

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hidrogel a base de β -Quitosano

Autora:

STHEFANIE DEL PILAR CABREL RENGIFO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

LIMA- PERÚ

2018

ASESORA

MSc. Graciela Untiveros Bermúdez

Sección Química – Departamento de Ciencias Exactas

CO – ASESOR

Dr. José Aguilar Olano

Jefe Laboratorio Inmunología. Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

JURADO

PRESIDENTE: Dr. José Luis Bauer Cuya

VOCAL: Mg. Camilo Díaz Santibañez

SECRETARIO M.Sc.Q.F. Elsa Carolina Ponce de León de Lama

Afronta tu camino con coraje,
no tengas miedo de las críticas de los demás.
Y, sobre todo,
no te dejes paralizar por tus propias críticas.

Paulo Coelho

A mis fuentes de coraje:
papá Augusto, mamá Rocío,
mis hermanos Lucero, Álvaro y Micaela.
Y no me olvido de ti, mi N-acetilglucosamina.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo del Laboratorio de Inmunología en el LID, en especial al Dr. José Luis Aguilar Olano; quien adoptó este trabajo en su proyecto mayor, el cual serviría de inspiración a mi trabajo.

Al Dr. José Bauer Cuya, por la donación de su maravilloso β -chitosano. Sin él, este trabajo no sería posible.

A la MSc. Graciela Untiveros, por ser asesora, consejera, guía, fuente inagotable de ánimos y quien entendía mejor que nadie mis enredadas ideas.

Al Dr. César López Matayoshi, por ser como es, directo siempre. Mil gracias por su estricta, pero efectiva asesoría y por las muchas veces que me animó a continuar a pesar de todo.

Gracias a la MSc. Bertha Llanos Q.E.P.D. por acompañarme desde los inicios de este trabajo hasta que Dios se lo permitió. Le estaré muy agradecida siempre, pues la culminación de este trabajo también es gracias a Ud.

Un agradecimiento especial a mi segundo hogar, el Laboratorio de Farmacia y el Laboratorio de Control de Calidad. Gracias al Dr. León Villegas, por confiar en mí y no dudar en brindarme apoyo cada vez que se lo pedí. Muchas gracias a los químicos farmacéuticos: Leysi Casas y Erik Olivares, quienes me estuvieron apoyando en la estandarización de métodos. A todos ellos, muchas gracias.

Gracias al químico farmacéutico Omhar Chávez, quién nunca dudó de mi trabajo y siempre estuvo dispuesto a ayudarme en todo lo que estaba a su alcance. Gracias por escuchar mis “n” teorías sobre cada cosa que leía, cada catarsis hacía que amara más mi trabajo.

Por último, agradezco a cada amigo y familiar que me animó a lo largo de este gran y tedioso camino. No fue fácil, de eso estoy segura; pero, sin ellos lo hubiera sido aún más. A todas mis fuentes de palabras de motivación y tazas de café, muchísimas gracias.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	Úlceras cutáneas	2
2.2.	Cicatrización: Mecanismo molecular de regeneración	3
2.3.	pH en las úlceras cutáneas	7
2.4.	Plaquetas	8
2.4.1.	Plasma rico en plaquetas	10
2.4.2.	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	10
2.5.	HIDROGEL	13
2.6.	DE LA β -QUITINA AL β -QUITOSANO	15
2.6.1.	Quitina	15
2.6.2.	Quitosano	18
2.6.3.	Interacciones	21
2.6.4.	Fuente	23
2.6.5.	β -quitosano como matriz del hidrogel	23
2.6.6.	Agente entrecruzante	25
III.	HIPÓTESIS	29
3.1.	Hipótesis nula	29
3.2.	Hipótesis alterna	29

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
V. OBJETIVOS	29
5.1. General:	29
5.2. Específicos:	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
Materiales	30
Métodos	30
6.1. Caracterización del β -quitosano	31
6.1.1. Homogenización de la muestra	31
6.1.2. Determinación del grado de desacetilación	32
6.1.3. Determinación del peso molecular promedio	33
6.2. Obtención del hidrogel a base de β -quitosano con lisado plaquetario	35
6.2.1. Obtención del lisado plaquetario (LP):	35
6.2.2. Reducción de la carga microbiana en los componentes:	35
6.2.3. Formación del hidrogel:	36
6.3. Periodo de incubación	38
6.3.1. Preparación de PBS a distintos pH:	38
6.3.2. Incubación:	38
6.4. Medición de la concentración de PDGF-BB	38
6.4.1. Prueba estadística	39
VII. RESULTADOS	40
7.1. Caracterización del β -quitosano	40
7.1.1. Homogeneización de la muestra	40
7.1.2. Determinación del grado de desacetilación	40
7.1.3. Determinación del peso molecular promedio	42

7.2.	Medición de la concentración de PDGF-BB	43
7.2.1.	Curva de calibración	43
7.2.2.	Curvas de la cinética de liberación	43
7.2.3.	Prueba estadística	48
VIII.	DISCUSIÓN	49
IX.	CONCLUSIONES	53
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
XI.	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Composición química (%) de la cáscara de camarón vs la pluma de calamar	23
TABLA 2. Listado de agentes entrecruzantes en hidrogeles a base de quitosano	27
TABLA 3. Esquema de diseño experimental con dos factores de estudio (2^k)	36
TABLA 4. Esquema de recolección de datos según el diseño experimental 2^k	37
TABLA 5. Datos y resultados de la determinación del % Humedad	40
TABLA 6. Datos y resultados de la determinación del GD	40
TABLA 7. Datos para determinar el peso molecular promedio del β -quitosano	42
TABLA 8. Resultados de la determinación del peso molecular promedio del β -quitosano	42
TABLA 9. Datos de absorbancias (ABS) para la curva de calibración	43
TABLA 10. Concentraciones PDGF-BB a partir de hidrogel con LP 6%	43
TABLA 11. Concentraciones de PDGF-BB a partir de un hidrogel con LP 12%	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema del mecanismo para la formación de un coágulo sanguíneo	5
FIGURA 2. A) curso del pH en heridas agudas b) curso del pH en heridas crónicas (úlceras)	7
FIGURA 3. Ilustración esquemática del rol de los factores de crecimiento	9
FIGURA 4. Estructura cristalina del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) humano con el visor jsmol	11
FIGURA 5. Regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en la estructura cristalina del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) humano con el visor jsmol	11
FIGURA 6. Aminoácidos básicos, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares; según la secuencia de aminoácidos	12
FIGURA 7. Diagrama esquemático que ilustra la liberación de la droga (actualmente: ingrediente farmacéutico activo – IFA) y el movimiento del exudado hacia el hidrogel durante el proceso de cicatrización	14
FIGURA 8. Estructura química de la quitina	15
FIGURA 9. Esquema del polimorfo β -quitina	16
FIGURA 10. Estructura cristalina de la α - quitina	16
FIGURA 11. Estructura cristalina de la β -quitina	17
FIGURA 12. Espectros drx para β -quitosano y α -quitosano	17
FIGURA 13. Estructura química del quitosano	18
FIGURA 14. Formación de una base de schiff	21
FIGURA 15. Reacciones que fundamentan complejos proteína-quitina	22
FIGURA 16. Métodos de encapsulación para hidrogeles de quitosano	24
FIGURA 17. Representación esquemática de tres hidrogeles de quitosano elaborados con distintos tipos de agente entrecruzante	25
FIGURA 18. Esquema de la red de quitosano entrecruzadas covalentemente	26
FIGURA 19. Entrecruzamiento de cadenas de quitosano con un dialdehído	28
FIGURA 20. Flujograma de las actividades comprendidas dentro de los materiales y métodos	30

FIGURA 21. Molino analítico usado para la reducción de tamaño de partícula	31
FIGURA 22. Malla de acero n° 60 para obtener partículas de tamaño homogéneo	31
FIGURA 23. Estufa acondicionada a 105 °c	32
FIGURA 24. Viscosímetro de ostwald	33
FIGURA 25. Esquemmatización de la medición del tiempo de caída	34
FIGURA 26. Esquema de distribución de la placa para el experimento	37
FIGURA 27. Titulación ácido-base para hallar el grado de desacetilación (gd) de tres muestras de β -quitosano con diferentes pesos.	41
FIGURA 28. Concentración de las soluciones de β -quitosano vs la viscosidad reducida (ml/g)	42
FIGURA 29. Curva de calibración para las mediciones de PDGF-BB por ELISA	43
FIGURA 30. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 6% de LP expuesto a pH 6.5 y pH 7.4	44
FIGURA 31. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 12% de LP expuesto a pH 6.5 y pH 7.4	46
FIGURA 32. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 6% y 12% de LP expuesto a pH 6.5 y pH 7.4	47

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

UPP:	Úlcera por presión
PQ(s):	Plaqueta(s)
ADP:	Adenosín difosfato
FC:	Factor de crecimiento
ATP:	Adenosín trifosfato
PRP:	Plasma rico en plaquetas
PDGF-BB:	Platelet Derived Growth Factor - BB, en español: Factor de crecimiento derivado de plaquetas - BB
TGF- β :	Tumoral Growth Factor – β , en español: Factor de crecimiento tumoral - β
EGF:	Endotelial Growth Facto, en español: Factor de crecimiento endotelial
mmHg:	milímetros de mercurio
IFA:	Ingrediente farmacéutico activo
°C:	Grados Celsius (centígrados)
PM:	Peso molecular promedio
GD:	Grado de desacetilación
% Humedad:	Porcentaje de humedad
g:	Gramos
HCl:	Ácido clorhídrico
NaOH:	Hidróxido de sodio
HAc:	Ácido acético
NaAc:	Acetato de sodio
mm:	Milímetro
η_r :	Viscosidad relativa
η_{red} :	Viscosidad reducida
$[\eta]$:	Viscosidad intrínseca
mL:	Mililitro
rpm:	Revoluciones por minuto
PBS:	Buffer fosfato salino

μL:	Microlitro
CO ₂ :	Dióxido de carbono
mM:	Milimol
DA:	Grado de acetilación
s:	Desviación estándar
RDS:	Coefficiente de variación
RMN:	Resonancia magnética nuclear
PI:	Punto isoeléctrico
ST:	Shock térmico
kD:	Kilo Dalton

Resumen

Se diseñó un hidrogel que tiene como matriz al β -quitosano y que retarda la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB). PDGF-BB forma parte del lisado plaquetario (LP), el cual se obtuvo a partir del plasma rico en plaquetas (PRP) después de someterlo a un shock térmico. El β -quitosano fue caracterizado en porcentaje de humedad, grado de desacetilación y peso molecular promedio, usando técnicas como gravimetría, titulación potenciométrica y medición de viscosidad con el viscosímetro de Ostwald, respectivamente. Se tuvo en cuenta que el intersticio de una úlcera cutánea pasa por variaciones en el pH; motivo por el cual este trabajo busca estudiar la influencia del pH del medio en la liberación de PDGF-BB de la matriz de β -quitosano. Se obtuvieron los siguientes resultados: el β -quitosano con el que se trabajó, tiene 12.47% de humedad, un grado de desacetilación de 94.53% y peso molecular promedio de 145.45 kD. La liberación del PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 6% de lisado plaquetario sí está influenciada por el pH ($p < 0.05$); mientras que en el hidrogel de β -quitosano con 12% de lisado plaquetario no está influenciada por el pH ($p > 0.05$). Este hidrogel, de β -quitosano con 12% de lisado plaquetario, cumplió el objetivo al conseguir retardar la liberación del PDGF-BB en veintiséis horas.

Palabras clave:

β -quitosano – hidrogel – liberación retardada – PDGF-BB

Abstract

A hydrogel that has as its matrix β -chitosan was designed. It retards the release of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). PDGF-BB is part of the platelet lysate (LP), which was obtained from the thermal shock of platelet-rich plasma (PRP).

The β -chitosan was characterized in percentage of humidity, degree of deacetylation and average molecular weight, using techniques such as gravimetry, potentiometric titration and viscosity measurement with the Ostwald viscometer, respectively. It was taken into account that the interstitium of a cutaneous ulcer goes through variations in pH; this is the reason why this work seeks to study the influence of the pH of the medium on the release of PDGF-BB from the β -chitosan's matrix. We obtained the following results: this β -chitosan has 12.47% humidity, a degree of deacetylation of 94.53% and an average molecular weight of 145.45 kD. The release of PDGF-BB from the β -chitosan hydrogel with 6% platelet lysate itself is influenced by pH ($p < 0.05$); whereas in the β -chitosan hydrogel with 12% platelet lysate is not influenced by pH ($p > 0.05$). This hydrogel, of β -chitosan with 12% platelet lysate, fulfilled the objective by delaying the release of PDGF-BB in twenty six hours.

Keywords:

β -chitosan - hydrogel - delayed release - PDGF-BB

I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de tratamientos efectivos y de fácil manipulación para las úlceras cutáneas, es decir, que mejor se ajusten a la realidad de los pacientes; es una necesidad que va en aumento. Los tratamientos clásicos ya no se dan abasto para controlar las complicaciones que afectan las úlceras cutáneas, entre ellas las infecciones [1-6].

Y es que las úlceras cutáneas parecen ser algo tan cotidiano, que suele ignorarse todos los mecanismos fisiológicos necesarios para *regenerar* los tejidos. Cuando éstos fallan, se requiere hemocomponentes como el plasma rico en plaquetas, cuya alta concentración de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB (PDGF – BB), promueva el proceso de cicatrización [7, 8].

Uno de los inconvenientes del uso de tratamientos biológicos es la efectividad proporcional al control de la liberación de estos factores de crecimiento al intersticio de la úlcera cutánea. Una liberación inmediata dejará muchos ligandos sin receptores a los cuales unirse, degradándose finalmente.

Para ello se propone una forma farmacéutica que pueda retardar la liberación del PDGF - BB, usando una matriz de β -quitosano dentro de un hidrogel.

El β -quitosano es un polímero con muchas propiedades químicas, físicas y biológicas; las cuales dependen del grado de desacetilación y el peso molecular promedio. He aquí la importancia de su caracterización.

Por otro lado, se debe tener en cuenta los factores externos que afectan a las úlceras cutáneas, como las variaciones de pH; consecuentemente, es necesario conocer el comportamiento de la forma farmacéutica propuesta bajo esas condiciones [9-11].

En este trabajo se busca estudiar la influencia del pH en la liberación de uno de estos factores de crecimiento (PDGF-BB) a partir de un hidrogel, cuya matriz de β -quitosano se conoce, retarda la liberación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Úlceras cutáneas

Una úlcera cutánea se define como la lesión o disturbio interno de la continuidad del tejido, que compromete por lo menos, la epidermis [1,2]. Este concepto debe diferenciarse del que recibe una herida, conceptualizándola como un disturbio netamente agudo, causado por una fuerza externa o también llamado trauma [1,2].

Queda claro que una úlcera cutánea nunca será una lesión primaria pues es resultado de un proceso crónico, a diferencia de las heridas [1]. Sin embargo, las heridas sí pueden pasar a complicarse en úlceras cutáneas si persiste sin cicatrizar luego de tres semanas [2].

Las úlceras son problemas multifactoriales de salud en personas diabéticas, adultos mayores o cuya movilización está impedida; sin embargo, es la cronicidad la que predispone a otras complicaciones, como las infecciones [2]. Todo en conjunto, motiva a generar alternativas terapéuticas.

Según su etiología, las úlceras pueden clasificarse en: vasculares (venoso o arterial), diabéticas o por presión. Cada una de ellas con tratamientos diferentes y particulares; por ejemplo las úlceras venosas se caracterizan por un incremento de la presión sanguínea en las venas distales y un exceso de fibrina depositada a este nivel, en donde se entranpan factores de crecimiento y células que promueven la fase inflamatoria. Es por ello que tratamientos que estimulen la activación de estas vías quedan contraindicados; a diferencia de las úlceras por presión o diabéticas [3].

En el ámbito hospitalario, la mayoría de las úlceras cutáneas son producto de la presión que se ejerce cuando el paciente no se moviliza. Estas úlceras por presión (UPP) fueron definidas y clasificadas por The National Pressure Ulcer Advisory Panel. Según sus actualizaciones hechas hasta el 2007, definieron la UPP como la lesión localizada en la piel y tejido dérmico sobre una prominencia

del hueso, resultado de la presión. Las UPPs tienen cuatro estadios continuos y dos, usados para nombrar las úlceras con profundidad desconocida o etiología diferente [4,5] (Anexo 1).

- Estadio I: piel intacta con leve enrojecimiento
- Estadio II: adelgazamiento muy leve de la piel (pérdida de la dermis). El lecho de la úlcera de color entre rojo y rosado.
- Estadio III: pérdida completa de la dermis. El tejido hipodérmico queda expuesto.
- Estadio IV: exposición de hasta el músculo, tendón y hueso; acompañada de excavaciones.
- Sin estadio: La profundidad no puede determinarse por la presencia de escaras u otros desechos.
- Injuria tisular profunda: piel intacta pero de color morado o marrón (similar a un moretón). El daño probablemente sea más profundo.

Todos los tejidos son susceptibles al daño, razón por la cual a lo largo de la evolución, se desarrollan dos mecanismos de respuesta: la reparación o la regeneración. En el caso específico del tejido epitelial dérmico, se sigue el mecanismo de la regeneración completa [6].

2.2. Cicatrización: Mecanismo molecular de regeneración

Tras un daño al epitelio de la piel, la regeneración del mismo se lleva a cabo en cuatro fases, para algunos autores tres, con alto grado de dinamismo y participación de múltiples factores: físicos, químicos y celulares.

- 1) La *primera fase* o hemostasis; representa la respuesta vascular inmediata a causa de un traumatismo. Todos los vasos sanguíneos y linfáticos, ante un estímulo traumático, generan una vasoconstricción del músculo liso de su pared. Dependiendo del calibre del vaso, se conocen diferentes mecanismos iniciales para producir el mismo efecto; esto no significa que sea el mecanismo predominante. Si el vaso dañado es de gran calibre, como venas o arterias, se generan espasmos miogénicos locales en mayor

número; por el contrario, si son de pequeño calibre, como capilares, la liberación de tromboxano A2 producido por la membrana de las plaquetas, es suficiente para controlar la hemorragia bajo el rol de potente vasoconstrictor y activador de plaquetas que se le confiere. Para cualquier vaso sanguíneo la liberación de autacoides locales y la respuesta a reflejos nerviosos sensoriales o de dolor, coadyuvan para producir el mismo efecto constrictor [7]. Posteriormente, las prostaglandinas liberadas por el tejido dañado y la histamina por los mastocitos, en conjunto, producen vasodilatación e incremento de la permeabilidad capilar [1].

De los mecanismos mencionados, la actividad plaquetaria es el que mantiene la constricción. Pero, el trabajo de las plaquetas no termina en la liberación de agentes constrictores; también liberan componentes post-activación que promuevan la 'limpieza' del área dañada [8].

Después de controlar la hemorragia con una herramienta primaria, como es la contracción del vaso, lo que sigue es sellar la úlcera. Para esto hay dos caminos: la formación de un tapón plaquetario o la de un coágulo sanguíneo.

El tapón plaquetario comienza su formación con la activación de las plaquetas (PQs) en contacto con el colágeno tipo I. La activación de una PQ involucra deformación de ésta por acción de las proteínas contráctiles y presencia de pseudópodos, que incrementan la adherencia de las PQs a las fibras de colágeno y el factor de von Willebrand. Asimismo la liberación de adenosín difosfato (ADP) y tromboxano, contribuyen a la activación y adherencia de otras PQs. El tapón resultante es de consistencia laxa hasta la formación de fibrina, que lo convierte en un coágulo sanguíneo, más flexible que laxo [7].

Los tapones plaquetarios son útiles cuando el trauma es pequeño, como las lesiones diarias que los vasos sanguíneos pueden sufrir; sin embargo, ante

traumatismos más severos, es necesario la formación de un coágulo sanguíneo a través de la activación de la cascada de coagulación [7].

La formación del coágulo sanguíneo puede ser dividida en tres etapas:

- La formación del grupo activador de protrombina
- La formación de trombina a partir de protrombina
- La formación de fibrina a partir de fibrinógeno

De las tres etapas, la primera representa el factor limitante de la velocidad en la formación del coágulo sanguíneo. La explicación gráfica del proceso se muestra en la Figura 1. Se conoce que el grupo activador de protrombina está conformado por el Factor V, Factor X y fosfolípidos. Antes de la coagulación, el Factor V está en su forma inactivada; no es hasta la activación de trombina, que el Factor V es activado. El rol principal lo cumple el Factor X activado, que es la proteasa que escinde la protrombina; el Factor V activado es un catalizador y los fosfolípidos cumplen la función de vehículos [7].

