Clinics in plastic surgery*, 17(3), 493-501

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16:2346–53

Murphy, G.F. (1997). Histology of the skin. In D. Elder, R. Elenitsas, C. Jaworsky, & B. Johnson, Jr. (Eds.), *Lever's histopathology of the skin* (8th ed., pp. 5–45). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Ngoenkam, J., Faikrua, A., Yasothornsrikul, S., & Viyoch, J. (2010). Potential of an injectable chitosan/starch/ $\beta$ -glycerol phosphate hydrogel for sustaining normal chondrocyte function. *International journal of pharmaceutics*, 391(1-2), 115-124.

Nguyen, C. M., Chandler, R., Ratanshi, I. & Logsetty, S. in *Handbook of Burns Vol. 1* (eds. Jeschke, M. G., Kamolz, L.-P., Sjöberg, F. & Wolf, S. E.) 529–547 (Springer, 2020).

Pellá, M. C., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 196, 233-245.

Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 202, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>.

Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altrock, B. W., Deuel, T. F., & Thomason, A. (1991). Role of platelet - derived growth factor in wound healing. *Journal of cellular biochemistry*, 45(4), 319-326.

Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2006). Crosslinked chitosan—preparation and characterization. *Carbohydrate research*, 341(1), 169-173.

Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials letters*, 71, 114-116.

Ribeiro, M. P., Espiga, A., Silva, D., Baptista, P., Henriques, J., Ferreira, C., ... & Correia, I. J. (2009). Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound repair and regeneration*, 17(6), 817-824.

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.

Ruiz Aviles, G. (2006). Obtaining and characterization of a biodegradable polymer starting from the tapioca starch; Obtencion y caracterizacion de un polimero biodegradable a partir del almidon de yuca. *Ingeniería y Ciencia*, 2.

Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4(3), 707-716

Salud Pública, S. (2017). Encuesta nacional de salud 2016-2017 Primeros resultados. Santiago.

Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 163(2), 257-268.

Serna, J. V., & Molina, C. P. (2013). Construcción de matrices como sustitutos dérmicos: aplicación potencial en la regeneración de piel. *Revista Ingeniería Biomédica*, 7(13), 10-17.

Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.

Singh, R., Goel, S., Sharma, P. K., & Agarwal, A. (2021). Hydrogel as a Novel Drug Delivery System: Recent Advancements and Patents. *Current Nanoscience*, 17(1), 14-25.

Song, L., Vijver, M. G., Peijnenburg, W. J., Galloway, T. S., & Tyler, C. R. (2015). A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere*, 139, 181-189.

Stoica, A. E., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2020). Hydrogel dressings for the treatment of burn wounds: an up-to-date overview. *Materials*, 13(12), 2853.

Sudheesh Kumar, P. T., Lakshmanan, V. K., Anilkumar, T. V., Ramya, C., Reshmi, P., Unnikrishnan, A. G., ... & Jayakumar, R. (2012). Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *ACS applied materials & interfaces*, 4(5), 2618-2629.

Takeo, M., Lee, W., & Ito, M. (2015). Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(1), a023267.

Tang, X., & Alavi, S. (2011). Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydrate Polymers*, 85 (1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.030>.

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39(2), 151-165.

Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636.

Usman, M. S., El Zowalaty, M. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., & Ibrahim, N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 8, 4467.

Villarroel-Soto, R., Herrera-Videla, E., Ocampos-Toro, P., Ricca-Benza, M., Ubilla-Carvajal, M. J., & Mezzano-Oyarce, M. (2014). Regulación del Uso y Cuidado de Animales en Investigación.

Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 487.

Wang, Y., Beekman, J., Hew, J., Jackson, S., Issler-Fisher, A. C., Parungao, R., ... & Maitz, P. K. (2018). Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 3-17.

Wechsler, M. E., Stephenson, R. E., Murphy, A. C., Oldenkamp, H. F., Singh, A., & Peppas, N. A. (2019). Engineered microscale hydrogels for drug delivery, cell therapy, and sequencing. *Biomedical microdevices*, 21(2), 31.

Wenzel, R. P., & Perl, T. M. (1995). The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *Journal of Hospital Infection*, 31(1), 13-24.

Williams, D. (2003). Revisiting the definition of biocompatibility. *Medical device technology*, 14(8), 10-13.

Xu, Z., & Hsia, H. C. (2018). The impact of microbial communities on wound healing: a review. *Annals of plastic surgery*, 81(1), 113-123.

Xu, Z., Han, S., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing. *Advanced healthcare materials*, 9(5), 1901502.

Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174.

Zarrintaj, P., Moghaddam, A. S., Manouchehri, S., Atoufi, Z., Amiri, A., Amirkhani, M. A., & Mozafari, M. (2017). Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine*, 12(19), 2403-2422.

Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science*, 356(6337), eaaf3627.

Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 510-525.

