

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida con orientación en
Biomedicina y Bionanotecnología**

**Desarrollo de hidrogel con actividad antioxidante y
neutralizante de TGF-beta con potencial para regeneración
tisular**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Lesly Stephanie Gomez Aparicio

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Lesly Stephanie Gomez Aparicio
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Directora de tesis

Miembros del comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Santiago Camacho López

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Lesly Stephanie Gomez Aparicio** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Desarrollo de hidrogeles con actividad antioxidante y neutralizante de TGF-beta con potencial para regeneración tisular

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Directora de tesis

Actualmente, se ha asociado la reparación incorrecta de un tejido lesionado, por una herida, por ejemplo, a una sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), una citocina que participa ampliamente en el proceso de reparación tisular. Por lo que desarrollar estrategias para modular la expresión de esta citocina es una alternativa para la ingeniería de tejidos. Los compuestos antioxidantes han demostrado mejorar los procesos de reparación tisular, además de promover el avance de la fase inflamatoria a la de regeneración, en la reparación de un tejido. En el presente trabajo se desarrollaron hidrogeles de alginato de calcio-PEGMA (Alg), suplementados con diferentes concentraciones de extracto acuoso de *M. oleifera* (MO) y N-acetilcisteína (NAC), los cuales tienen capacidad antioxidante. Al suplementar los hidrogeles de Alg con MO y NAC se incrementó la actividad antioxidante respecto a la inhibición del radical ABTS^{•+} en un 53.43 ± 12 y $99 \pm 0.16\%$, respectivamente. En términos de biocompatibilidad, los hidrogeles de Alg-NAC y Alg-MO-NAC aumentaron al doble la viabilidad celular en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112sk y de ratón, L929, después de 24 h de cultivo. Además, agregar 0.1% m/v de MO a los hidrogeles de Alg-NAC incrementó la hemocompatibilidad de los hidrogeles al disminuir el porcentaje de lisis de eritrocitos de 4.56 ± 1.79 a $1.64 \pm 0.12\%$. Con respecto a su capacidad hemostática, es decir su capacidad para formar un coágulo y ayudar a evitar una hemorragia, los hidrogeles Alg-MO-NAC coagularon más sangre que los de Alg y Alg-MO durante una hora, en estudios *in vitro*. Los hidrogeles Alg-NAC y Alg-MO-NAC demostraron, *in vitro*, ser capaces de neutralizar TGF- β hasta en un 47.29 ± 19.63 y $25.21 \pm 8.96\%$, respectivamente, sin afectar la viabilidad celular. Nuestros resultados prueban que el haber suplementado los hidrogeles de alginato con NAC y *M. oleifera* favoreció la capacidad antioxidante, neutralizante de TGF- β y una mejora en sus propiedades hemostáticas. Con lo que se demuestra el potencial de los hidrogeles sintetizados en este trabajo para el tratamiento de heridas y regeneración de tejidos.

Palabras clave: Hidrogeles, capacidad antioxidante, TGF- β , regeneración, tejido.

Abstract of the thesis presented by **Lesly Stephanie Gomez Aparicio** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Development of hydrogels with antioxidant and neutralizing activity of TGF-beta with potential for tissue regeneration

Abstract approved by:

Dr. Ana Bertha Castro Ceseña
Thesis Director

Currently, the incorrect repair of an injured tissue, by a wound, has been associated, for example, an overexpression of transforming growth factor beta (TGF- β), a cytokine that participates extensively in the tissue repair process. Therefore, developing strategies to modulate the expression of this cytokine is an alternative for tissue engineering. Antioxidant compounds have been shown to improve tissue repair processes, in addition to promoting the advancement from the inflammatory phase to the regeneration phase, in tissue repair. In the present work, calcium alginate-PEGMA hydrogels (Alg) were developed, supplemented with different concentrations of aqueous extract of *M. oleifera* (MO) and N-acetylcysteine (NAC), which have antioxidant capacity. By supplementing the Alg hydrogels with MO and NAC, the antioxidant activity with respect to the inhibition of the ABTS • + radical increased by 53.43 ± 12 and $99 \pm 0.16\%$, respectively. In terms of biocompatibility, Alg-NAC and Alg-MO-NAC hydrogels doubled cell viability in human CCD-1112sk and mouse, L929 dermal fibroblasts after 24 h of culture. Furthermore, adding 0.1% m / v OM to the Alg-NAC hydrogels increased the hemocompatibility of the hydrogels by decreasing the percentage of erythrocyte lysis from 4.56 ± 1.79 to $1.64 \pm 0.12\%$. Regarding their hemostatic capacity, that is, their ability to form a clot and help prevent bleeding, Alg-MO-NAC hydrogels clotted more blood than Alg and Alg-MO for one hour, in in vitro studies. The hydrogels Alg-NAC and Alg-MO-NAC demonstrated, in vitro, to be capable of neutralizing TGF- β up to 47.29 ± 19.63 and $25.21 \pm 8.96\%$, respectively, without affecting cell viability. Our results prove that having supplemented the alginate hydrogels with NAC and *M. oleifera* favored the antioxidant and neutralizing capacity of TGF- β and an improvement in its hemostatic properties. With which the potential of the hydrogels synthesized in this work for the treatment of wounds and tissue regeneration is demonstrated.