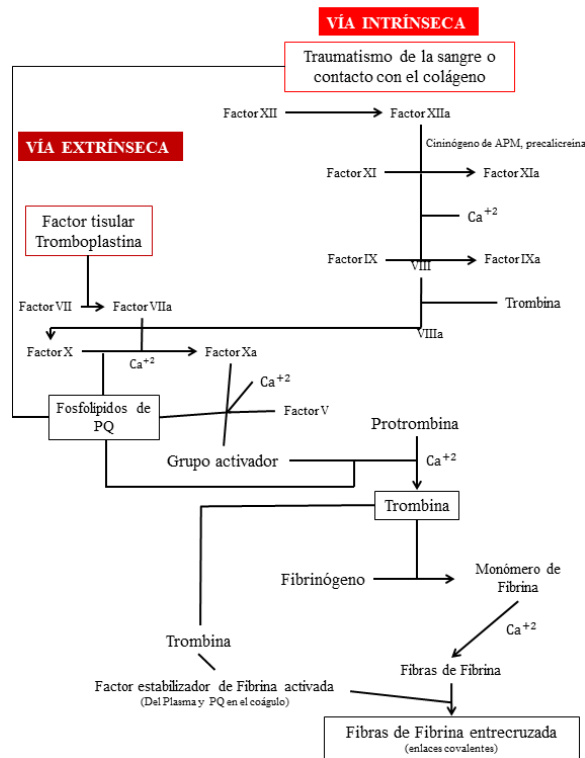


Figura 1. Esquema del mecanismo para la formación de un coágulo sanguíneo [7]

- 2) La *segunda fase* o inflamatoria; habiendo reparado el traumatismo vascular, lo que sigue es combatir cualquier agente infeccioso dentro del organismo.

Los factores de crecimiento (FC) liberados por la activación de la PQ dan inicio al reclutamiento de neutrófilos y monocitos, así como la estimulación de células epiteliales y fibroblastos.

- a) La primera línea de defensa contra alguna infección está encabezada por los neutrófilos. Estos se encargan de digerir las bacterias, tras lo cual mueren inmediatamente, liberando enzimas intracelulares que digieren los tejidos. Conforme se rompen algunas fibras como parte del trabajo enzimático de los neutrófilos, los productos de la degradación atraen fibroblastos y células epiteliales [8].
 - b) La segunda línea de defensa la conforman los monocitos que se diferencian en macrófagos al entrar en contacto con la matriz extracelular. Los macrófagos liberan enzimas para digerir el tejido; requieren de calcio para alcanzar su forma activa y zinc para el sitio activo enzimático, conocidas como metaloproteasas. Además se liberan citoquinas y FCs relacionados al desplazamiento y crecimiento de células epiteliales y fibroblastos, con especial participación en la siguiente fase [6, 8].
- 3) La *tercera fase* o proliferación; involucra la angiogénesis (proliferación de células endoteliales), distribución de colágeno, formación de tejido granular (alineación del colágeno inmaduro tipo III), formación de la nueva matriz extracelular (migración y proliferación de fibroblastos) y re-epitelización (migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos dérmicos) [6, 8].
 - 4) La *cuarta fase* de regeneración; se enfoca principalmente en recuperar la fuerza de tensión del colágeno, remodelándolo, por los fibrocitos [6, 8].

2.3. pH en las úlceras cutáneas

La escala de pH representa el logaritmo negativo de la concentración efectiva de iones hidronio $[H^+]$ en un determinado medio, como lo es el intersticio de una úlcera cutánea [9].

Por la estructura y composición de la piel, en específico del estrato córneo, en su estado basal (aminoácidos, ácidos grasos libres, productos de los queratinocitos, ácido cis-urocánico, intercambiadores de iones sodio específicos), tiene pH superficial alrededor de 5 [9, 10]. Ante un daño tisular, la concentración efectiva de los iones hidronio del medio interno varía, producto de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo durante cada una de las fases en el proceso de cicatrización. Todo ello sucede hasta terminar la tercera fase, granulación o proliferación, en donde el pH bordea 7.5; medio perfecto para el funcionamiento de ciertas enzimas catalíticas [10, 11].

Si la herida prosigue con la fase subsiguiente, se la clasifica como aguda o herida fisiológica; por otro lado, si continúa desordenadamente entre la fase inflamatoria y la proliferativa (más de tres semanas), se la considera crónica o patológica (Figura 2) [10, 11].

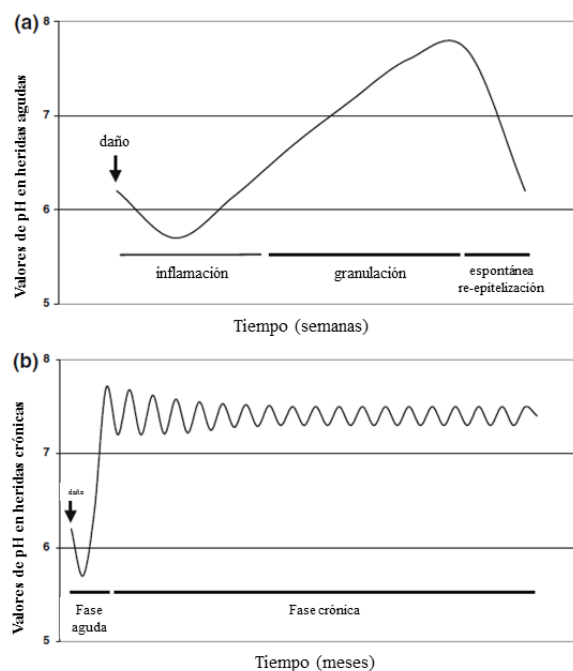


Figura 2. a) Curso del pH en heridas agudas b) Curso del pH en heridas crónicas (úlceras) [9]

Una herida aguda o fisiológica, logra normalizar los valores de pH ácidos basales durante la fase de regeneración. En esta etapa, la generación de ácidos orgánicos (ácido láctico), el aumento de la demanda de oxígeno, presión de dióxido de carbono y glicólisis para la síntesis de colágeno, contribuyen a la disminución del pH. Asimismo, la disminución del pH tiene como función, regular el balance entre la degradación y la regeneración de tejido tisular, al inactivar metaloproteasas [10, 12].

Una herida crónica o patológica (úlceras), por el contrario, no logra normalizar los valores de pH ácidos a causa de las insuficiencias del mecanismo reparador descrito para una herida aguda; por lo que se mantiene en medio alcalino, propenso al crecimiento bacteriano en sus dos formas (biofilm o planctónica) [10, 12].

2.4. Plaquetas

Las plaquetas (PQs) o trombocitos son pequeños fragmentos anucleares que provienen de la maduración del citoplasma en el megacariocito, precursor de las PQs localizado en la médula ósea. Tienen forma discoidal y un radio de 1-4 μm en estado inactivado, además pueden tener concentraciones sanguíneas de entre 150 000 a 300 000 PQs por μl , con una semivida de 8 a 12 días [7, 8, 13, 14].

Las PQs están compuestas de restos del retículo endoplasmático y aparato de Golgi que son las fuentes de las altas concentraciones intraplaquetarias de calcio; maquinaria enzimática y mitocondrial para la producción de adenosín trifosfato (ATP) y ADP; prostaglandinas; factor estabilizador de fibrina y factores de crecimiento (FCs) para células endoteliales, vasculares lisas y fibroblastos [7]. Estos FCs, que son la principal razón de su uso en la práctica clínica, están contenidos en los gránulos α ; que junto a los gránulos densos, son los dos tipos de gránulos que contiene la PQ [15, 16].

Con respecto al exterior, la membrana plaquetaria está constituida por una capa de glucoproteínas, la misma que permite la adherencia al colágeno

expuesto al dañarse el tejido vascular, y algunos fosfolípidos [7]. También cuentan con microtúbulos contráctiles en forma de anillo (citoesqueleto), los cuales contienen actina y miosina.

Ante el daño de vasos sanguíneos, se expone el colágeno localizado en el sub-endotelio y con él, el factor von Willebrand. Este factor permite iniciar los procesos de hemostasia primaria, como la activación y agregación, como lo muestra la Figura 3 [15].

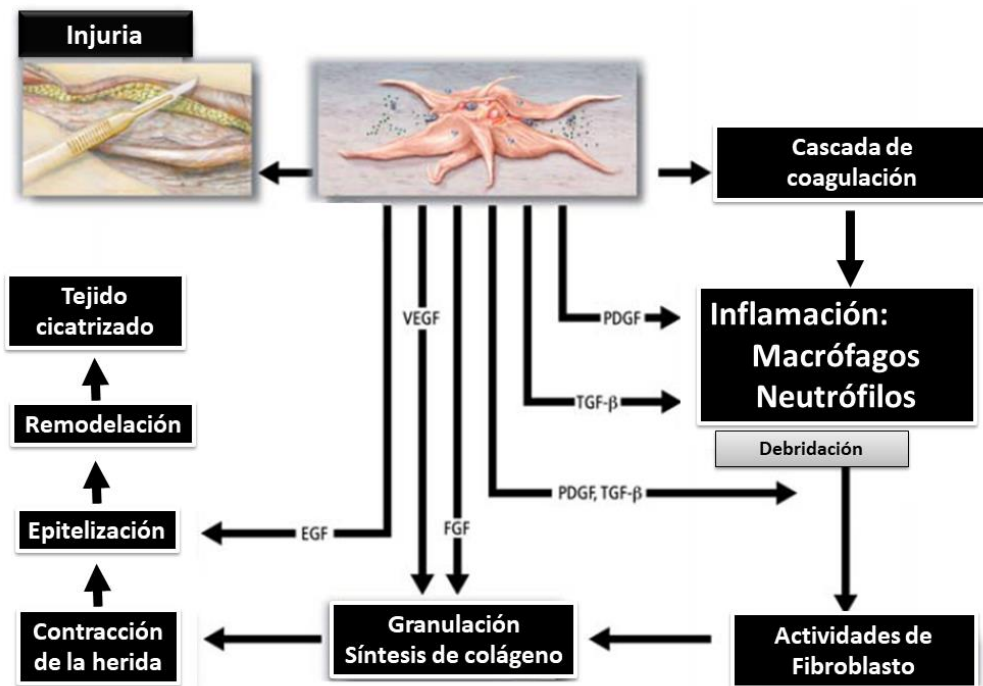


Figura 3. Ilustración esquemática del rol de los factores de crecimiento: factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento tumoral β (TNF- β) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); en las diferentes etapas del proceso de cicatrización [15].

La activación de las PQs implica un cambio en el citoesqueleto y con ello, su forma, al pasar de discoide a esférica con la extensión de los pseudópodos [5]. Existen múltiples sustancias activadoras de PQs, siendo las más conocidas tromboxano, ADP, trombina y calcio; sin embargo, cada activador libera el contenido de los gránulos (degranula) de manera distinta, en cantidad y orden, los componentes plaquetarios [13, 15].

2.4.1. Plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un hemocomponente autólogo que resulta de la concentración de plaquetas, a partir de la fracción plasmática de la sangre [16]. La concentración de plaquetas obtenida en el PRP se encuentra entre dos hasta cinco veces más, que la concentración basal de las mismas [15, 16, 17, 18].

En la actualidad, es usado en tratamientos regenerativos en áreas como odontología, traumatología, cirugía cosmética, oftalmología y dermatología [15, 18].

Se estima que cada PQ contiene aproximadamente 50 a 80 gránulos α , los mismos que liberan alrededor de 1200 moléculas cada 10^6 PQs [15, 16]. Estos FCs y citoquinas influyen en procesos hemostáticos como la inflamación, angiogénesis y proliferación celular [16].

2.4.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

El PDGF es una glicoproteína catiónica (punto isoeléctrico a pH 9.8), estable al calor, de aproximadamente 30 kD, homo- o hetero- dimérica, constituida por la combinación de las cadenas polipeptídicas A y/o B. Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro, resultando tres isoformas: PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB [15, 19]. De ellas, PDGF-BB es quien ha demostrado mayor efectividad en acelerar el proceso de cicatrización in vitro con el aumento en la proliferación de fibroblastos [19, 20, 21].

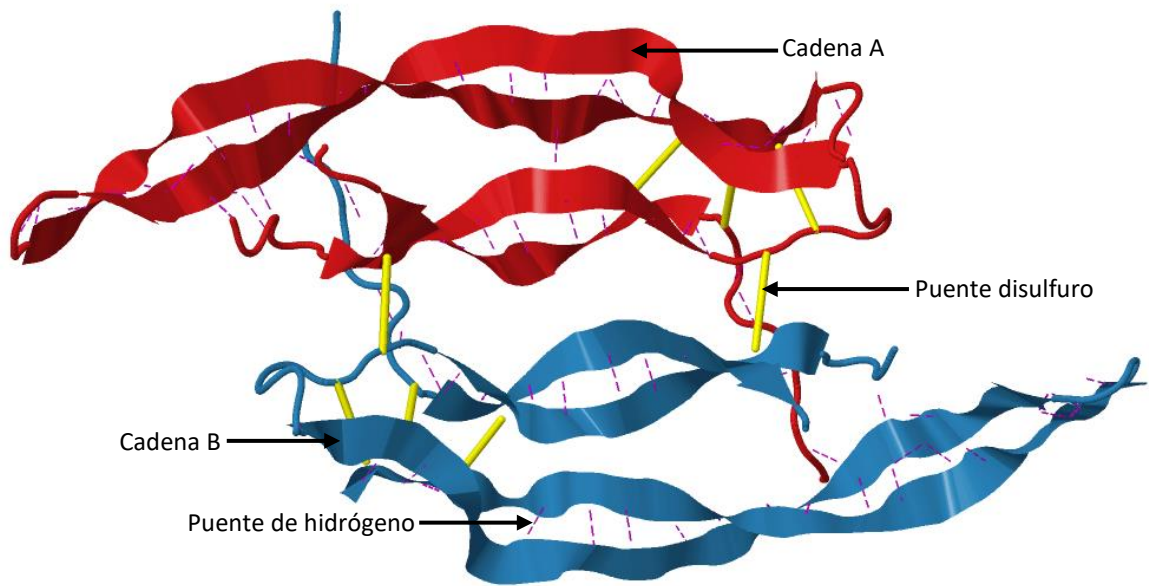


Figura 4. Estructura cristalina del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) humano con el Visor JSmol [22].

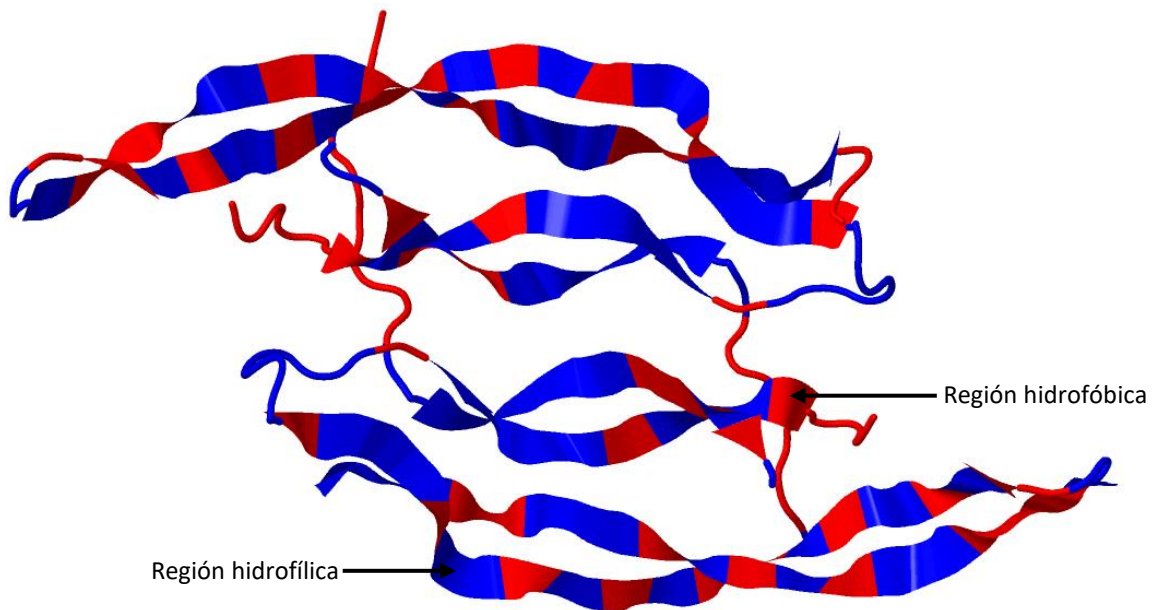


Figura 5. Regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en la estructura cristalina del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) humano con el Visor JSmol [22].

La secuencia de aminoácidos de las dos cadenas de PDGF-BB [22] presenta los siguientes porcentajes de aminoácidos básicos, ácidos y polares; prestos a formar interacciones con otras moléculas cargadas.

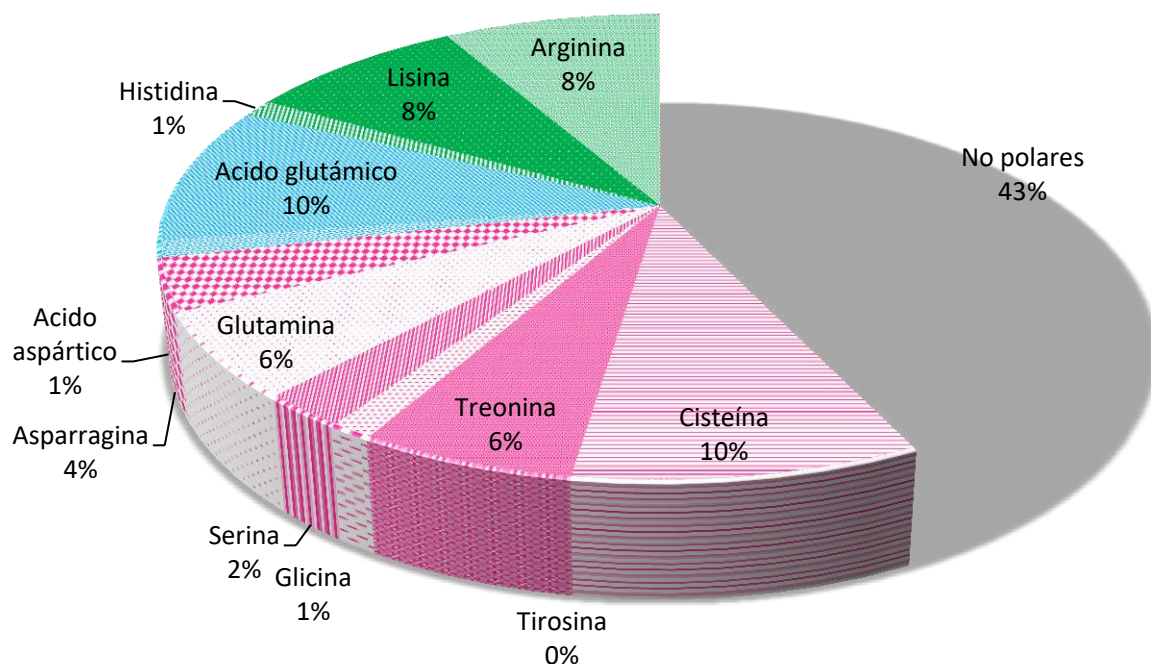


Figura 6. Aminoácidos básicos (Arginina, Lisina e Histidina), aminoácidos ácidos (Ácido glutámico y Ácido aspártico), aminoácidos polares (Cisteína, Tirosina, Treonina, Glicina, Serina, Glutamina y Asparragina) del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB); según la secuencia de aminoácidos [22].

Los receptores de PDGF son proteínas trans-membrana, asociadas a una proteína tirosinkinasa [23, 24]. Existen 2 tipos: α y β ; PDGF-BB se une al tipo β para ejercer su actividad en el proceso de cicatrización [25].

PDGF-BB está presente en múltiples células como PQ (gránulos α), megacariocitos, macrófagos, células epiteliales del pigmento epitelial, fibroblastos, células vasculares endoteliales, células del músculo liso y queratinocitos [24, 25]. Posee actividad mitogénica, incremento de la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos dérmicos y células del músculo liso, así como de la amplificación de la respuesta inflamatoria [19, 20, 23, 24]. Además, junto al factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), representan los FCs de mayor importancia en el inicio del proceso de cicatrización; por ello, incrementa el volumen de tejido granulado en 200% después de siete días [15].

Los efectos terapéuticos de su aplicación, en conjunto con los demás FCs contenidos en la PQ, no se comparan con los que resultarían de su aplicación en monoterapia [15]. Actualmente, se conoce del sinergismo entre FCs, como PDGF-BB y factor de crecimiento endotelial (EGF) [19], para promover los procesos regenerativos en el lecho de la úlcera [15].

Una sobre-exposición a PDGF-BB puro conlleva a progresión de glioblastomas, sarcomas; estimulación autocrina de las células tumorales; aterosclerosis; condiciones fibróticas; fibrosis pulmonar, renal, hepática o mielofibrosis [23].

2.5. HIDROGEL

Los hidrogeles logran proteger la úlcera de la infección, pues absorben convenientemente una fracción de exudado (Figura 7); sin comprometer la humedad de la úlcera, pero favoreciendo la debridación autolítica. La humedad favorece condiciones de hipoxia (mínimo 5 mmHg) en el lecho de la úlcera que a su vez promueve la fase inflamatoria y de re-epitelización. Por otro lado, la debridación autolítica, que implica remover el tejido no viable exponiendo el sano y perfundido, es importante para la proliferación y migración de células epiteliales al lecho de la úlcera [16].

Además de ser beneficiosos en el tratamiento de úlceras, accesibles, económicos y de consistencia semi-sólida; los hidrogeles, según la naturaleza del polímero usado, pueden funcionar como matriz para la liberación controlada de la IFA. Por todo ello, se plantea su uso como un vehículo farmacéutico que *retarde la liberación* [26].

El sistema del hidrogel estará compuesto por una fase sólida (máximo 10%) y una líquida, generalmente agua [28]. Con el fin de retardar la liberación, la estructura tridimensional debe estar formada por una red de polímeros entrecruzados con un alto número de grupos o dominios hidrofílicos, que al atraer agua, se “hincha” hasta llegar a un equilibrio entre la fuerza que ejercen las moléculas del medio al entrar a la matriz (fuerza expansora) y la fuerza de atracción entre las cadenas del polímero (fuerza retráctil) [29].

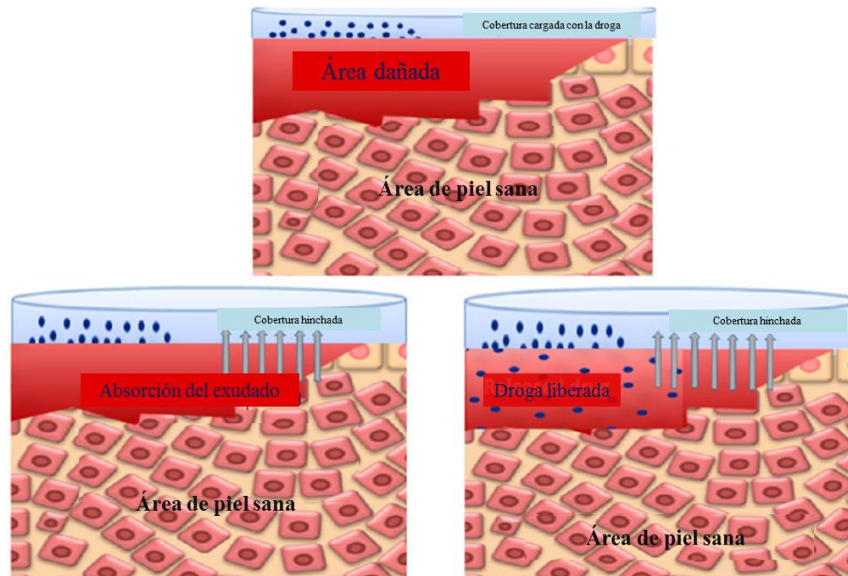


Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra la liberación de la droga (actualmente: ingrediente farmacéutico activo – IFA) y el movimiento del exudado hacia el hidrogel durante el proceso de cicatrización [27].

Las uniones que mantienen las cadenas poliméricas unidas, pueden ser enlaces covalentes y/o interacciones físicas. Ambas, sostienen el sistema durante el hinchamiento del hidrogel, con la diferencia de que las asociaciones físicas son reversibles [29].

Dicho hinchamiento está regulado por el peso molecular del polímero, densidad del agente entrecruzante y las interacciones físicas [29]. Esto se toma en cuenta en las siguientes secciones al resaltar la importancia de la caracterización del polímero, la cantidad de agente entrecruzante y el solvente usado para el polímero. El polímero debe ser, idealmente, hemostático, de actividad antibacteriana, estimulador de la formación de tejido granular, angiogénico e inductor de la producción de colágeno. Uno de los polímeros biocompatibles más estudiados es el quitosano [26].

Otra ventaja del uso de hidrogeles con matriz polimérica es el parecido fisicoquímico con la matriz extracelular, como el quitosano. Ambos compuestos de glicosaminoglicanos y con características mecánicas similares. Esto provee a estos hidrogeles una capacidad dual: servir de soporte celular y ser un sistema liberador de IFAs [29].

2.6. DE LA β -QUITINA AL β -QUITOSANO

2.6.1. Quitina

La historia de la quitina comienza en 1811, cuando Braconnot la aisló por primera vez de hongos superiores. Sin embargo no fue hasta 1894, en donde se dio el hito que daría inicio a la historia del quitosano, con las investigaciones de Hoppe-Seyler. Ellos descubrieron que la adición de hidróxido de potasio concentrado a la quitina, a 180°C, daba como producto una molécula nueva soluble en ácido acético y que precipita en medio alcalino, a la que denominaron quitosano. En ese entonces, nadie imaginó el gran impacto que ese polímero causaría en distintos campos de la ciencia [30].

La quitina, poli [β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas], materia prima del quitosano y otros polímeros con modificaciones químicas, se encuentra en animales (artrópodos, anélidos, moluscos y celenterios) y hongos (ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos) [30]. Estas quitinas poseen características distintas en su estructura cristalina según sea su fuente (biomasa) [30].

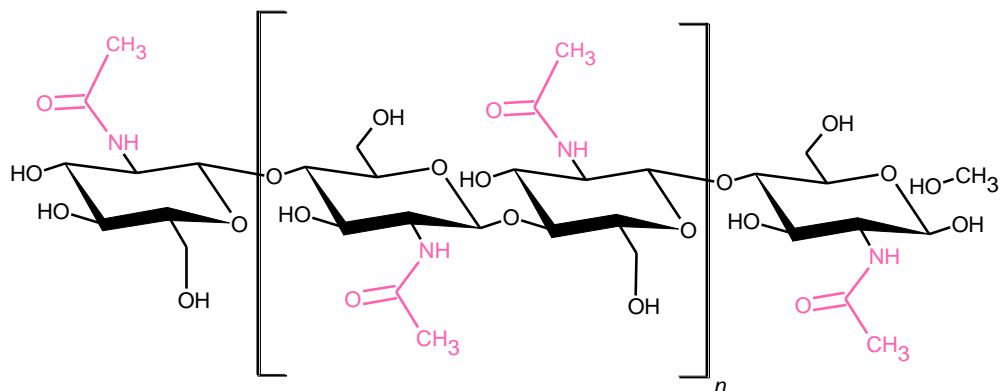


Figura 8 Estructura química de la quitina

Los espectros de rayos X distinguen tres formas polimórficas denominadas α , β y γ -quitina [30]. Aquella quitina cuya biomasa son los insectos y crustáceos, se denomina α -quitina; en los moluscos y celentéreos, β -quitina y en hongos, γ -quitina [30].

La estructura de los tres polimorfos está compuesta por dos regiones: una amorfa y otra cristalina. La diferencia, entre polimorfos, está en la disposición de las cadenas en la región cristalina [30]. Donde, la α -quitina presenta disposición anti-paralela; la β -quitina, paralela; y la γ -quitina, dos cadenas en un sentido y la que sigue en sentido contrario [30, 31].

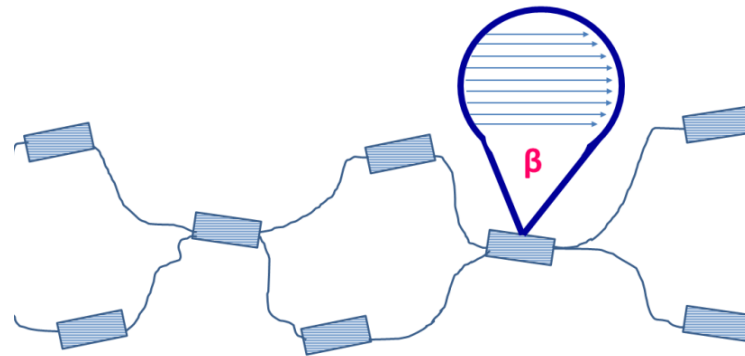


Figura 9 Esquema del polimorfo β -quitina. Los rectángulos representan las regiones cristalinas y las líneas, las regiones amorfas.

Así mismo, el α -quitosano presenta una disposición anti-paralela y cristalización con una celda de unidad (ortorrómbica) de dos cadenas (Figura 10). Por su parte, el β -quitosano mantiene una disposición paralela, con una celda monocíclica (Figura 11); mientras que el γ -quitosano posee dos cadenas paralelas y la siguiente en sentido opuesto. [32]

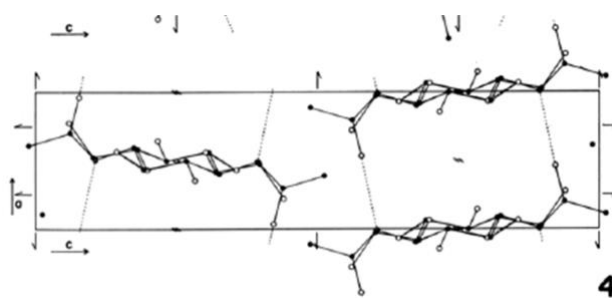


Figura 10. Estructura cristalina de la α - quitina: la celda es ortorrómbica y tiene dos cadenas, una hacia arriba y la siguiente orientada abajo, unidas por puentes de hidrógeno [32].

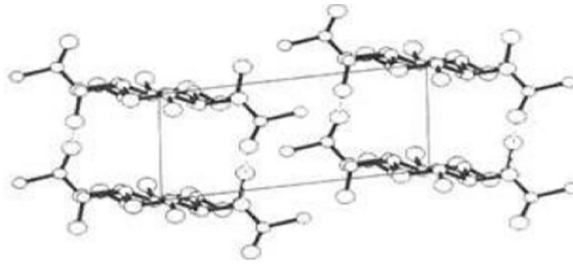


Figura 11. Estructura cristalina de la β -quitina: proyección de una celda unitaria, atravesando el plano de la página [32].

La diferencia entre las estructuras cristalinas de α -quitosano y β -quitosano se evidencian en los espectros de difracción de rayos X (DRX). La Figura 12 muestra diferentes posiciones para el mismo ángulo 2θ . Para el β -quitosano a $10,68^\circ$ y $20,14^\circ$; mientras que para el α -quitosano, $10,08^\circ$ y $19,94^\circ$ [33].

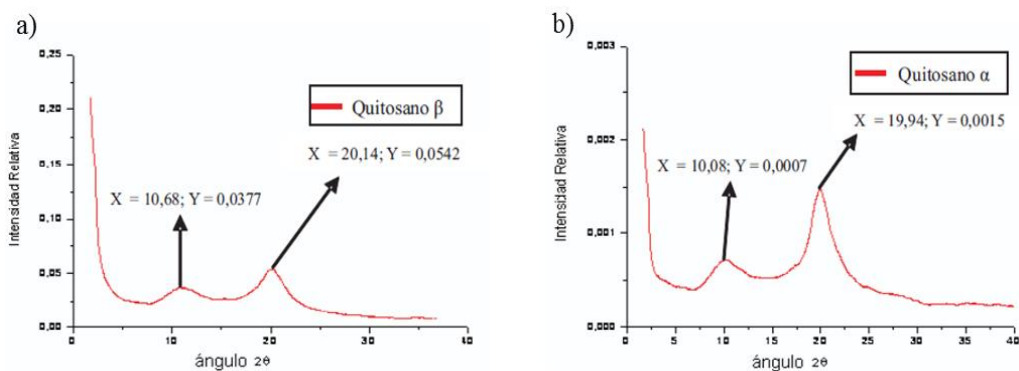


Figura 12. Espectros DRX para β -quitosano y α -quitosano, respectivamente. a) Primer pico ($10,68^\circ$) de intensidad 0,0377 y segundo pico ($20,14^\circ$) de intensidad 0,0542. b) Primer pico ($10,08^\circ$) de intensidad 0,0007 y segundo pico ($19,94^\circ$) de intensidad 0,0015 [31].

Las diferencias en las disposiciones espaciales repercuten en que las nanofibras de este polímero semi-cristalino presente mayor interacción intra- e intercatenarias evitando la entrada de solventes en el α -quitosano. A diferencia del β -quitosano, en donde las interacciones son escasas y la entrada de solventes es facilitada. Esto repercute en la aceptación en el uso de técnicas como las titulaciones para determinar el GD, pues los grupos amino deben ser de fácil acceso [34].

Existe una relación estructura función aplicable a los polimorfos de la quitina y su respectiva biomasa. La α -quitina está asociada a zonas de alta dureza, como

la cutícula de artrópodos o la delgada capa del esófago y estómago de los calamares de las especies del género *Lóligo spp.* La β -quitina por el contrario, asociada a carácter transparente y flexible, se ubica en gran porcentaje en la pluma o espina de dichos calamares [30].

La quitina por su composición, no representa un polímero amigable para incluirlo en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas; por ello, es procesada en un medio alcalino concentrado y temperaturas superiores a los 60°C con el fin de perder el resto acetilado del grupo acetamida del carbono 2, dando lugar al quitosano [30].

2.6.2. Quitosano

El quitosano, poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos], es un polisacárido, polímero lineal catiónico, compuesto por unidades D-Glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas aleatoriamente por enlaces glicosídicos β -(1-4) [30, 35].

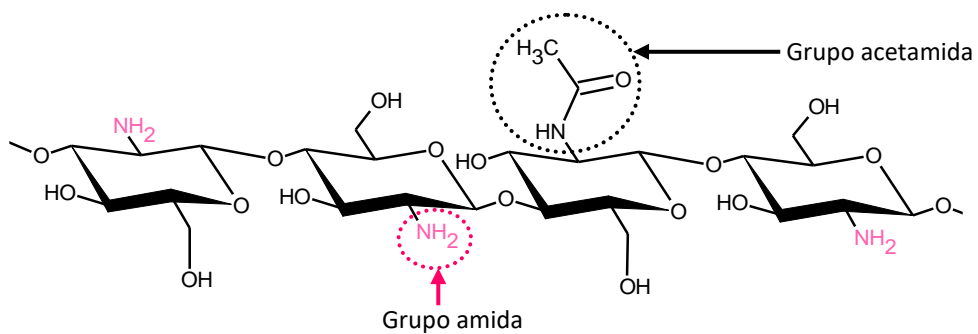


Figura 13. Estructura química del quitosano

El quitosano se considera como tal después de un tratamiento de desacetilación. Con un grado de 60% o más de desacetilación, las aminas alifáticas libres pueden ser fácilmente protonadas bajo un pH ácido, teniendo un pKa entre 6 - 6.8 [30, 35, 36].

Además de los polimorfos estructurales, el quitosano muestra mayor variabilidad según el tamaño de las cadenas y el grado de desacetilación, en principio [30]. Esta variabilidad exige caracterizar el polímero, conociendo como mínimo su peso molecular promedio (PM) y grado de desacetilación

promedio (GD) [30, 31]. Los grupos acetamida están relacionados al GD y la polimerización al PM. Cuanto mayor concentración relativa de grupos amina existan, mayor el GD, mientras que a mayor polimerización, mayor será el PM [31]. Además de conocer el PM y GD, también es importante conocer la polidispersidad de la masa molecular, el contenido de humedad, solubilidad y en algunos casos, el porcentaje de cenizas [31].

Esta caracterización depende del polimorfo de quitosano con que se esté trabajando; por ejemplo, la pureza del quitosano depende mucho de la biomasa de la cual se extrae, así como de su proceso de obtención. No es lo mismo desproteínizar α -quitina que β -quitina; incluso separarlo de los metales, que en su mayoría conforman las impurezas. Basta conocer el origen de cada uno de ellos para suponer que para obtener α -quitina, presente en la cutícula de los crustáceos, se requerirá necesariamente de una desmineralización y desproteínización. A diferencia de la β -quitina, que forma parte de la pluma – órgano interno– del calamar gigante o “pota”, que no lo requiere [37].

Un polielectrolito lineal y con alta densidad de carga positiva como el quitosano, resulta atractivo para aplicaciones biomédicas; pues ha demostrado tener propiedades fisicoquímicas como: antibacteriano (planctónico y biofilm [34]), antifúngico, mucoadhesivo, analgésico, hemostático, biodegradable y biocompatible [30, 35, 36, 38].

La mucoadhesión se explica por la presencia de residuos cargados negativamente de las glicoproteínas (ácido siálico) presentes en las mucosas, siempre que el medio tenga un pH ácido para mantener el quitosano en su forma policatiónica [36]. La actividad hemostática también se relaciona a su naturaleza policatiónica, que atraen a las células de la sangre, que están cargadas negativamente. De manera similar para la propiedad analgésica del quitosano, pues los residuos de D-glucosamina capturan los protones liberados en mayor proporción en áreas inflamadas [36, 39].

Su biodegradabilidad se fundamenta en su composición, la cual incluye grupos amino, polisacáridos y enlaces glicosídicos susceptibles a la acción de enzimas dentro del cuerpo humano, como las lisozimas [36]. Son necesarias tres unidades consecutivas acetiladas para que la lisozima reconozca el quitosano como sustrato y estar libre del empaquetamiento cristalino [39].

Sumado a todo ello, el GD, grado de polimerización y la distribución de los grupos acetilados, repercuten en las propiedades que dan tanta fama al quitosano. La actividad antimicrobiana se da cuando el quitosano conserva abundantes grupos acetamida. Por el contrario, la actividad antifúngica, se beneficia con el aumento de la polimerización y la disminución de grupos acetamida.

2.6.3. Interacciones

Se conoce que la quitina nativa, quitina en su biomasa, se asocia con proteínas, pigmentos y sales inorgánicas [30]. En el caso de los complejos proteína-quitina, que son de bastante interés en este trabajo y que no son ajenos al quitosano, se describen cinco [30, 37]:

1. Formación de grupos amida: entre la subunidad desacetilada de la quitina, o quitosano, y el grupo carboxílico en la cadena proteica.
2. Formación de bases de Schiff: entre la subunidad desacetilada de la quitina, o quitosano, y un grupo carbonilo (aldehído o una cetona) formando aldiminas y cetiminas. Este grupo imino formado es estable en medio neutro y alcalino, pero se hidroliza con facilidad en medios ácidos, regenerando la amina libre.

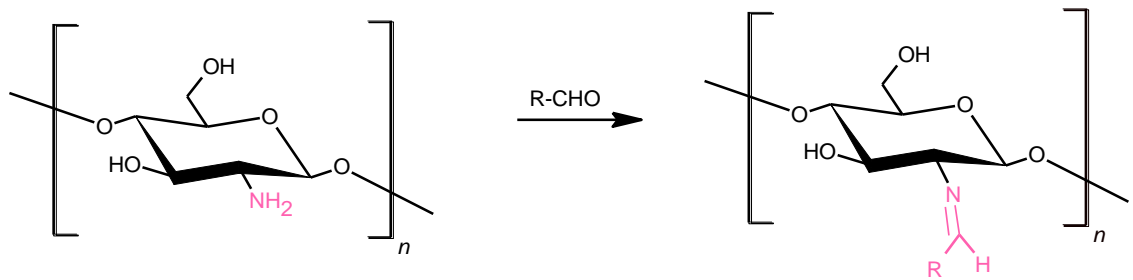
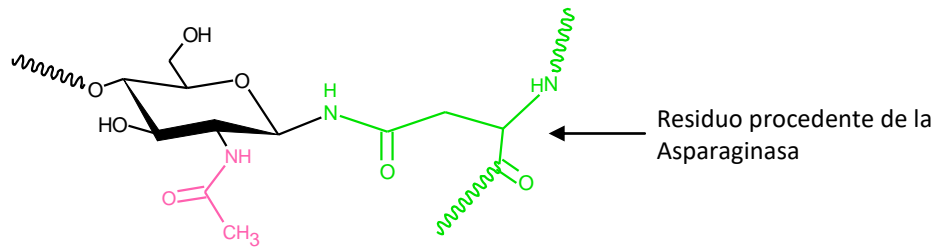


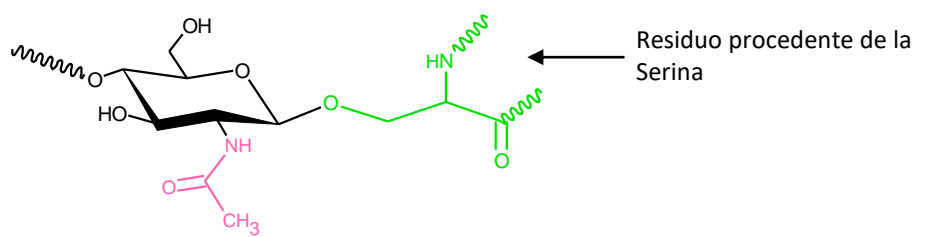
Figura 14. Formación de una base de Schiff

3. Formación de una estructura N-glicosídica: involucra el grupo amida de la asparaginasa.
4. Formación de una estructura o-glicosídica: involucra el grupo amida de la serina.
5. Formación de un enlace entre los grupos carboxílicos de ácido N-acetilmurámico y el grupo amino de la alanina.