Keywords: Hydrogels, antioxidant capacity, TGF- β , regeneration, tissue.

Dedicatoria

A mi madre te amo y adoro...

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme llevar a cabo mis estudios de maestría y realizar el presente proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con la cual pude concluir exitosamente la maestría.

A la Dirección de Estudios de Posgrado, por darme la oportunidad de inscribirme al posgrado en Ciencias de la Vida.

Al Departamento de Innovación Biomedica por haberme brindado un espacio, un ambiente de compañerismo y herramientas para llevar a cabo mis experimentos.

A mi asesora a la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, por aceptarme como su alumna durante estos años y brindarme su apoyo, dirección y comprensión en momentos difíciles durante estos años.

A los miembros del comité de este proyecto, la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia por su apoyo y capacitación en el área de cultivo celular, el Dr. Alexei F. Licea Navarro y Dr. Santiago Camacho López por haber aceptado ser parte del comité de este proyecto, por sus aportaciones, críticas y correcciones durante el avance de este proyecto.

A mi madre por su apoyo incondicional y estar siempre para apoyarme.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Reparación tisular.....	2
1.1.2 Fases de la reparación tisular.....	3
1.1.3 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).....	5
1.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	7
1.1.5 Biomateriales.....	9
1.1.6 Alginato de calcio y su aplicación en la reparación tisular.....	9
1.1.7 N-acetilcisteína (NAC).....	11
1.1.8 <i>Moringa oleifera</i>	12
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos.....	15
1.4.1 Objetivo general.....	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Síntesis de hidrogeles.....	17
2.1.1 Preparación del extracto acuoso de <i>M. oleifera</i>	17
2.1.2 Elaboración de los hidrogeles.....	17

2.2	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles.....	18
2.2.1	Absorción de agua o hinchamiento.....	18
2.2.2	Evaluación de la capacidad hemostática.....	19
2.3	Evaluación <i>in vitro</i> de las propiedades biológicas de los hidrogeles.....	19
2.3.1	Evaluación del efecto neutralizante del TGF- β de los hidrogeles.....	19
2.3.2	Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogeles.....	20
2.3.3	Evaluación de la actividad anti-inflamatoria.....	21
2.4	Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad de los hidrogeles.....	21
2.4.1	Prueba de hemocompatibilidad.....	21
2.4.2	Ensayo de viabilidad y proliferación celular.....	22
2.5	Análisis estadístico de los datos.....	23
	Capítulo 3. Resultados.....	24
3.1	Síntesis de los de hidrogeles.....	24
3.1.1	Evaluación de la citotoxicidad y potencial neutralizante TGF- β de <i>M. oleifera</i> y NAC.....	24
3.1.2	Preparación de hidrogeles de alginato de calcio suplementados con <i>M. oleifera</i> y NAC.....	26
3.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad de los hidrogeles.....	27
3.2.1	Viabilidad celular en fibroblastos CCD-1112Sk.....	27
3.2.2	Viabilidad en células HEK-Blue™ TGF- β	28
3.2.3	Prueba de hemocompatibilidad.....	29
3.3	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles.....	30
3.3.1	Absorción de agua o hinchamiento.....	30
3.3.2	Capacidad hemostática.....	31
3.4	Evaluación <i>in vitro</i> de las propiedades biológicas de los hidrogeles.....	32
3.4.1	Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogeles.....	32
3.4.2	Evaluación de la actividad anti-inflamatoria con respecto a la remoción de NO \cdot	33
3.4.3	Evaluación del efecto neutralizante del TGF- β de los hidrogeles.....	34
3.5	Evaluación de la biocompatibilidad en fibroblastos L929.....	35