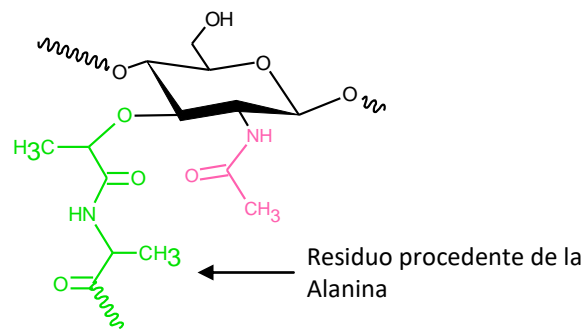
Estructura N-glicosídica



Estructura O-glicosídica



Estructura descrita por Rudall y Kenchington



Estructura descrita por Hackman

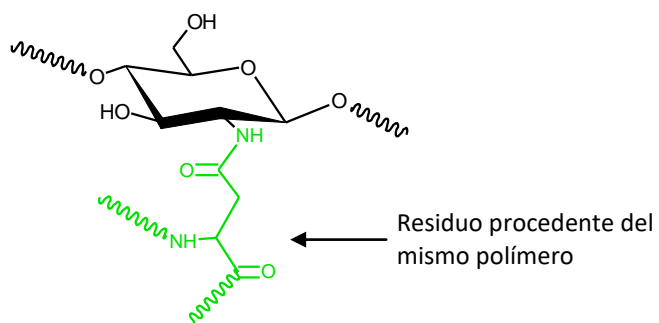


Figura 15. Reacciones que fundamentan complejos proteína-quitina

2.6.4. Fuente

El β -quitosano a usar procede de la β -quitina procesada de la pluma de *Dosidicus gigas* (“calamar gigante”, “pota”) [29]. *Dosidicus gigas*, miembro de la familia *Ommastrephidae*, se encuentra en el Pacífico Centro y Sur Oriental desde el Golfo de California hasta Perú; siendo los puertos de Tumbes, Talara y Paita en donde se captura la mayor cantidad de pota [40, 41, 42].

El Presidente del Frente Nacional de la Pesca, Roberto Vieira, califica a la “pota” como el recurso hidrobiológico más importante del país, después de la harina de pescado [43, 44]. Sólo en el 2014 se desembarcó cerca de 556 156 unidades de “pota” [40], que fuera de tener diferentes usos, representan una gran fuente de desechos (cabeza, vísceras, plumas, tinta, piel, tentáculos), considerando que estos son el 60% en peso seco de todo el molusco [41].

El proceso de la pluma de “pota” muestra mayor rendimiento en comparación a los desechos de crustáceo; ya que por su composición química (Ver Tabla 1), se prescinden ciertos pasos para la obtención del quitosano (desmineralización) [32, 45].

Tabla 1. Composición química (%) de la cáscara de camarón vs la pluma de calamar [45]

	AGUA	QUITINA	PROTEÍNA	EXTRACTO ORGÁNICO (*)	CENIZA
Pluma de calamar	13 ± 0.4	32.5 ± 2	42.5 ± 2	2 ± 0.5	2.4 ± 0.4
Cáscara de camarón	11 ± 0.4	17 ± 2	7 ± 2	4.5 ± 0.5	35.4 ± 0.4

(*) Suma de extractos en cloroformo y de la mezcla cloroformo/etanol (2:1 v/v)

2.6.5. β -quitosano como matriz del hidrogel

Un hidrogel está compuesto de redes macromoleculares, capaces de absorber notoriamente agua y otros fluidos [31]. Su mecanismo de liberación involucra: 1) flujo osmótico del fluido, por diferencia de potencial químico dentro y fuera del hidrogel 2) hinchamiento (fuerza retráctil) 3) oposición de las redes macromoleculares ejerciendo fuerza elástica (fuerza contráctil) [31].

Las interacciones que permiten la formación de hidrogeles pueden clasificarse en dos: físicas y químicas [31]. Las primeras representan las uniones no estables completamente y las segundas, hacen referencia a enlaces covalentes que solo dejan liberar el contenido si existe degradación [31].

En sistemas de liberación controlada, donde se necesita generar interacciones físicas y/o químicas con las IFAs, es útil la presencia de un polícatión como el quitosano en medio ácido; incluso por ser facilitador de la penetración mediante la apertura de las uniones estrechas epiteliales [46].

Las redes de quitosano pueden seguir tres mecanismos de encapsulación dependiendo de la IFA cargada: difusión, atrapamiento o unión covalente, respectivamente en la Figura 16 [35].

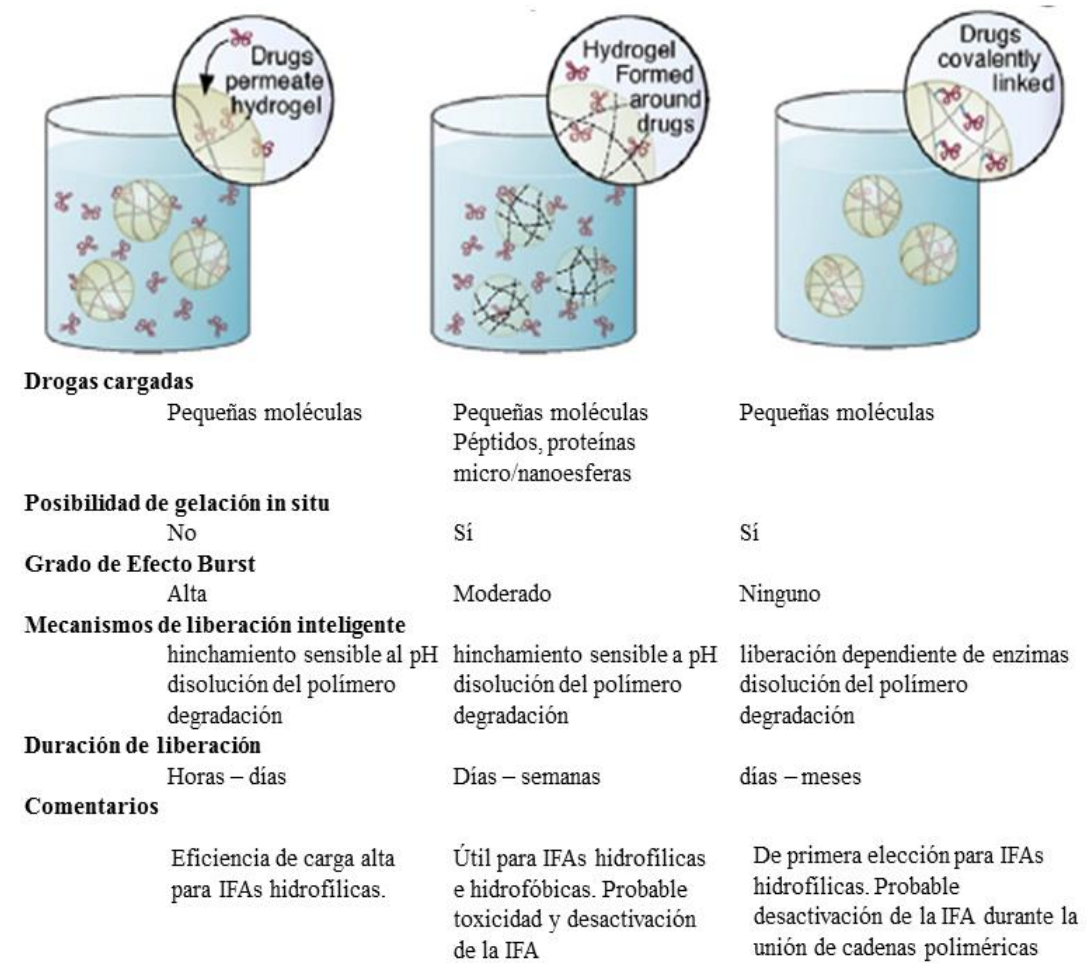


Figura 16. Métodos de encapsulación para hidrogeles de Quitosano [29]

2.6.6. Agente entrecruzante

Como se mencionó, la quitina forma complejos en su determinada biomasa; esto se debe a la presencia de grupos amina, principalmente, que en medio ácido son protonados [31]. Sin embargo, su poca cantidad de grupos reactivos hace que la quitina se comporte como molécula neutra; a diferencia del quitosano, que por debajo de su pKa queda protonado y listo para interactuar [31].

Estas interacciones también pueden ser solo de adsorción [31]. Las proteínas, a un pH superior a su punto isoeléctrico, tienen carga negativa; esto favorece esta interacción, aunque sea débil y fácilmente reversible.

Un agente entrecruzante puede ser clasificado según el tipo de unión generada entre las cadenas poliméricas: no covalente, complejo coordinado (uniones físicas) y covalente (unión química), como se explica en la Figura 17.

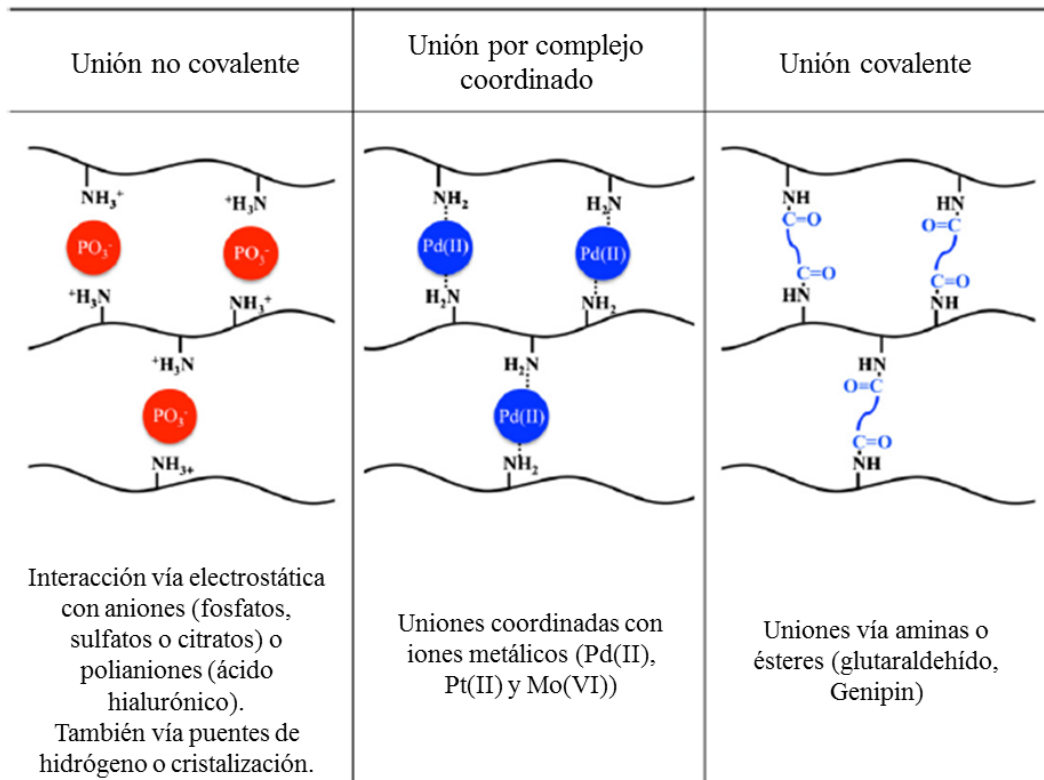


Figura 17. Representación esquemática de tres hidrogéis de quitosano elaborados con distintos tipos de agente entrecruzante [47].

La estructura más simple es aquella que sólo comprende entrecruzamiento entre cadenas del mismo polímero, en este caso quitosano, como se ve en la Figura 18 [37].

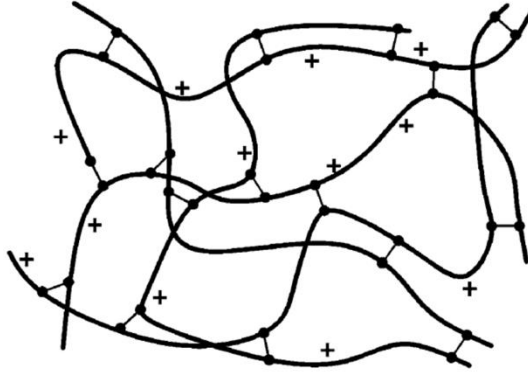



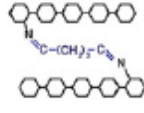

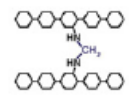
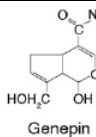
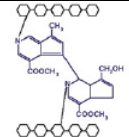

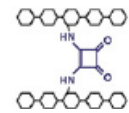

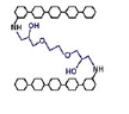
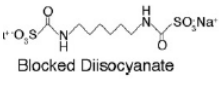
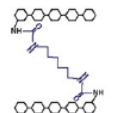

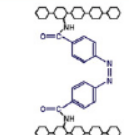

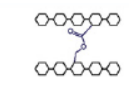

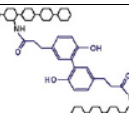

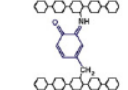
Figura 18. Esquema de la red de quitosano entrecruzadas covalentemente

Los enlaces covalentes son las uniones por excelencia en la formación de la red, aunque no son las únicas. Los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas juegan un rol importante en la formación de un hidrogel de interacciones físicas [37].

Los entrecruzantes químicos suelen ser moléculas pequeñas con al menos dos grupos funcionales que permitan la formación de enlaces entre las cadenas poliméricas [37]. Al ser más económico, sencillo, proveer buenas propiedades mecánicas, evitar la disolución ante condiciones extremas (pH) y duradero (enlaces covalentes irreversibles) en comparación a otros métodos, son entrecruzantes de primera elección; sin embargo su cuestionada toxicidad limita su uso [35].

De todos los agentes químicos entrecruzantes enlistados en la Tabla 2, el glutaraldehído es el más estudiado. Su mecanismo de entrecruzamiento involucra la reacción de Schiff entre los grupos ceto y los grupos amina del quitosano para formar enlaces imina [37].

Tabla 2. Listado de agentes entrecruzantes en hidrogeles a base de quitosano [29]

	Agente	Grupo funcional blanco	Condiciones de reacción	Interconexión	Comentario
PEQUEÑAS MOLÉCULAS	 Glutaraldehyde	Aminas primarias y aldehídos	Medio básico – neutro		Reacción completa en 1 hora. Dificultad de remover las trazas.
	 Formaldehyde	Aminas primarias y aldehídos	Medio básico – neutro		Reacción completa en 1 hora. Dificultad de remover las trazas.
	 Genepin	Aminas primarias y aldehídos	Independiente de pH		No tóxico. Autopolimerización
	 Diethyl Squarate (DES)	Aminas primarias	pH 4,5 – 5,5. Precipita a pH básico. Favorecen altas temperaturas		No tóxico y reacciones de tiempo prolongado.
	 Ethylene glycol diglycidylether (EGDE)	Aminas primarias y oxiranos	pH básico y altas temperaturas		Trazas de EDGE. Reacciones de tiempo prolongado.
	 Blocked Diisocyanate	Aminas primarias	pH básico y altas temperaturas		Reacciones de tiempo prolongado y gelación en medio básico.
FOTOSENSIBLE	 Funcional azides	Aminas primarias	pH independiente		Útil para hidrogeles inyectables
	 Funcional acrylates	Otros ácidos acrílicos	pH independiente		Útil para hidrogeles inyectables
EZIMÁTICO	 Phloretic acid	Aminas primarias	pH fisiológico		Gelación rápida in situ
	 Activated Quinone	Aminas primarias	pH 5,8 – 6 a 35°		Gelación en menos de 2 horas.

La toxicidad del glutaraldehído en el cuerpo humano no se comprende aún por completo. Se conoce su efecto neurotóxico [37], pero a su vez se ha realizado trabajos similares al que se plantea su uso como entrecruzante sin evidenciar toxicidad, pues no supera la concentración mínima tóxica (3 ppm) que inhibe el crecimiento de fibroblastos en el 99% de cultivos [48].

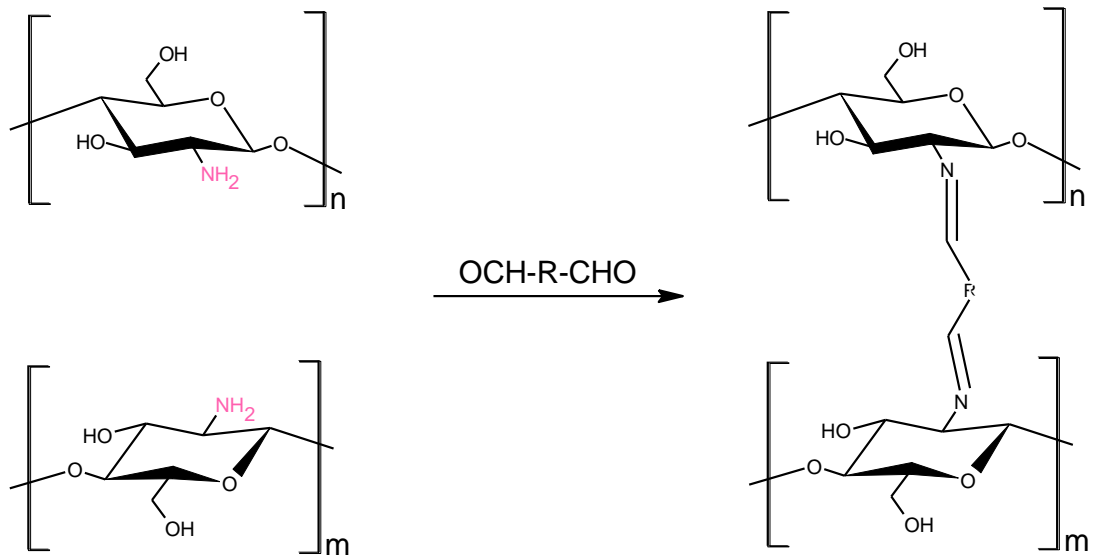


Figura 19. Entrecruzamiento de cadenas de quitosano con un dialdehído

Actualmente se continúa usando este entrecruzante, aunque por cuestiones de seguridad y para evitar la calcificación del producto [49, 50], es importante la remoción completa de trazas de glutaraldehído sin reaccionar [37].

La reacción de entrecruzamiento quitosano – glutaraldehído depende de la concentración de este, el PM del polímero y, en este caso particular, por un incremento de la temperatura [37].

III. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis nula

La matriz a base de β -quitosano retardará la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), sin depender de las variaciones en el pH por las que podría pasar una úlcera cutánea.

3.2. Hipótesis alterna

La matriz a base de β -quitosano retardará la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), dependiendo de las variaciones en el pH por las que podría pasar una úlcera cutánea.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El pH, por los que pasa una úlcera dérmica, influye en retardar la liberación de PDGF-BB a partir de una matriz de β -quitosano?

V. OBJETIVOS

5.1. General:

Describir cualitativamente la influencia del pH del medio (6.5 y 7.4) en la liberación de PDGF-BB a partir de una matriz de β -quitosano bajo dos concentraciones de lisado plaquetaria o LP (6% y 12%).

5.2. Específicos:

- Elaborar un hidrogel a base de β -quitosano que retarde la liberación de PDGF-BB y mantenga una consistencia que permita su fácil manipulación.
- Conocer sobre el mecanismo de entrapamiento del PDGF-BB en la matriz de β -quitosano.
- Caracterizar el β -quitosano: grado de desacetilación (GD) y peso molecular promedio (PM)
- Cuantificar la concentración de PDGF-BB liberado a los dos medios (pH 6.5 y pH 7.4) a distintos tiempos y a las dos concentraciones de LP; con estos datos, graficar e interpretar las diferencias.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Esta tesis es parte del trabajo de investigación: *“Desarrollo y evaluación del potencial regenerativo de un gel rico en factores de crecimiento plaquetarios y células madre mesenquimales para la cicatrización de úlceras cutáneas”*, con código de SIDISI: **0000064171**; en el Laboratorio de Inmunología a cargo del Dr. José Luis Aguilar. Por lo tanto la muestra de PRP utilizada, será provistas por los investigadores de dicho trabajo, con los respectivos consentimientos informados (código de aprobación FinCyT **PIAP-3-P-740-14**).

El β -quitosano se obtuvo del Laboratorio de la unidad de Biominería y Medio Ambiente a cargo del *Dr. José Luis Bauer Cuya*; el mismo que será tratado para los objetivos de este trabajo.

Métodos

A continuación se muestra el flujograma de las actividades destinadas a realizar:

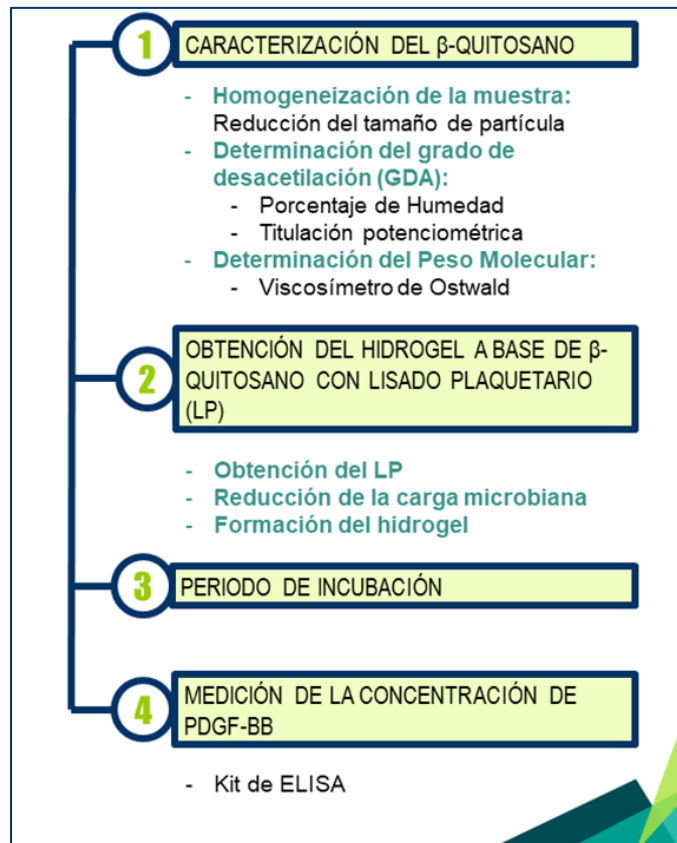


Figura 20. Flujograma de las actividades comprendidas dentro de los materiales y métodos

6.1. Caracterización del β -quitosano

6.1.1. Homogenización de la muestra

La materia prima fue triturada con un molino analítico modelo 4301 – 02, 50/60 Hz, 180 W, 20 000 RPM, marca Cole-Parmer Instrument Co. y tamizada por malla de acero W.S. TYLER n°60, para tener un tamaño de partícula homogéneo. Esta muestra procesada es la que se usará en lo sucesivo.



Figura 21. Molino analítico usado para la reducción de tamaño de partícula.



Figura 22. Malla de acero N° 60 usada para obtener partículas de tamaño homogéneo.

6.1.2. Determinación del grado de desacetilación

1. *Determinación del porcentaje de humedad (% humedad)*

El % humedad se determina por gravimetría, llevando a peso constante (diferencia de 0.05 g) una cantidad de muestra, debidamente pesada, tras ser expuesta a 105 °C [31].



Figura 23. Estufa acondicionada a 105 °C

2. *Valoración potenciométrica del grado de desacetilación (GD)*

La técnica consiste en disolver el β -quitosano en un exceso conocido de HCl 0.2N. Luego, esta solución es titulada con una solución de NaOH 0.05N y se obtienen las medidas de pH con el pH-metro equipado con electrodo de vidrio. La curva obtenida describe la variación del pH al agregar NaOH con dos puntos de inflexión; la diferencia en mililitros entre ambos puntos corresponde al ácido consumido para la protonación de grupos amino, los que permiten determinar el grado de desacetilación del quitosano. Considerar para los cálculos el valor del peso seco de la muestra corregido según el % humedad [31]. La siguiente ecuación permite calcular el grado de acetilación (GA):

$$GA = \frac{100 \times \text{Normalidad}_{\text{NaOH}} \times V \times \text{PEq}_{\text{NH}_2}}{\text{Peso de la muestra}}$$

Donde: V es la diferencia de volúmenes (litros) entre el segundo y primer punto de inflexión y PEq_{NH_2} es 16.02258 g/Eq.

6.1.3. Determinación del peso molecular promedio

El peso molecular promedio se determinó con un viscosímetro de Ostwald con diámetro 0.5 mm y a condiciones ambientales controladas ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1$). El solvente usado fue HAc 0.3M/NaAc 0.2M [31, 32, 51, 52].

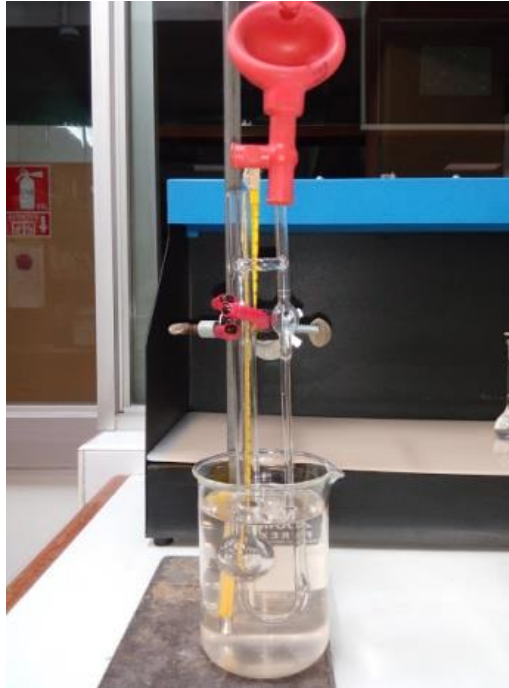
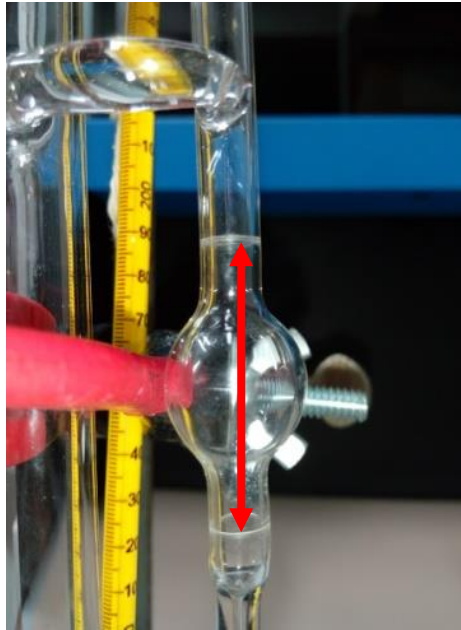


Figura 24. Viscosímetro de Ostwald

1. *Viscosidad Relativa:* Se determina la viscosidad relativa de 4 concentraciones diluidas del polímero. Con los datos del tiempo de caída de cada una de estas, se llega a la relación siguiente, para hallar la viscosidad relativa de cada solución:

$$\eta_r = \frac{n}{n_0} = \frac{t}{t_0}$$

Donde se denomina η_r viscosidad relativa; t_0 y t son el tiempo de caída; n_0 y n la viscosidad; del solvente y la muestra, respectivamente.



Tiempo de caída: lo que toma el líquido en escurrir desde la marca superior a la

Figura 25. Esquematación de la medición del tiempo de caída

2. *Viscosidad reducida* (η_{red}): Los valores de viscosidad reducida se obtienen restando una unidad a los valores de η_r , y dividiéndolo por el valor de la concentración de la solución correspondiente.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_r - 1}{c}$$

3. *Viscosidad intrínseca:* Se obtiene extrapolando la viscosidad reducida a una concentración de cero. Esta viscosidad se encuentra relacionada con el peso molecular de acuerdo a la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M_v es el peso molecular promedio, K y α son constantes dadas para un sistema soluto-solvente.

De esta manera se construye la curva de η_{red} vs concentración de β -quitosano en soluciones de 0.3 M HAc y 0.2 M NaAc, donde el intercepto con el eje Y es la $[\eta]$.

Reemplazando en la ecuación el valor de la $[\eta]$ y tomando los valores de 0.076 mLg⁻¹ y 0.76 para α y K , respectivamente, reportados por Kasaai et al; según el GD.

6.2. Obtención del hidrogel a base de β -quitosano con lisado plaquetario

6.2.1. Obtención del lisado plaquetario (LP):

Todo procedimiento descrito a continuación se desarrolló en cabina de flujo laminar a no ser que se especifique lo contrario. A partir de una muestra de PRP (concentración de plaquetas de 1.5×10^6), se toma una alícuota de 10 mL y se somete a un shock de temperatura para lisarlas. Para esto, el tubo Falcon debidamente sellado con parafilm, que contiene los 10mL de PRP, se congela a -70°C por 12 horas para luego descongelar a 37°C (aproximadamente 10 minutos), lo que se denomina un ciclo. Después de tres ciclos, se centrifuga la muestra a 2500 rpm durante 15 minutos, al concluir se trasvasa el sobrenadante a un tubo nuevo manteniendo las condiciones estériles, esto es el LP [53, 54, 55].

6.2.2. Reducción de la carga microbiana en los componentes:

Los FCs en el LP son susceptibles a la contaminación microbiana; por lo cual se busca mantener el preparado lo más aséptico posible. Las estrategias se detallan a continuación según componentes:

- Solución de ácido acético 2%: Se preparó la solución de ácido acético, la cual se dejó en el autoclave por aproximadamente 3 horas.
- Solución de β -quitosano 1.5%: Pasteurización a altas temperaturas por corto tiempo; colocar la solución de β -quitosano en botellas de vidrio resistentes a altas temperaturas y dejarla semi-abierta. Preparar el equipo de baño maría y cuando la temperatura esté en el rango $87 - 88^\circ\text{C}$, colocar la botella por unos 7 minutos. En este sistema, es importante que el agua cubra la botella, hasta no apreciar su contenido [56].
- Glutaraldehído 25%: Filtrar la solución a través de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ dentro de una cabina de flujo laminar.

- Lisado plaquetario: El proceso que se sigue desde la estéril obtención del PRP, el producto que le da origen, se cuidó para mantenerlo en la misma condición. Además se filtró la solución a través de un filtro de 0.22 μm .

6.2.3. Formación del hidrogel:

1. Estudios de pre-formulación

El hidrogel propuesto está compuesto por: β -quitosano 1.5% (p/v) en ácido acético 2%, Glutaraldehído 0.03M [57, 58, 59] y lisado plaquetario. La concentración de β -quitosano seleccionada está comprendida en lo usado generalmente en hidrogeles (1 – 3 %) [55, 58, 59, 60, 61] y la máxima cantidad disuelta. El solvente escogido fue el que demostró ser accesible, mantener la solubilidad y estabilidad.

Ambos, la concentración de β -quitosano y el solvente, fueron evaluados usando la microscopia, esperando no encontrar partículas sin disolver; es así que se escogió la propuesta más acorde a los objetivos del trabajo (los resultados se encuentran en Anexos).

2. Diseño experimental con dos factores de estudio

Se tendrán dos factores en el estudio: %LP (propio de la preparación) y pH del medio de liberación (período de incubación). La %LP se ensayó teniendo como referencia el rango de PDGF-BB en una persona sana [62]. Para ello, se sigue el diseño experimental 2^k , a continuación se muestran los detalles:

Tabla 3. Esquema de diseño experimental con dos factores de estudio (2^k)

Factores de estudio	Niveles de Factores	Respuesta a medir
%LP	6%	[PDGF-BB]
	12%	
pH del medio	6.5	
	7.4	

La siguiente tabla muestra el esquema a seguir para la recolección de datos sobre las corridas experimentales, por punto de tiempo:

Tabla 4. Esquema de recolección de datos según el diseño experimental 2^k

Corrida	%LP	pH del medio	[PDGF-BB] Repeticiones			[PDGF-BB] Promedio
			I	II	III	
1	6	6.5				
2	12	6.5				
3	6	7.4				
4	12	7.4				

2. *Preparación:* En dos frascos, colocar la solución de β -quitosano 1.5%, mover hasta lograr dispersar homogéneamente la solución. Luego adicionar el LP al 6% o 12% (v/v) y seguir homogeneizando con ayuda de un agitador magnético. Por último adicionar glutaraldehído al 25% para llegar a una concentración de 0.03M e inmediatamente agitar vigorosamente. Rápidamente traspasar 1 ml de la mezcla en cada pozo de la placa de 24 pozos y dejar reposar. La distribución depende de los tiempos en horas (h) a los que se desea medir la concentración de PDGF-BB.

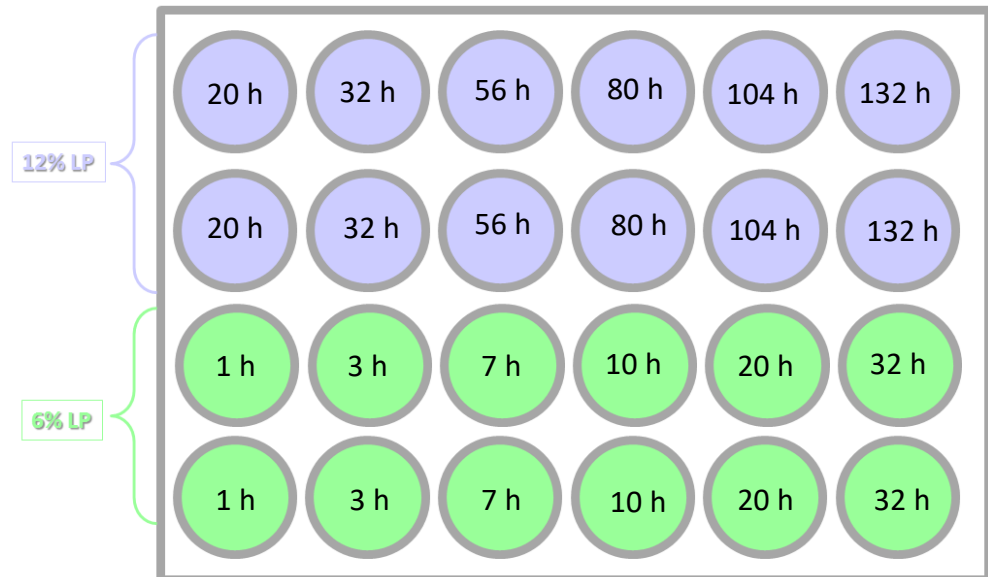


Figura 26. Esquema de distribución de la placa para el experimento

6.3. Periodo de incubación

6.3.1. Preparación de PBS a distintos pH:

Las soluciones de PBS se componen de dos sales: sal fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y la sal fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4). Para alcanzar los pH (6.5 y 7.4) necesarios, se mezclan dos soluciones:

- Solución monobásica: 3.475 g de fosfato monobásico de sodio en 25 mL de agua.
- Solución dibásica: 1.77 g de fosfato dibásico de sodio en 25 mL de agua.

Finalmente, se obtuvo dos soluciones de pH 6.76 y 7.51.

6.3.2. Incubación:

A cada pozo con el hidrogel se le agrega 400 μL del PBS a un pH determinado. Luego se sella adecuadamente para colocar la placa en la incubadora (5% CO_2). Tal y como se muestran en los esquemas del apartado anterior.

6.4. Medición de la concentración de PDGF-BB

Las cuantificaciones de PDGF-BB se realizaron bajo las especificaciones del producto DuoSet® ELISA para PDGF-BB (Número de Catálogo: DY220).

a) Preparación de la placa: Sensibilización

Diluir el anticuerpo de captura en PBS (400 ng/mL). Inmediatamente colocar 100 μL de esta solución en cada pozo de la placa de 96 pozos. Incubar por toda la noche a temperatura ambiente.

Lavar cada pozo con buffer de lavado hasta el tope (400 μL). Concluidos los tres lavados, asegurarse de la ausencia de líquido, invirtiendo la placa o dando un golpe en seco.

Bloquear las placas agregando a cada pozo 300 μL de reactivo diluyente y dejar incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

Repetir el lavado del contenido (por triplicado).

El PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2–7.4, filtrado con filtro 0,2 μm .

El Buffer de Lavado: 0.05% Tween® 20 en PBS, pH 7.2-7.4

El Reactivo Diluyente: 1% BSA en PBS, pH 7.2-7.4, filtrado con filtro 0,2 µm.

b) Procedimiento del ensayo:

Agregar 100 µL de la muestra/estándar (diluidas en reactivo diluyente), cubrir con parafilm y dejar incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

- Las muestras de los sobrenadantes de cada pozo se diluyeron 50:100.

- El estándar (85ng/0.5mL) se diluyó a las siguientes concentraciones:

170 000 pg/mL → 2 000 pg/mL → 1 000 pg/mL → 500 pg/mL → 250 pg/mL
→ 125 pg/mL → 62.5 pg/mL → 31.3 pg/mL

Repetir la aspiración y lavado del contenido (por triplicado).

Adicionar 100 µL de la solución de trabajo Streptavidina-HRP (Concentración de trabajo: Dilución 1/200) a cada pozo, cubrir con parafilm y dejar incubando a temperatura ambiente, alejado de la luz por 20 minutos.

Repetir el lavado del contenido (por triplicado).

Adicionar 100 µL de la solución Sustrato (H₂O₂ y Tetrametilbencidina 1:1) a cada pozo; cubrir con parafilm y dejar incubando a temperatura ambiente, alejado de la luz por 20 minutos

Agregar la solución de parada (H₂SO₄ 2N), se notará un cambio de color de celeste a amarillo, asegurar su completa homogenización.

c) Lectura de absorbancias

Se leyó las absorbancias con el lector de placas a longitud de onda 470 nm.

6.4.1. Prueba estadística

Para contrastar la hipótesis planteada se analizará la significancia del valor p en la prueba T con dos muestras para el hidrogel que contiene 6% de LP y, el de 12% LP. Previamente se evaluó la normalidad de los datos; al no serlos, se trabajó con el logaritmo base 10 de los datos. Todos los resultados de este apartado se realizaron en Minitab 17.

VII. RESULTADOS

7.1. Caracterización del β -quitosano

7.1.1. Homogeneización de la muestra

Bajo la metodología de la molienda, se obtuvieron partículas de máximo, 250 μm ; tamaño que incrementó la solubilidad del β -quitosano.

7.1.2. Determinación del grado de desacetilación

Para hallar el GD se debe trabajar con el peso seco del polímero.