3.5.1 Pruebas de viabilidad y proliferación celular 35

Capítulo 4. Discusión..... 37

Capítulo 5. Conclusiones..... 44

Literatura citada..... 46

Lista de figuras

Figura	Página
1. Representación esquemática de las diferentes etapas de reparación tisular.....	4
2. Cascada de señalización celular del factor de crecimiento transformante (TGF- β) mediante la activación de las proteínas Smad	5
3. TGF- β 1,- β 2 y - β 3 tienen una función central en las fases de reparación tisular.....	6
4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y su función en la reparación tisular.....	8
5. Representación esquemática de la estructura de las zonas de unión de la caja de huevos en geles de alginato de calcio.....	10
6. Rutas para las actividades biológicas de NAC.....	11
7. Clasificación de algunos polifenoles y ejemplos.....	13
8. Proceso de síntesis de los hidrogeles de alginato plastificados con PEGMA y entrecruzados con CaCl_2 adicionados con MO (<i>Moringa oleifera</i>) y NAC (N-acetilcisteína)	18
9. Viabilidad de las células HEK-Blue TM TGF- β tratadas con soluciones de 0.5, 1 y 2% m/v de <i>M. oleifera</i> con el método colorimétrico MTT	24
10. Viabilidad de las células HEK-Blue TM TGF- β tratadas con soluciones de 0.01 y 0.1% m/v de <i>M. oleifera</i> y 20 y 40 mM de NAC con el método colorimétrico MTT.....	25
11. a) Citotoxicidad de las soluciones de 0.01, 0.1 y 0.5 % m/v de <i>M. oleifera</i> con 40 mM de NAC usando MTT b) Efecto neutralizante de TGF- β usando el reactivo QUANTI-Blue TM	26
12. Fotografías de la vista superior de los hidrogeles obtenidos	27
13. Viabilidad de los fibroblastos CCD-1112sk en contacto directo con los hidrogeles.....	28
14. Biocompatibilidad de los hidrogeles en células HEK-Blue TM TGF- β	29
15. Evaluación <i>in vitro</i> de la hemocompatibilidad de los hidrogeles, representada con el porcentaje de hemólisis.....	30
16. Capacidad de absorción de agua de los hidrogeles de alginato suplementados con <i>M. oleifera</i> y NAC.....	31
17. Capacidad hemolítica de los hidrogeles (a) perfil de coagulación de la sangre a través del tiempo (b) comparación de la capacidad hemostática a los 15 min entre los hidrogeles (c) fotografías representativas de la capacidad de coagulación.....	32

18.	Actividad antioxidante expresada en porcentaje de inhibición de ABTS ^{•+}	33
19.	Actividad anti-inflamatoria relacionada al porcentaje de remoción del radical oxido nítrico (NO [•]).....	34
20.	Efecto neutralizante de TGF- β de los hidrogeles en a) células HEK-Blue TM TGF- β estimuladas y b) células HEK-Blue TM TGF- β sin estimular.....	35
21.	Biocompatibilidad de los hidrogeles en fibroblastos L929 a) viabilidad celular y b) proliferación celular durante 10 días.....	36

Capítulo 1. Introducción

La medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos han impulsado el desarrollo de materiales bioactivos, biocompatibles, biodegradables y bioabsorbibles para la regeneración de tejidos dañados. El empleo de biomateriales con estructuras tridimensionales (3D) implantados en el sitio del tejido lesionado, proporciona un soporte estructural, tipo andamio, para que las células se unan, proliferen y formen su propia matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (Wichterle y Lim, 1960). En términos de estos requisitos, los hidrogeles son de gran atractivo debido a su biocompatibilidad, sus similitudes estructurales con la ECM y su capacidad para funcionar como andamio para la proliferación y supervivencia celular. Se han desarrollado hidrogeles con diferentes propiedades químicas y físicas a partir de una amplia variedad de compuestos químicos y utilizando diferentes técnicas de síntesis. Un diseño meticuloso de los hidrogeles permite que sus propiedades tales como la unión celular, la respuesta molecular, la integridad estructural, la biodegradabilidad, la biocompatibilidad y el transporte de compuestos bioactivos, satisfaga las demandas celulares necesarias para la construcción y regeneración del tejido (Lowman y Peppas, 1999; Li, J. 2004). La reparación tisular es un proceso fisiológico que implica una interacción compleja entre las diferentes fases que lo conforman (Werner y Grose, 2003). El hecho de que este proceso no ocurra correctamente tiene un impacto clínico significativo en la funcionalidad y calidad de vida de las personas que lo padecen. Diferentes factores pueden afectar el proceso de reparación tisular, como es una sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la cual está ligada a una reparación deficiente del tejido y la formación excesiva de cicatrices (Hisatoshi et al., 2005). De igual manera las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan diferentes funciones durante la reparación de heridas. Sin embargo, una producción excesiva de ROS conduce a un estrés oxidativo el cual puede deteriorar el proceso de reparación por una liberación de compuestos pro-inflamatorios (Yang et al., 2012; Dunnill et al., 2017). Ambos casos afectan el proceso de reparación, lo que compromete la funcionalidad del tejido reparado. La *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) es una planta que ha demostrado ciertas propiedades biológicas como actividad antioxidante, por lo que es capaz de neutralizar radicales libres como ROS (Parwani et al., 2016). Mientras que la N-acetilcisteína (NAC) un compuesto sintético, el cual es un potente antioxidante que también ha demostrado un potencial para inhibir las respuestas profibróticas TGF- β (Sugiura et al., 2009). En este trabajo se sintetizaron, caracterizaron y evaluaron hidrogeles como biomateriales para un posible tratamiento para la regeneración de heridas de la piel. Se utilizó como matriz polimérica el alginato de calcio, un polímero natural biocompatible, el cual fue plastificado con un polímero sintético para mejorar su estabilidad estructural. Los hidrogeles fueron suplementados con compuestos antioxidantes como la N-acetilcisteína y un extracto acuoso de *M. oleifera*. Los biomateriales