- Determinación del % de Humedad

Tabla 5. Datos y resultados de la determinación del % Humedad

	Peso inicial de la muestra (g)	Peso final de la muestra (g)	%Humedad
Muestra 1	1.0045	0.8804	12.35
Muestra 2	1.0568	0.9251	12.46
Muestra 3	1.0125	0.8866	12.43
Muestra 4	1.0028	0.8772	12.52
Muestra 5	1.0059	0.8755	12.96
PROMEDIO		0.896 \pm 0.021	12.47 \pm 0.240

- Titulación potenciométrica

Los resultados de las tres muestras analizadas, las cuales solo difieren en peso inicial de la muestra, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6. Datos y resultados de la determinación del GD

	Peso de la muestra (g)	Grado de acetilación (%)	Grado de desacetilación (%)
Muestra 1	0.3522	5.79	94.21
Muestra 2	0.2637	6.11	93.89
Muestra 3	0.1797	4.52	95.48
PROMEDIO			94.53 \pm 0.842

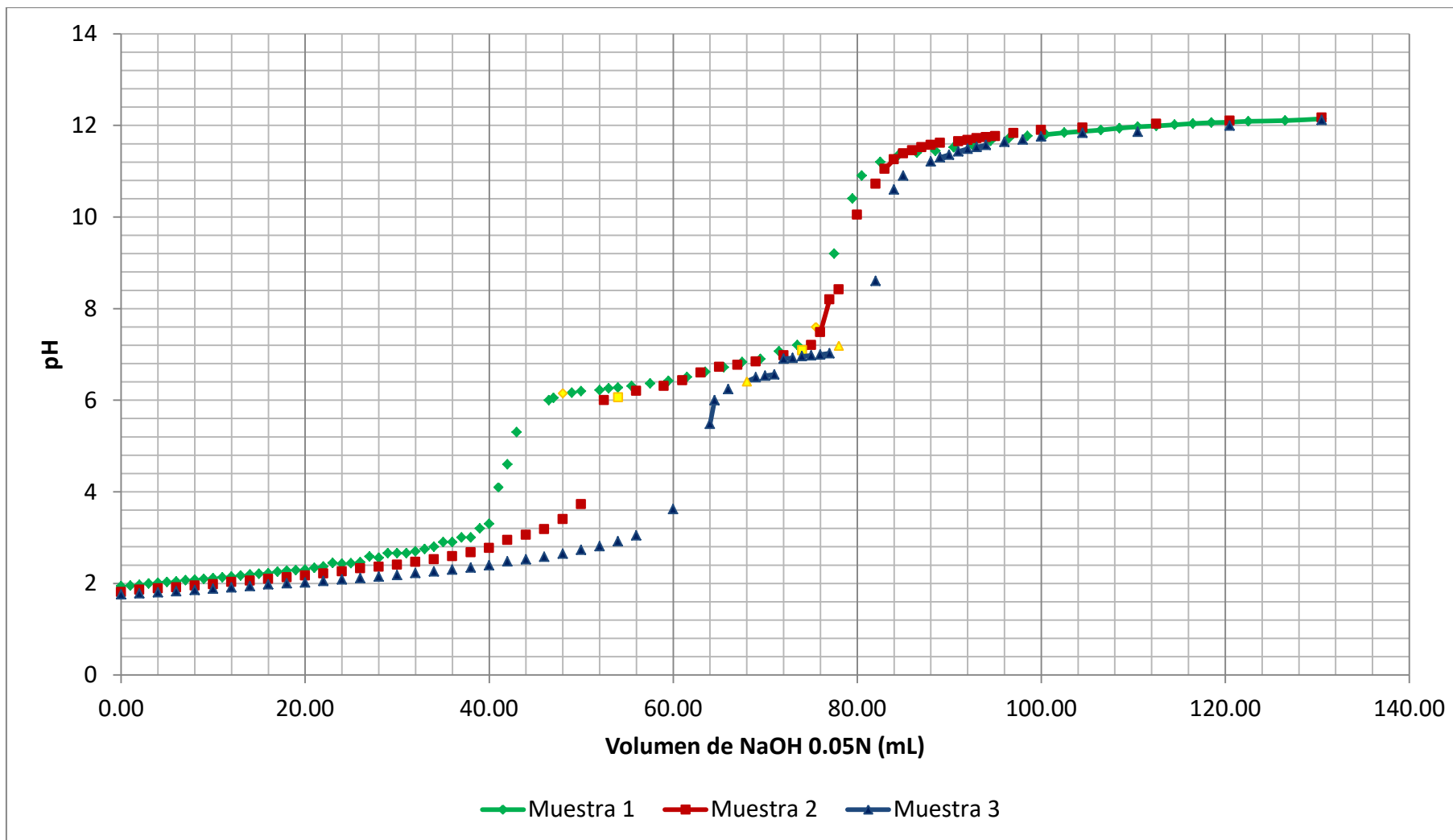


Figura 27. Titulación ácido-base para hallar el Grado de Desacetilación (GD) de tres muestras de β -quitosano con diferentes pesos.

7.1.3. Determinación del peso molecular promedio

Tabla 7. Datos para determinar el peso molecular promedio del β -quitosano

Concentración (g/mL)	Tiempo (s)	Viscosidad Relativa	Viscosidad Reducida [mL/g]
Solvente: HAc 0.3M y NaAc 0.2M	35.032	---	---
7.92×10^{-04}	89.296	2.549	1955.779
7.00×10^{-04}	80.521	2.299	1853.706
6.84×10^{-04}	78.374	2.237	1808.775
4.96×10^{-04}	60.555	1.729	1.47×10^3

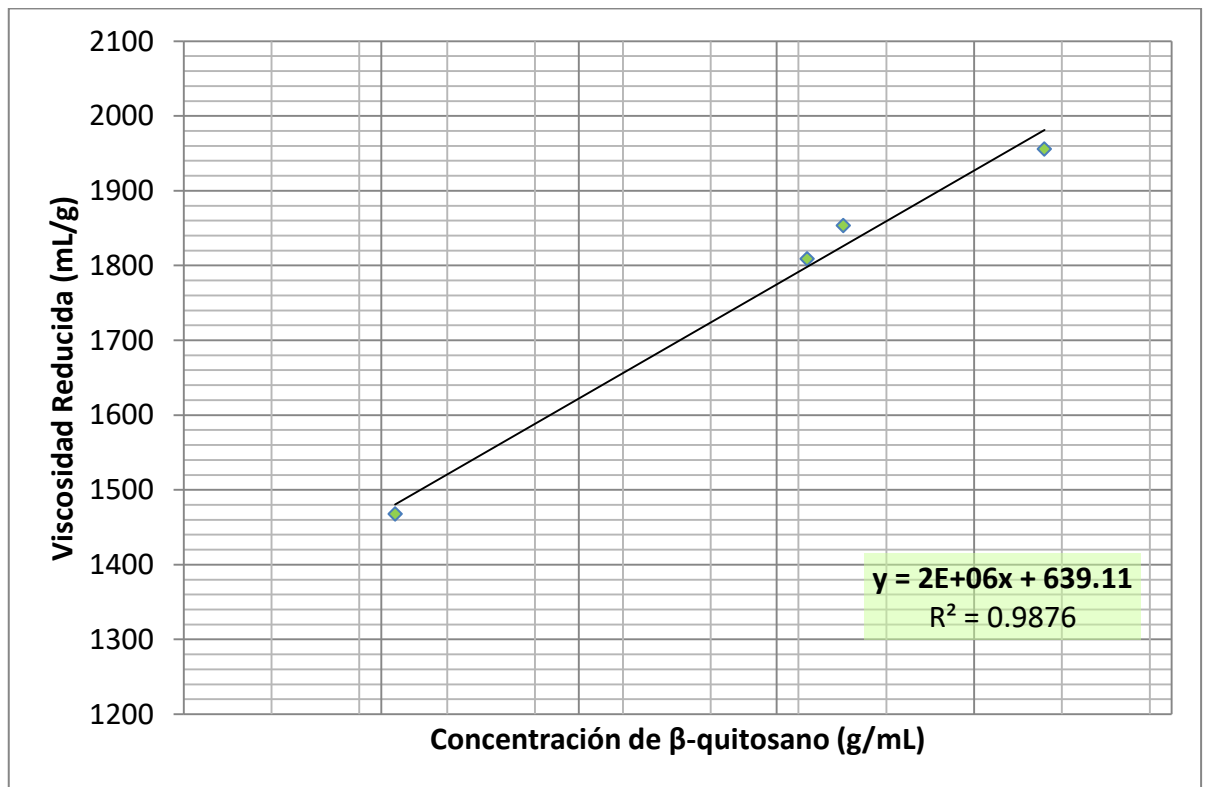


Figura 28. Concentración de las soluciones de β -quitosano vs la viscosidad reducida (mL/g)

Tabla 8. Resultados de la determinación del peso molecular promedio del β -quitosano

k (mLg ⁻¹)	0.076
α	0.76
Viscosidad Intrínseca	639.11
Peso Molecular (kD)	145.94

7.2. Medición de la concentración de PDGF-BB

7.2.1. Curva de calibración

Tabla 9. Datos de absorbancias (ABS) para la curva de calibración

	ABS	ABS - BLANCO	Concentración de PDGF-BB (pg/mL)
Estándar 1	0.27680	0.25780	31.3
Estándar 2	0.31690	0.29505	62.5
Estándar 3	0.32720	0.30535	125
Estándar 4	0.39180	0.36995	250
Estándar 5	0.48610	0.46425	500
Estándar 6	0.71000	0.68815	1000
Estándar 7	1.07140	1.04955	2000
BLANCO	0.019		

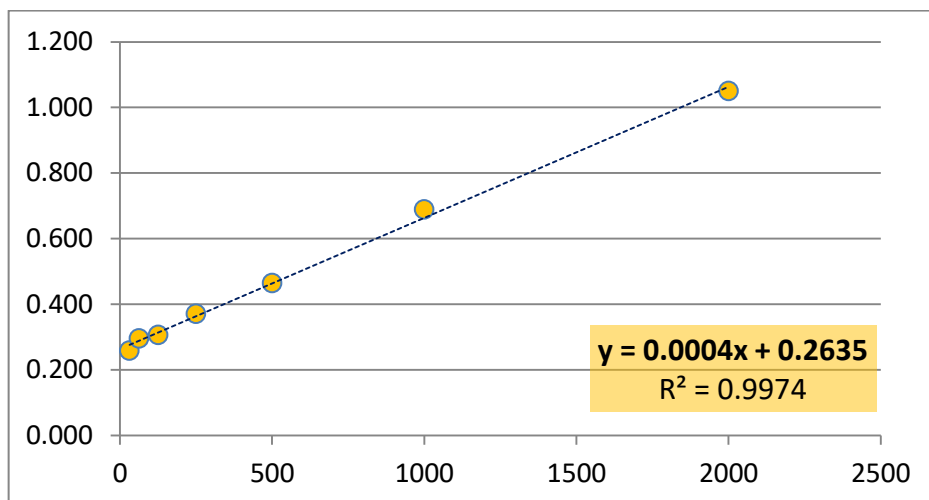


Figura 29. Curva de calibración para las mediciones de PDGF-BB por ELISA

7.2.2. Curvas de la cinética de liberación

Tabla 10. Concentraciones PDGF-BB a partir de hidrogel con LP 6%

TIEMPO (Hrs)	A	B
1	4985.33	2555.67
3	5700.00	3252.75
7	6210.50	3797.83
10	6415.83	3892.33
20	6250.34	4006.67
32	6200.70	4005.67

Donde: **A** es la concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5; **B** es la Concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4.

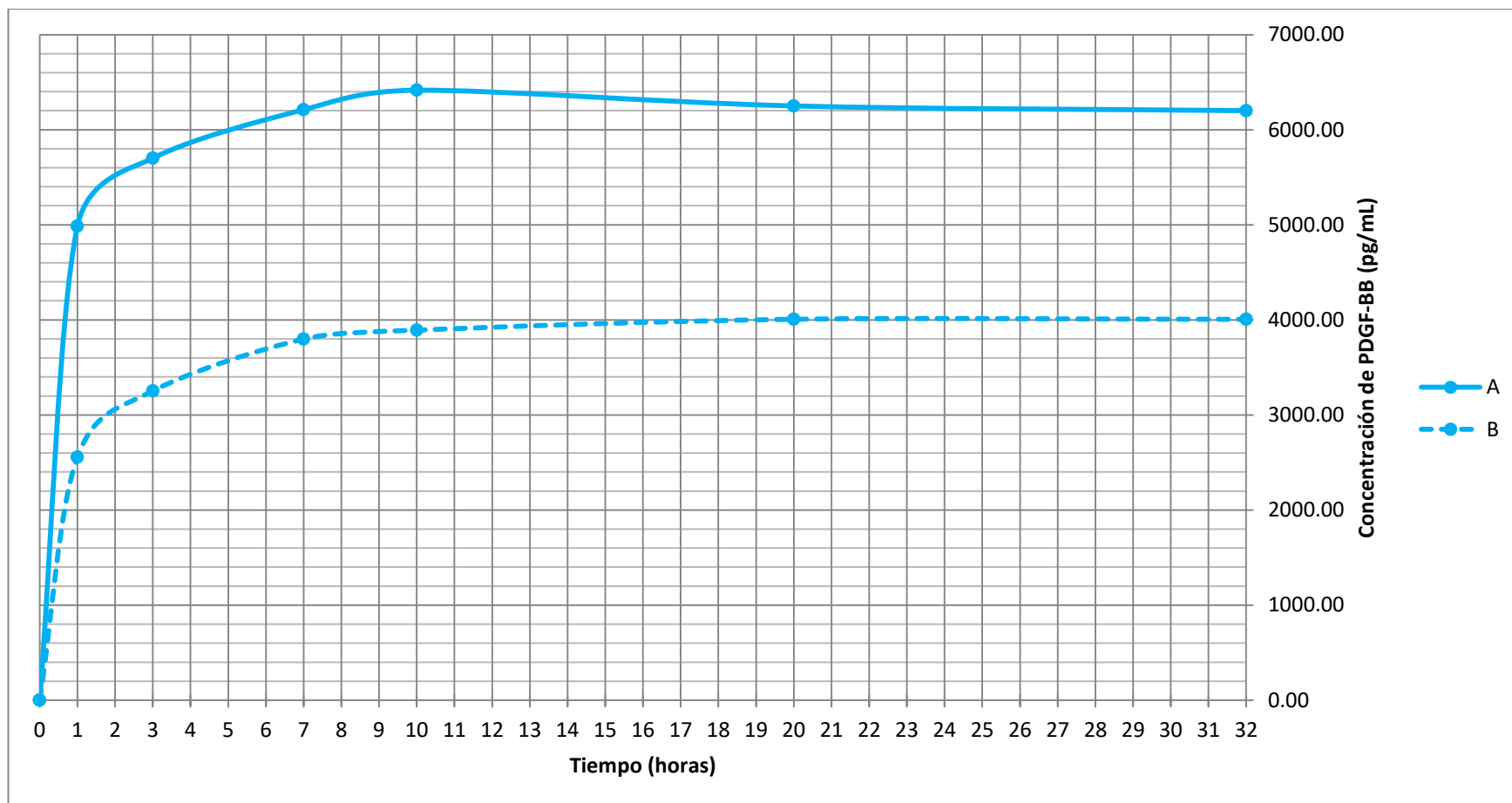


Figura 30. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 6% de LP expuesto a pH 6.5 y pH 7. Donde: A es la concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5; B es la Concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4.

Como se observa en la Figura 31, ambas curvas siguen una tendencia ligeramente similar, siendo las que se trabajaron con pH 6.5 las que muestran valores más altos de concentración de PDGF-BB. A partir de las 10 horas la curva correspondiente a las muestras expuestas a pH 7.4 se mantuvieron ligeramente constantes, mientras que las trabajadas a pH 6.5 muestran una ligera caída.

Tabla 11. Concentraciones de PDGF-BB a partir de un hidrogel con LP 12%

TIEMPO (Hrs)	A	B
0	0.00	0.00
20	5908.87	5897.73
32	6706.00	6739.33
56	6640.33	6723.45
80	6578.94	6730.21
104	6499.87	6690.89
131	6489.76	6789.93

Donde: **A** es la concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5; **B** es la Concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4.

En la Figura 32, ambas curvas de las muestras trabajadas con un LP del 12% se superponen.

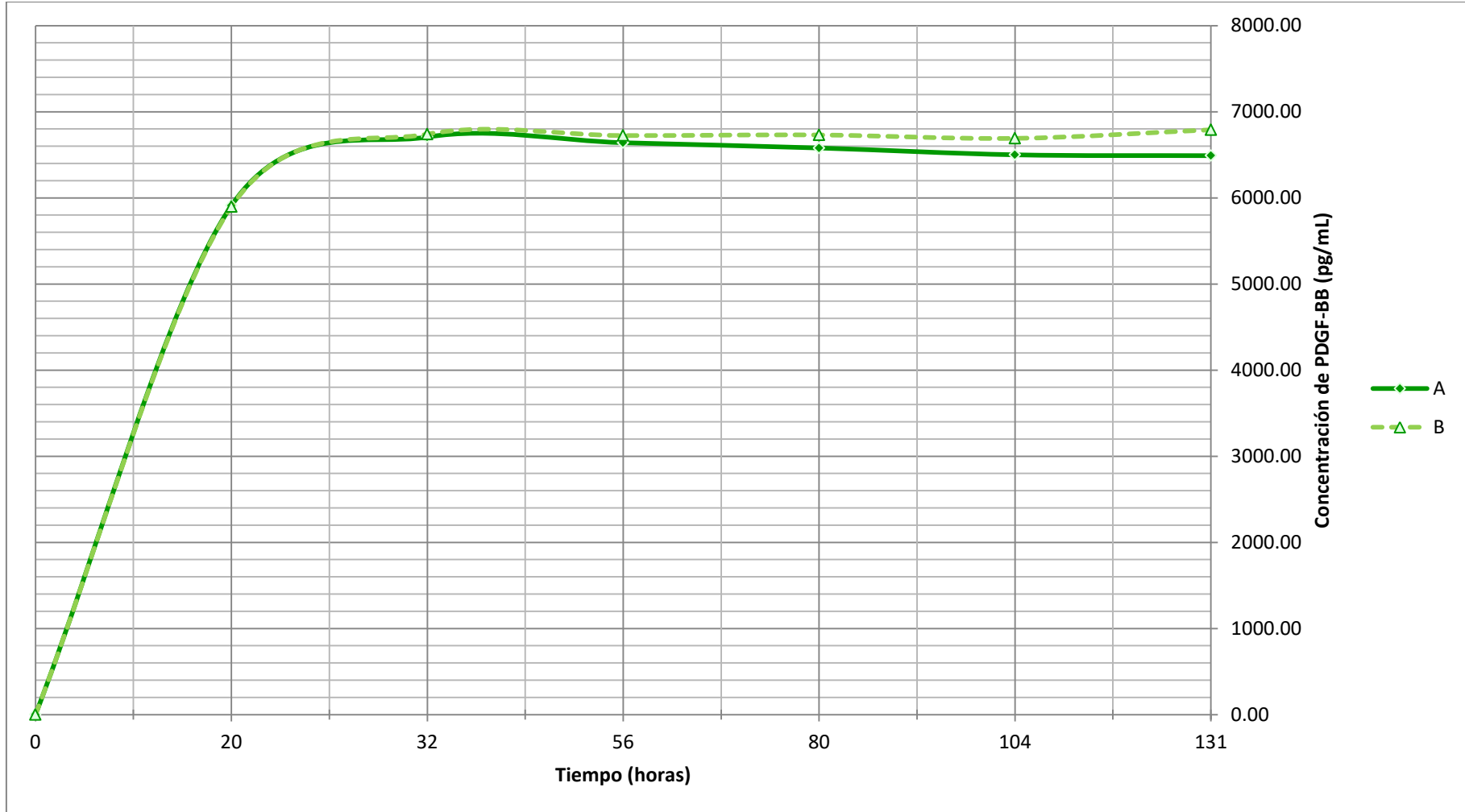


Figura 31. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 12% de LP expuesto a pH 6.5 y pH 7.4. Donde: A es la concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5; B es la Concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4.

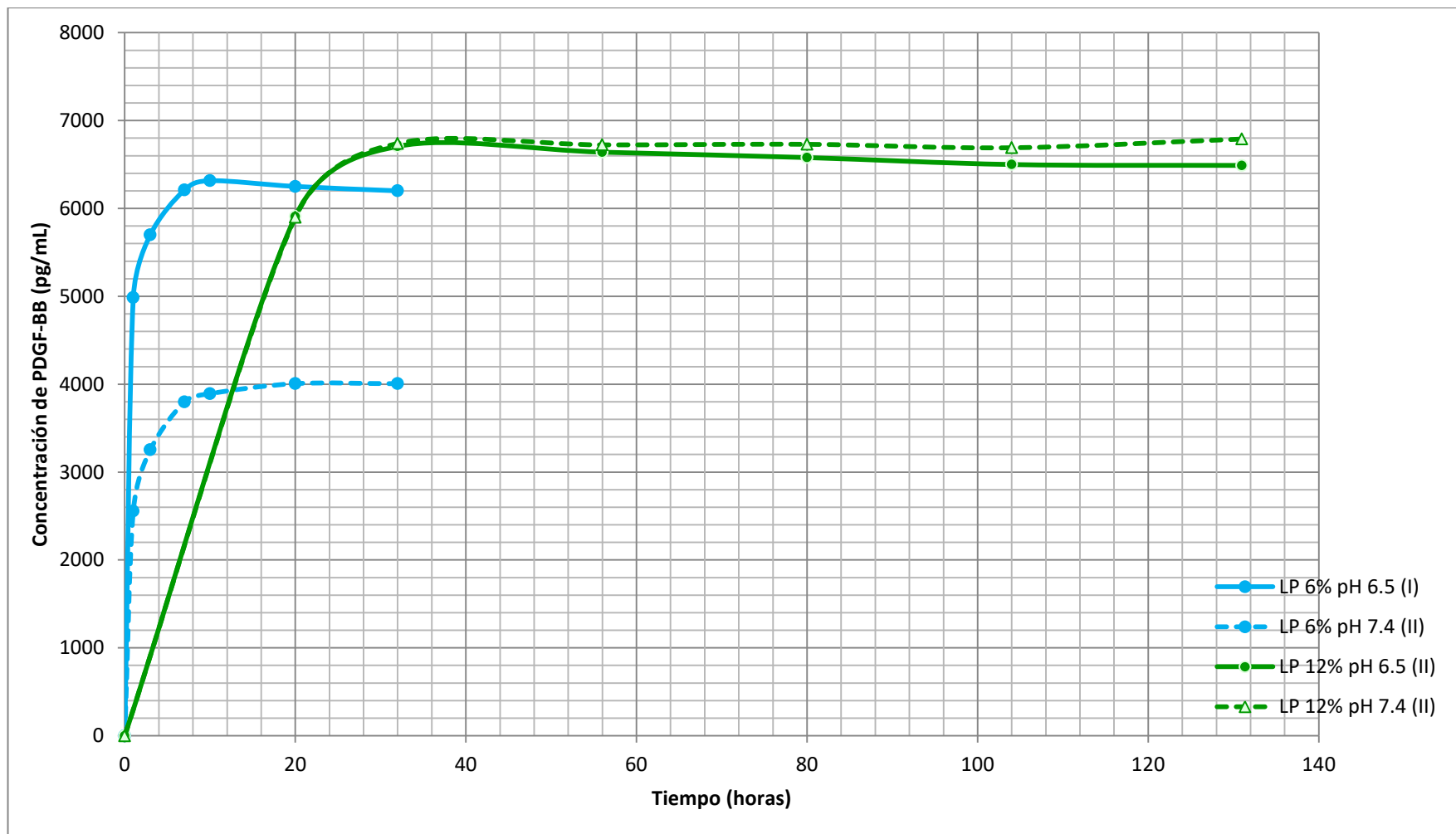


Figura 32. Liberación de PDGF-BB del hidrogel de β -quitosano con 6% y 12% de LP, cada uno expuesto a pH 6.5 y pH 7.4

7.2.3. Prueba estadística

- Hipótesis

H₀: La concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5 es igual a la concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4 (La diferencia entre los valores es cero).

H₁: La concentración de PDGF-BB liberado a pH 6.5 es diferente a la concentración de PDGF-BB liberado a pH 7.4 (La diferencia entre los valores es diferente de cero).

- Prueba de Normalidad

La prueba T requiere que la distribución de los datos sea Normal. Por ello, primero se identificó el tipo de distribución de los valores de las concentraciones de PDGF-BB bajo las siguientes condiciones:

- Con 6% de LP expuesto a pH 6.5
- Con 6% de LP expuesto a pH 7.4
- Con 12% de LP expuesto a pH 6.5
- Con 12% de LP expuesto a pH 7.4

Con ello se determinó con $p < 0.05$ (IC 95%) que los datos siguen una distribución exponencial; los detalles se encuentran en Anexos.

- Prueba T de dos muestras

Convirtiendo los datos de la distribución exponencial, aplicando la función logaritmo, se obtuvo que:

- Con un intervalo de confianza (CI) de 95% y el valor de $p < 0.05$; se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto: **La matriz de β -quitosano con 6% de LP, retardará la liberación de PDGF-BB dependiendo del pH.**
- Con un intervalo de confianza (CI) de 95% y el valor de $p > 0.05$; se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto: **La matriz de β -quitosano con 12% de LP, retardará la liberación de PDGF-BB sin depender del pH.**

VIII. DISCUSIÓN

La compleja problemática en el contexto de úlceras cutáneas, requiere un material que cubra la discontinuidad de la piel y ayude a regenerar el tejido. Es aquí donde entran a tallar los hemocomponentes como el plasma rico en plaquetas (PRP), el cual se usa para la regeneración de tejidos, incluso piel. Las plaquetas, componente mayoritario del PRP, al activarse liberan entre otras moléculas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), cuya actividad en el proceso de cicatrización es destacada y se encuentra abundante cantidad en referencia a otros factores de crecimiento.

Sin embargo, trabajos como el de Yang *et al*, 2011 argumentan que la aplicación de PRP en úlceras inducidas en ratas no tiene actividad cicatrizante; esto debido a la liberación instantánea de FCs y el número limitado de receptores. Como consecuencia, la fracción de FCs que no llegó unirse a su receptor, se inactiva influyendo negativamente en el proceso cicatrización [63]. Ante ello, más de un investigador opta por usar quitosano como matriz de formas farmacéuticas y así, lograr retardar la liberación [58-61].

El quitosano no es una entidad química, por lo que es necesario caracterizar la muestra usada en cada investigación. Como se aprecia en la Tabla 5, el % Humedad promedio fue de 12.47%, valor esperado para el β -quitosano, pues es un polímero hidrofílico. Con respecto al GD, son muchas las técnicas que puede usarse: espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), conductimetría, análisis elemental, análisis térmico, cromatografía, dicroísmo circular; de las cuales, la valoración potenciométrica representa la forma más sencilla y confiable de determinar el GD [30].

Se trabajó con tres muestras que difieren solo en peso, cuyas curvas se presentan en la Figura 27. El primer punto, que da inicio a la meseta (punto amarillo), está en pH 6.13, 6.06 y 6.41, para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente; mientras que el punto de pH en el cual termina son, 7.093, 6.97 y 7.19. Sin duda, no hay una diferencia notable en los pH que comprende la meseta; pero, sí en el gasto de NaOH 0.05N en

mililitros, que es menor conforme se disminuye el peso de la muestra. Este comportamiento se explica en el fundamento de la técnica. Al solubilizar el β -quitosano en un exceso de HCl en mismo volumen, la cantidad de muestra es la que produce la diferencia en la llegada al primer punto de inflexión, pues las tres muestras varían en protones excedentes en las soluciones. Pasada la meseta en donde el polímero floculó, al neutralizarse los grupos amino protonados, solo quedarán los grupos hidroxilo que se agreguen. Las muestras 1 (0.352 mg), 2 (0.264 mg) y 3 (0.180 mg), al ser la misma muestra deben dar valores similares de GD; esto se evidenció en el resultado, GD: 94.21%, 93.89% y 95.48%, respectivamente.

En la determinación del PM, la relación que ésta guarda con la viscosidad reducida se muestra en la Figura 28. Al ser extrapolada a $x = 0$, se obtiene la viscosidad intrínseca del polímero, que es usada en la Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, para hallar el PM de una molécula. Esta es la razón por la que se debe cuidar que las concentraciones sean diluidas [64] y en especial, la fuerza iónica del solvente. Esto se debe a que el monómero D-glucosamina del β -quitosano tiene una naturaleza iónica débil, siendo enmascarado rápidamente con el aumento de la fuerza iónica del solvente; esto repercute en la solubilidad, tamaño, flexibilidad y agregación de la macromolécula [65]. El resultado de la ecuación da como PM del β -quitosano, 145.45 kD; valor que se encuentra dentro del rango de PM para el β -quitosano disuelto en HAc 0.3M/NaAc 0.2M, establecido en el estudio de Rinaudo *et al*, 1993 (100 – 600 kD) [52, 64, 65].

Estas características, GD elevados y PM bajos, otorgan al β -quitosano propiedades particulares como buena solubilidad, mayor participación en interacciones iónicas, actividad antimicrobiana y fungistática; todas ellas basadas en la presencia de mayor cantidad de grupos amina. Estos grupos funcionales son potencialmente protonables, lo que mejora la solubilidad, interacciones iónicas y la actividad fungistática. Por otro lado, la actividad antimicrobiana depende más del PM, el cual mientras menor sea, facilita el movimiento e interacción con la membrana celular del microbio [30, 66].

La forma farmacéutica propuesta hace uso de este β -quitosano como matriz en el hidrogel para retardar la liberación de PDGF-BB, cuya medición con respecto al tiempo se muestra en las Figuras 30, 31 y 32.

La Figura 30 demuestra que la liberación de PDGF-BB del hidrogel elaborado con 6% de LP sí está influenciada por el pH ($p < 0.05$). La tendencia de ambas curvas es similar, pues la liberación de PDGF-BB se da de manera muy rápida, conocido como efecto burst, dentro de las tres primeras horas de su exposición al medio, alcanzado un estado estacionario cerca de las diez horas. La influencia del pH en la liberación de PDGF-BB se explica al considerar la composición de aminoácidos y su punto isoeléctrico (pH: 9.8). Expuestos a un medio ligeramente ácido (pH 6.5), la gran cantidad de aminoácidos básicos y polares (Figura 6) estarán en su forma catiónica; algunos de los aminoácidos polares estarán en su forma neutra y/o cargados positivamente; los aminoácidos ácidos estarán en su forma neutra y/o cargado positivamente; mientras que los aminoácidos básicos, estarán cargados positivamente. Todo conlleva a una repulsión de cargas entre PDGF-BB y la matriz de β -quitosano de manera brusca.

La Figura 31 demuestra que la liberación de PDGF-BB del hidrogel elaborado con 12% de LP no está influenciada por el pH ($p > 0.05$). En este caso las curvas además de seguir la misma tendencia, llegan a superponerse. No se evidencia efecto burst, pues la liberación máxima de PDGF-BB se da alrededor de las veintiséis horas, llegando a estacionarse los valores a las treinta y dos horas. Estos resultados no pueden ser explicados solo por interacciones iónicas, pues de ser así se verían influenciados por el pH. Tal como lo indican las Figuras 14 y 15, es válido pensar que el aumento en el porcentaje de LP implica un aumento de los grupos reactivos para generar nuevos enlaces covalentes. Pero, no todos estos enlaces son fuertes. La Figura 14 describe una posible reacción entre los grupos ceto o carboxilo, presente en aminoácidos de PDGF-BB con las aminas secundarias del β -quitosano para generar enlaces imina. Estos enlaces son fácilmente hidrolizables a pH ácidos y estables en pH neutros o alcalinos.

En el mismo trabajo de Yang *et al*, 2011 la liberación sostenida de PDGF-BB a partir de un gel de fibrina-heparina lo atribuye a interacciones electrostáticas entre los FCs y la heparina (macromolécula aniónica) [63]. Esta es la razón por la cual esta forma farmacéutica incluye glutaraldehído en pequeñas concentraciones con la finalidad de asegurar la liberación retardada. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo dan motivos para no excluir la formación de enlaces imina ni interacciones iónicas, abriendo la posibilidad de prescindir el uso de glutaraldehído.

La Figura 32 consolida el logro de diseñar una forma farmacéutica que retarde la liberación de PDGF-BB usando un hidrogel cuya matriz de β -quitosano carga 12% de LP. No obstante, una de las grandes interrogantes es conocer realmente cómo es que PDGF-BB se entrapa a la matriz de β -quitosano. Los argumentos previos son especulaciones hechas a partir de la teoría, pues se requerían de otros equipos para demostrar la formación de nuevos enlaces.

IX. CONCLUSIONES

- El β -quitosano con el que se trabajó, tiene 12.47 % de humedad, un grado de desacetilación de 94.53 % y peso molecular promedio de 145.45 kD.
- La liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB del hidrogel de β -quitosano con 6% de lisado plaquetario sí está influenciada por el pH ($p < 0.05$).
- La liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB del hidrogel de β -quitosano con 12% de lisado plaquetario no está influenciada por el pH ($p > 0.05$).
- El hidrogel de β -quitosano con 12% de lisado plaquetario consiguió retardar la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB en veintiséis horas.
- Los experimentos realizados no son suficientes para concluir cuál es el mecanismo por el cual el β -quitosano entrapa el factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shai A, Maibach HI. *Wound Healing and Ulcers of the Skin* [Internet]. Germany: Springer; 2005 [revisado Enero 2018; citado Enero 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=tYzut85bKlcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
2. Hermans MH. *Wounds and Ulcers: Back to the Old Nomenclature*. WOUNDS. 2010; 22(11): 280 – 293.
3. Vasudevan B. *Venous leg ulcers: Pathophysiology and Classification*. Indian Dermatology Online Journal. 2014; 5(3): 366 – 370.
4. NPUAP [Internet]. *NPUAP Pressure Ulcer Stages/Categories*. [revisado Enero 2018; citado Enero 2018]. Disponible en: <http://www.npuap.org/wp-content/uploads/2012/01/NPUAP-Pressure-Ulcer-Stages-Categories.pdf>
5. 3M [Internet]. *International NPUAP/EPUAP pressure ulcer classification system*. [revisado Enero 2018; citado Enero 2018]. Disponible en: http://www.wwic.wales/uploads/files/documents/Professionals/Pressure_Ulcer_Classification_Card.pdf
6. Flanagan M. *Review: The physiology of wound healing*. Journal of wound care. 2000; 9: 299-300.
7. Hall JE, Guyton AC. *Tratado de Fisiología médica*. Elsevier. 2011. 451:457.
8. Orsted HL, Keast D, Forest-Lalande L, Françoise Mégie M. *Basic Principles of Wound Healing*. Wound Care Canada. 9: 4:12.
9. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. *Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?*. Springer:Archives of Dermatological Research. 2007; (298): 413–420.
10. Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. *The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing*. Journal compilation European Academy of Dermatology and Venereology. 2010; 24: 373–378.
11. Ono S, Imai R, Ida Y, Shibata D, Komiya T, Matsumura H. *Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns*. Elsevier. 2014: 1-5.
12. Boateng J, Catanzano O. *Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing – A Review*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015; 104: 3653-3680.

13. Italiano J, Hartwig J. *MEGAKARYOCYTE AND PLATELET STRUCTURE*. En: Elsevier. Hematology: basic principles and practice. Philadelphia. Elsevier; 2009. p. 1771 – 1779.
14. Alves R, Grimalt R. *A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification*. Skin Appendage Disorders. 2018; 4: 18-24.
15. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann JJHL, Overdeest EP, Box HAM, van Zundert A. *Platelet rich plasma and platelet gel: A review*. J Extra Corpor Techn. 2006; 38: 174-187.
16. Han G, Ceilley R. *Chronic Wound Healing: a Review of Current Management and Treatments*. Adv Ther. 2017; 34: 599-610.
17. Shahid M, Kundra R. *Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders*. EOR. 2017; 2: 28-34.
18. Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. *Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series*. Journal of Biomedical Science. 2017; 24(16): 2-10.
19. Lynch S, Nixon J, Colvin R, Antoniades H. *Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 7696-7700.
20. Guan S, Fan J, Han A, Chen M, Woodley DT, Li W. *Non-Compensating Roles between Nck α and Nck β in PDGF-BB Signaling to Promote Human Dermal Fibroblast Migration*. Journal of Investigative Dermatology. 2009; 129: 1909-1920.
21. Park SA, Raghunathan VK, Shah NM, Teixeira L, Motta MJ, et al. *PDGF-BB Does Not Accelerate Healing in Diabetic Mice with Splinted Skin Wounds*. PLoS ONE. 2004; 9(8): 1-8.
22. Oefner C, Darcy AD, Winkler FK, Eggimann B, Hosnag M. Crystal Structure of Human Platelet-Derived Growth Factor BB [Internet]: RCSB Protein Data Bank; 31 Enero 1992 [citado Marzo 28 2018]. Disponible en: <http://www.rcsb.org/structure/1PDG>.
23. Heldin CH, Westermark B. *Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor*. Physiological Reviews. 1999; 29(4): 1286-1316.

24. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. *Biology of Platelet-Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease. Genetics in clinical practice*. 2006; 81(9): 1241-1257.
25. Reuterdahi C, Sundberg C, Rubin K, Funa K, Gerdin B. *Tissue Localization of β Receptor of Platelet- derived Growth Factor and Platelet- derived Growth Factor B Chain during Wound Repair in Humans*. J. Clin. Invest. 1993; 91: 2065-2075.
26. Boateng J, Catanzano O. *Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing – A Review*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015; 104: 3653-3680.
27. Tognetti L, Martinelli C, Berti S, Hercogova J, Lotti T, Leoncini F, Moretti S. *Bacterial skin and soft tissue infections: review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment. A collaboration between dermatologists and infectologists*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2012; 1-11.
28. Croisier F, Jérôme C. *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. Elsevier. 2013; 49: 780-792.
29. Bhattarai C, Gunn J, Zhang M. *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. Elsevier. 2010; 62: 83-99.
30. Pastor de Abram A, Higuera I. *Generalidades*. En: Fondo Editorial de la PUCP. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 25 – 71.
31. Arguelles W, Heras A, Acosta N, Galed G, Gallardo A, Miralles B, Peniche C, San Román J. *Caracterización de Quitina y Quitosano*. En: Fondo Editorial de la PUCP. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 155 – 206.
32. Valenzuela CL. *Obtención de Quitosano de Pota (*Dosidicus Gigas*) empleando altas dosis de Radiación Gamma* [tesis]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
33. Fuentes LB, Pastor de Abram A. *Preparación, caracterización y evaluación de películas de Quitosano proveniente de calamar gigante “*Dosidicus gigas*” para uso médico*. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2009; 75: 1-11.

34. Campana Filho PS. *Modificación química y caracterización de biopolímeros*. Curso teórico dictado en la Universidad Nacional de Ingeniería; 2016. Noviembre 28 – Diciembre 07; Lima, Perú.
35. Bhattarai C, Gunn J, Zhang M. *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. Elsevier. 2010; 62: 83-99.
36. Croisier F, Jérôme C. *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. Elsevier. 2013; 49: 780-792.
37. Nakamatsu J, Rodríguez N. *Química de la Quitina y el Quitosano*. En: Fondo Editorial de la PUCP. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 74 – 102.
38. Pérez-Díaz M, Alvarado-Gomez E, Magaña-Aquino M, Sánchez-Sánchez R, Velasquillo C, Gonzalez C, Ganem-Rodero A, Martínez-Castañón G, Zavala-Alonso N, Martinez-Gutierrez F. *Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts*. Elsevier. 2016; 60: 317-323.
39. Peniche C, Aguilar MR, Aranaz I, Mayorga A, Paños I, San Román J, Tapia C. *Aplicaciones en ciencias de la vida*. En: Fondo Editorial de la PUCP. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 269 – 312.
40. Ministerio de la Producción. *Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola*. Lima-Perú; 2014.
41. Ezquerro-Brauer JM, Uriarte-Montoya MH, Arias-Moscoso JL, Plascencia-Jatomea M. *By-Products From Jumbo Squid (Dosidicus gigas): A New Source of Collagen Bio-Plasticizer?*. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos/Universidad de Sonora – México.
42. Ibáñez CM, Argüelles J, Yamashiro C, Sepúlveda RD, Pardo-Gandarillas MC, Friedemann K. *Population dynamics of squids Dosidicus gigas (Oegopsida: Ommastrephidae) and Doryteuthis gahi (Myopsida: Loliginidae) in northern Peru*. Elsevier. 2015: 1-8.
43. Perú21 [Internet]. Frente Nacional de Pesca: Barcos chinos pescan sin licencia en mar peruano; 9 jun 2014 [consulta 4 feb 2016]. Disponible en:

<http://peru21.pe/economia/frente-nacional-pesca-barcos-chinos-pescan-sin-licencia-mar-peruano-2186890>

44. ElPeruano [Internet]. El Perú se afianza como primer abastecedor de harina de pescado; 13 feb 2016 [consulta 4 feb 2016]. Disponible en: <http://www.elperuano.com.pe/noticia-el-peru-se-afianza-como-primer-abastecedor-harina-pescado-38223.aspx>
45. Chaussard G, Domard A. *New Aspects of Extraction of Chitin from Squid Pens. Biomacromolecules*. 2004; 5: 559 – 564.
46. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. Elsevier. 2004; 57: 19-34.
47. Croisier F, Jérôme C. *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. Elsevier. 2013; 49: 780-792.
48. Baldino L, Concilio S, Cardea S, De Marco I, Reverchon E. *Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel drying by SC-CO₂ processing*. Elsevier. 2015; 103: 70-76.
49. Inskeep B. *The Development and Characterization of Tannic Acid Cross-linked Collagen Scaffolds for the Prevention of Breast Cancer Recurrence in Lumpectomy Patients*. 2014. All Dissertations. Paper 1459.
50. Nimni ME. *Ectopic calcification of Glutaraldehyde crosslinked collagen bioprosthesis*. University of Southern California School of Medicine and Orthopaedic Hospital, Los Angeles, CA, USA. Abstracts from the Calcified Tissues Workshop. 406-407.
51. Campana Filho PS. *Modificación química y caracterización de biopolímeros*. Curso teórico dictado en la Universidad Nacional de Ingeniería; 2016. Noviembre 28 – Diciembre 07; Lima, Perú.
52. Kasaai MR. *Calculation of Mark-Houwink-Sakurata (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data*. Carbohydrate Polymers. 2007; 68: 477 – 488.

53. Shiga Y, Kubota G, Orita S, et al. *Freeze-Dried Human Platelet-Rich Plasma Retains Activation and Growth Factor Expression after an Eight-Week Preservation Period*. Asian Spine Journal. 2017; 11(3): 329-336.
54. Seabaugh KA, Thoresen M, Giguère S. *Extracorporeal Shockwave Therapy Increases Growth Factor Release from Equine Platelet-Rich Plasma In Vitro*. Frontiers in Veterinary Science. 2017; 4: 205.
55. Martins AA, Gomes Marcelino A, Moraga SE, Cambraia I, Andrade MH. *Performance of PRP Associated with Porous Chitosan as a Composite Scaffold for Regenerative Medicine*. Hindawi. 2015: 1 – 12.
56. Ağçam E, Akyıldız A, DüNDAR B. *Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices, In Fruit Juices*. En: Academic Press. *Fruit Juices - Extraction, Composition, Quality and Analysis*. Editado por: Gaurav Rajauria and Brijesh K. Tiwari. San Diego: Academic Press; 2018. p. 309 – 339.
57. Debnath T. et al. *Proliferation and Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells Grown on Chitosan Hydrogel*. PLoS ONE. 2015; 10(3): 1 – 14.
58. Beppu MM, Vieira RS, Aimoli CG, Santana CC. *Crosslinking of Chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption*. Journal of Membrane Science – Elsevier. 2007; 301: 126-130.
59. Monteiro O, Airoldi C. *Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system*. International Journal of Biological Macromolecules. 1999; 26: 119 – 128.
60. Kutlu B, Tigli RS, Akman A. *Platelet-rich plasma-loaded chitosan scaffolds: preparation and growth factor release kinetics*. Society For Biomaterials. 2012; 00B(00): 1 – 7.
61. Nie J et al. *Orientation in multi-layer chitosan hydrogel: morphology, mechanism, and design principle*. Scientific Reports. 2014; 5: 1-6.
62. Chapman P, Reyes C. *Normal Physiological Levels of Human Cytokines Using Bio-Plex® Pro Cytokine Assays*. BIO-RAD Laboratories. Teach note 6029. 2010.
63. Yang HS, Shin J, Bhang SH, Shin JY, Park J, Kim CS, Kim BS. *Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma*. Experimental and Molecular Medicine. 2011; 43(11): 622 – 629.

64. Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. *Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion*. J. Biol. Macromol. 1993; 15: 281 – 285.
65. Tsereteli L, Grafmuller A. *An accurate coarse-grained model for chitosan polysaccharides in aqueous solution*. PLoS ONE. 2017; 12(7): 1 – 31.
66. Goy R, Douglas de Britto O. *A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*. Polímeros: Ciencia e Tecnologia. 2009; 19(3): 241 – 247.

XI. ANEXOS

10.1. Clasificación de úlceras por presión


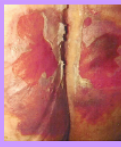
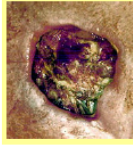




Classifications of Pressure Ulcers	
 <p>Stage I Intact skin with non-blanchable redness of a localized area usually over a bony prominence. Darkly pigmented skin may not have visible blanching; its color may differ from the surrounding area.</p>	 <p>Stage II Partial thickness loss of dermis presenting as a shallow open ulcer with a red pink wound bed, without slough. May also present as an intact or open/ruptured serum-filled blister.</p>
 <p>Stage III Full thickness tissue loss. Subcutaneous fat may be visible but bone, tendon or muscle are not exposed. Slough may be present but does not obscure the depth of tissue loss. May include undermining and tunneling.</p>	 <p>Stage IV Full thickness tissue loss with exposed bone, tendon or muscle. Slough or eschar may be present on some parts of the wound bed. Often include undermining and tunneling.</p>
 <p>Deep Tissue Injury Purple or maroon localized area of discolored intact skin or blood-filled blister due to damage of underlying soft tissue from pressure and/or shear. The area may be preceded by tissue that is painful, firm, mushy, boggy, warmer or cooler as compared to adjacent tissue.</p>	 <p>Unstageable Full thickness tissue loss in which the base of the ulcer is covered by slough (yellow, tan, gray, green or brown) and/or eschar (tan, brown or black) in the wound bed.</p>

Photo copyright NPUAP, 2008. All rights reserved.

This material was prepared by CFMC, the Medicare Quality Improvement Organization for Colorado, under contract with the Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS), an agency of the U.S. Department of Health and Human Services. The contents presented do not necessarily reflect CMS policy. PM-2200-126 CO 2008



10.2. Demostración de la fórmula para determina el GD.

En el punto de equivalencia, donde el potencial es 0 mV:

Equivalentes de NaOH = Equivalente de R-NH₃⁺

Entonces: $\text{Normalidad}_{\text{NaOH}} \left(\frac{\text{Eq}}{\text{L}} \right) \times \text{Volumen}_{\text{NaOH}} (\text{L}) = \text{Equivalentes de R} - \text{NH}_3^+$

Si: $\text{Equivalentes de R} - \text{NH}_3^+ \times \text{PEq}_{\text{NH}_2} \left(\frac{\text{g}}{\text{Eq}} \right) = \text{Gramos de NH}_2$

Finalmente, para un peso de muestra determinado (Mx), se aplica una regla de tres simple:

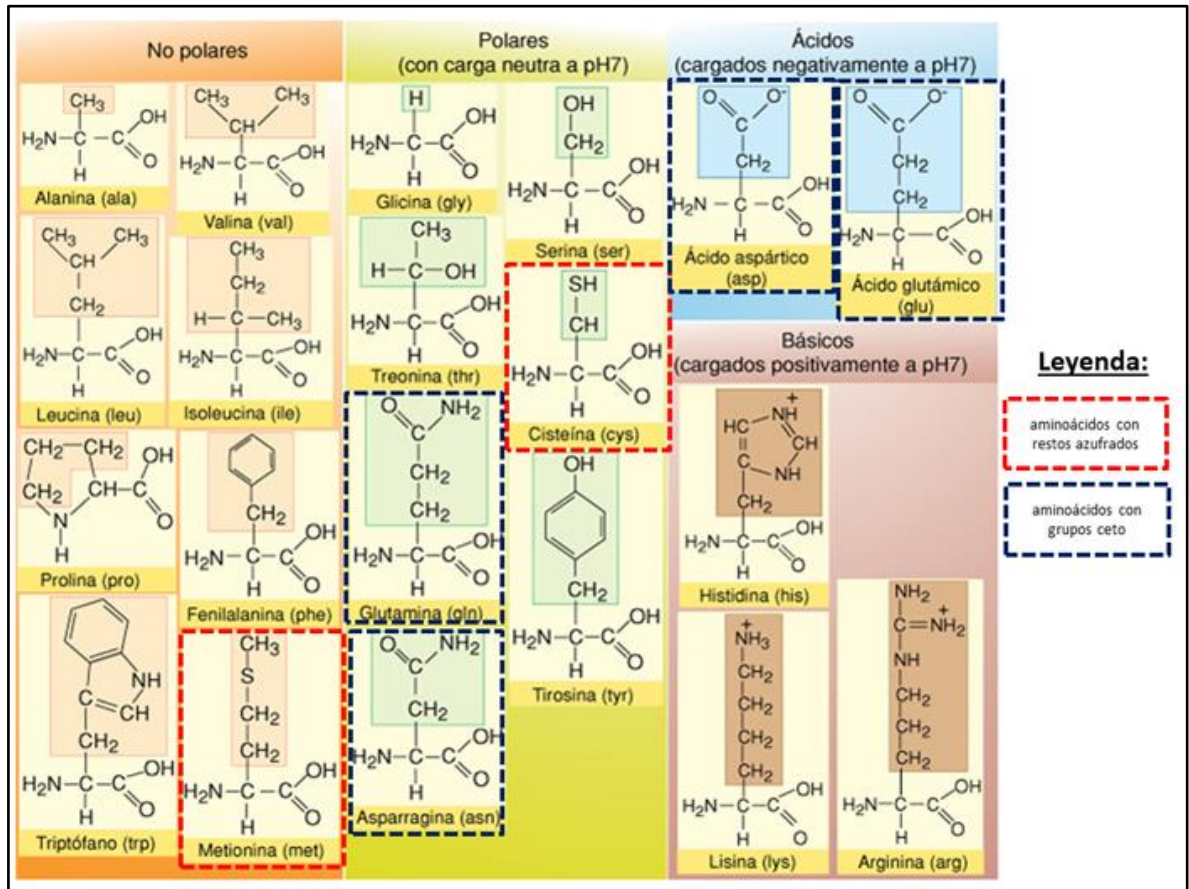
Mx → **100%**

Gramos de NH₂ → **%DA**

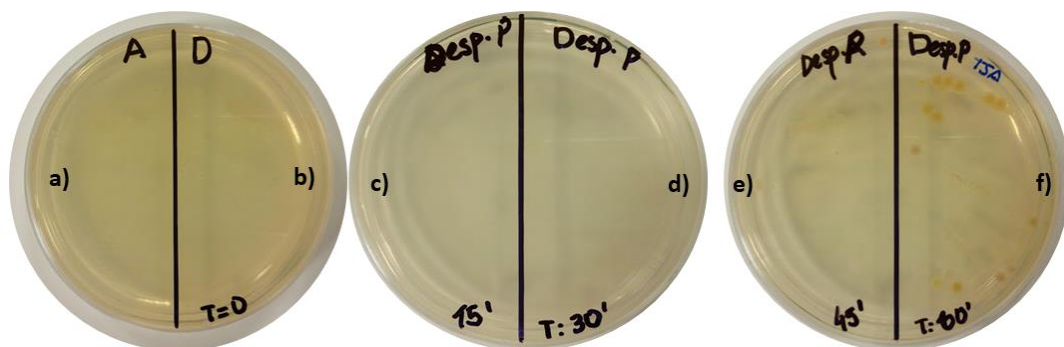
Por lo tanto:

$$\%DA = \frac{100 \times \text{Normalidad}_{\text{NaOH}} \times V \times \text{PEq}_{\text{NH}_2}}{\text{Peso de la muestra}}$$

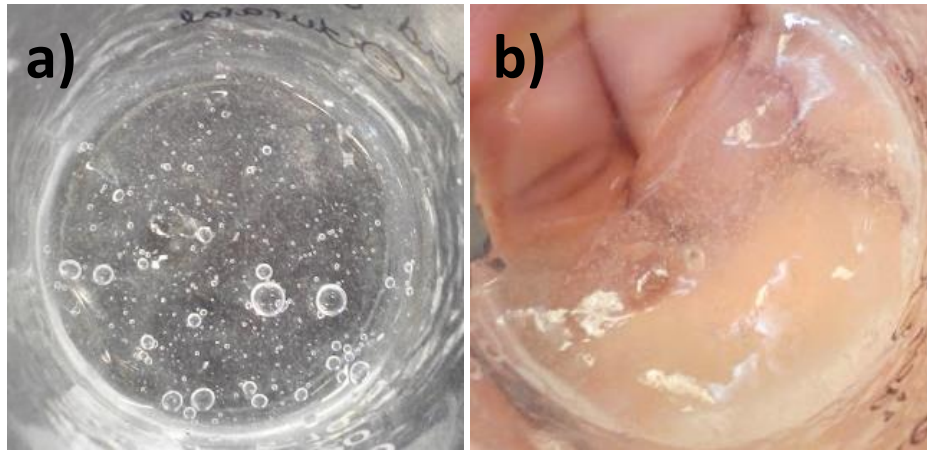
10.3. Clasificación de aminoácidos según su carga electrónica



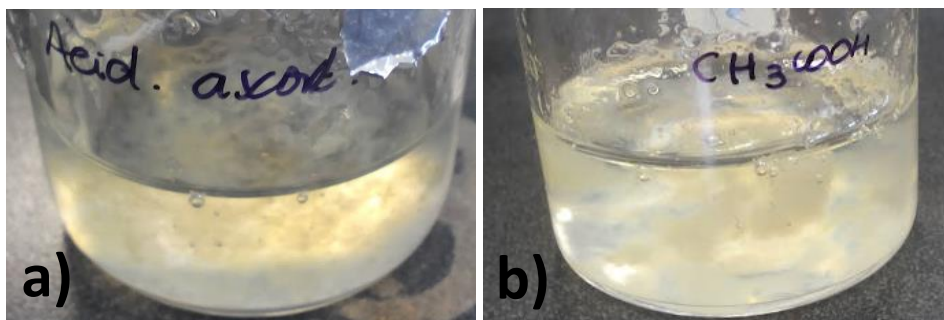
10.4. Pruebas microbiológicas en TSA: a) Antes del shock térmico (ST) b) inmediatamente después del shock térmico (ST: 88 °C por 7 minutos) c) 15 minutos después del ST d) 30 minutos después del ST e) 45 minutos después del ST f) 60 minutos después del ST.



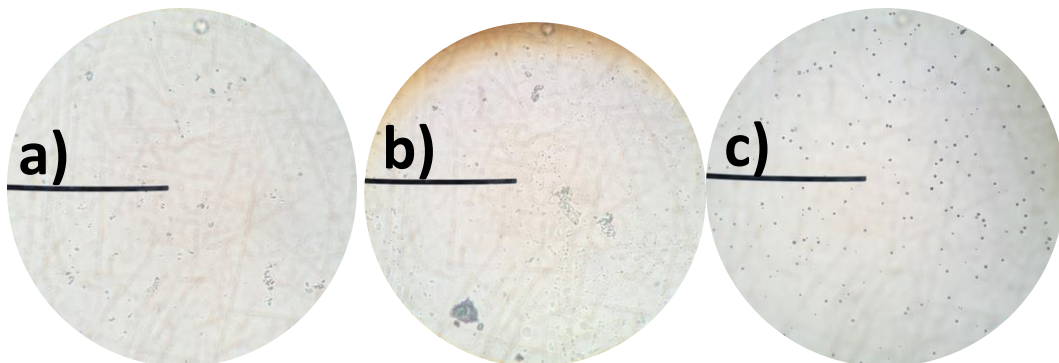
10.5. Prueba del solvente: a) β -quitosano 1.5% en ácido ascórbico 1% b) β -quitosano 1.5% en ácido acético 1%.



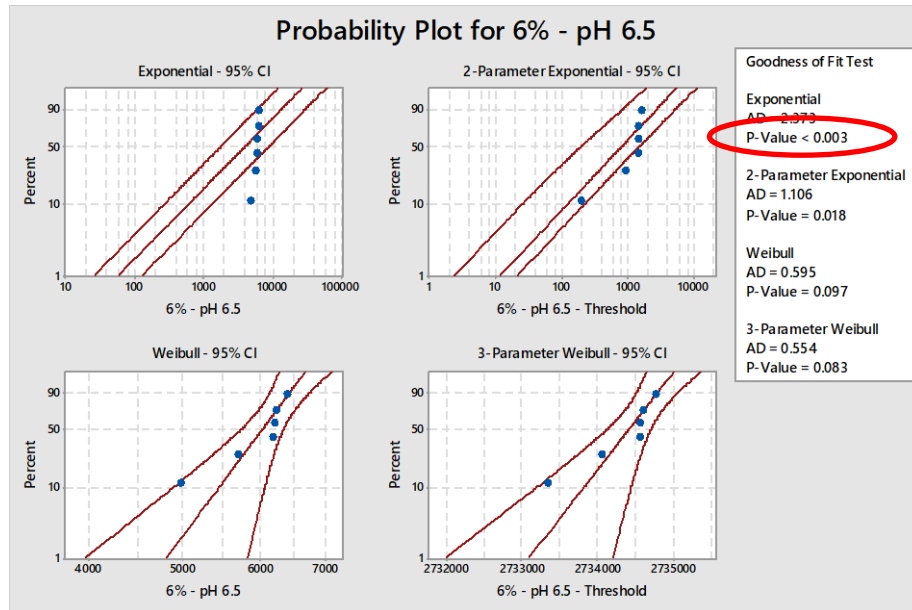
10.6. Producto elaborado: a) Hidrogel A: β -quitosano 1.5% en ácido ascórbico 1% + Glutaraldehído 0.025M b) Hidrogel B: β -quitosano 1.5% en ácido acético 1% + Glutaraldehído 0.025M.



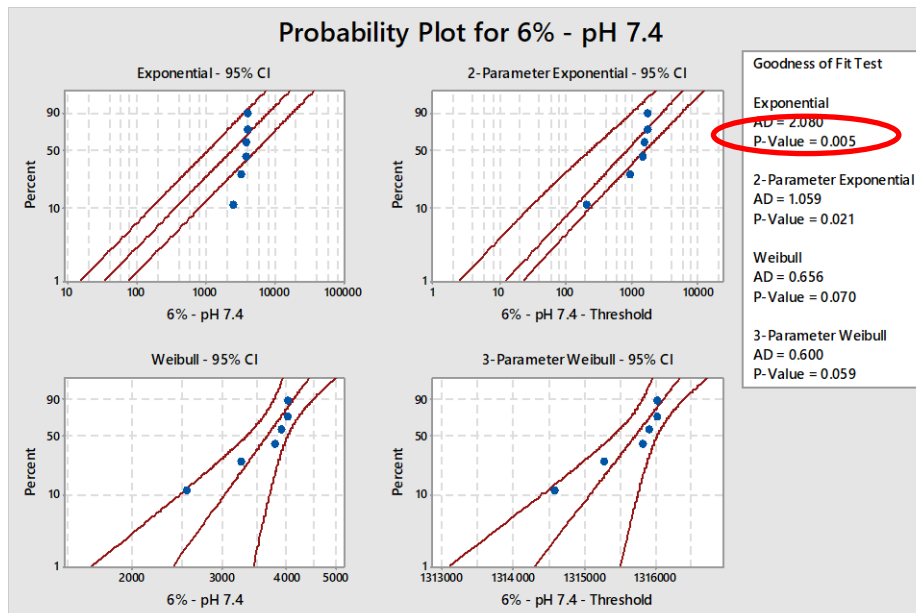
10.7. Prueba del solvente: a) vista al microscopio (40X) del hidrogel A b) vista al microscopio (40X) del hidrogel B. c) vista al microscopio (40X) del hidrogel A a 3 días de ser elaborado.



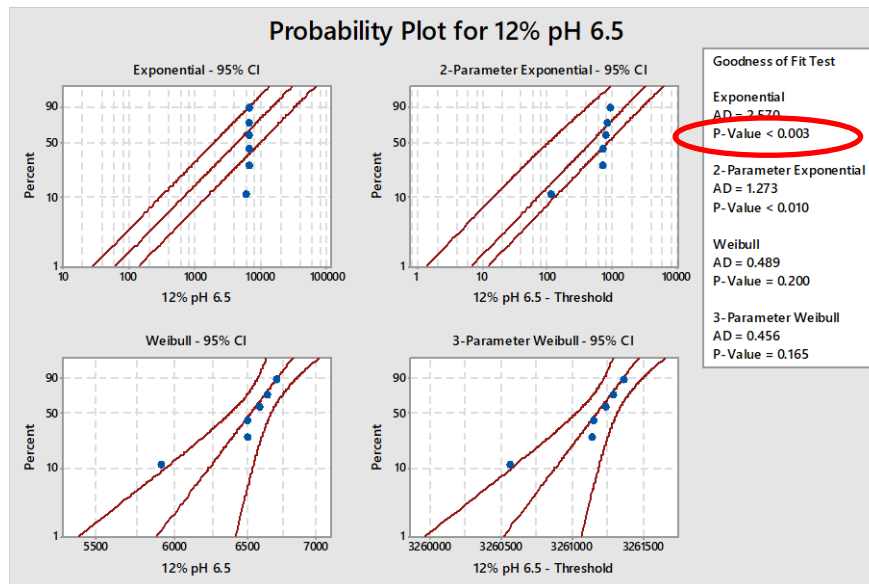
10.8. Identificación de la distribución que siguen los valores de las concentraciones de PDGF-BB de un hidrogel con 6% de LP y expuesto a pH 6.5 ($p < 0.003$).



10.9. Identificación de la distribución que siguen los valores de las concentraciones de PDGF-BB de un hidrogel con 6% de LP y expuesto a pH 7.4 ($p = 0.005$).



10.10. Identificación de la distribución que siguen los valores de las concentraciones de PDGF-BB de un hidrogel con 12% de LP y expuesto a pH 6.5 ($p < 0.003$).



10.11. Identificación de la distribución que siguen los valores de las concentraciones de PDGF-BB de un hidrogel con 12% de LP y expuesto a pH 7.4 ($p < 0.003$).