obtenidos se evaluaron con respecto a sus características fisicoquímicas, biocompatibilidad, actividad antioxidante y antiinflamatoria y neutralizante de TGF- β .

1.1 Antecedentes

1.1.1 Reparación tisular

Una herida o lesión tisular es causada por la interrupción en la continuidad y función anatómica del revestimiento epitelial de la piel. Esta puede deberse a una variedad de traumatismos tanto mecánicos, quirúrgicos o térmicos. Cuando la piel sufre algún daño, el cuerpo comienza el proceso de reparación tisular (RT). La RT se activa al inicio de una lesión y forma un conjunto orquestado y dinámico de interacciones moleculares y celulares, que tienen como objetivo el remplazo de las células dañadas y la remodelación de la ECM con el fin de reestablecer la integridad del tejido (Atala et al., 2010; Fernandez-Colino, 2019).

La RT incluye dos grandes fenómenos: (1) la regeneración, es el reemplazo total de un tejido desaparecido o dañado por células de la misma estirpe; (2) la cicatrización, que consiste en la sustitución del tejido dañado por tejido conjuntivo, el cual tiene como producto final una cicatriz. Durante la cicatrización la restitución del tejido conectivo dañado se efectúa mediante la proliferación de fibroblastos, por lo que el espacio dañado se sustituye con tejido fibrilar. En la mayor parte de los casos, tanto la regeneración como la cicatrización contribuyen a la reparación tisular, y es el equilibrio entre la regeneración y la formación de cicatrices lo que determina la capacidad de un tejido u órgano para funcionar después de una lesión (Yannas, 2009; Atala et al., 2010). En su mayoría, las lesiones en la piel se resuelven con la formación de tejido cicatricial. El tejido cicatricial restaura la integridad estructural y la homeostasis, sin embargo, es un reemplazo disfuncional (Gilbert et al., 2016). Una de las diferencias entre el tejido cicatricial y el tejido normal es la alineación de la ECM. En el tejido cicatricial hay una mayor densidad de colágeno, fibras más gruesas y menor resistencia a la tracción (Whitby y Ferguson, 1991; Ehrlich y Krummel, 1996). Estas diferencias estructurales tienen una función importante en la determinación de la calidad, integridad y estabilidad de la reparación y funcionalidad del tejido.

1.1.2 Fases de la reparación tisular

El proceso de RT involucra principalmente tres fases: hemostasia e inflamación, la formación de tejidos (proliferación) y la remodelación (Fig. 1) (Howes et al., 1929). Inmediatamente después de la lesión, la hemostasia tiene lugar en la herida con el objetivo principal de prevenir el sangrado de los vasos sanguíneos dañados. A medida que la sangre fluye hacia el sitio de la lesión, los componentes sanguíneos y las plaquetas entran en contacto con el colágeno expuesto y otros componentes de la ECM. Este contacto desencadena la liberación de factores de coagulación y la formación de un coágulo sanguíneo, compuesto de fibronectina, fibrina, vitronectina y trombospondina (Lawrence 1998; Velnar et al., 2009). Este coágulo proporciona una cobertura temporal a la herida que detiene la hemorragia y la protege de las bacterias (Mehendale y Martin 2001; Singer y Clark, 1999). Durante la formación del coágulo las plaquetas se agregan y liberan factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF) (Martin y Parkhurst 2004; Falanga 2005). Estos y otros factores de crecimiento, cuya activación también depende de diferentes parámetros dentro del tejido lesionado, tienen diferentes funciones tanto en el reclutamiento celular como en la formación de ECM (Mehendale y Martin 2001). Un equilibrio dinámico entre las células endoteliales, los trombocitos y la fibrinólisis regula la fase de hemostasia y determina la cantidad de fibrina depositada en el sitio de la herida para el progreso del proceso de la reparación (Jespersen, 1988; Velnar et al., 2009). Durante la fase tardía de la formación del coágulo comienza la respuesta inflamatoria temprana que activa la cascada del complemento e inicia eventos moleculares, lleva a la infiltración del sitio de la herida por neutrófilos y macrófagos, cuya función principal es prevenir la infección por bacterias (Broughton et al., 2006). Los neutrófilos y macrófagos migran al sitio de la herida por diversos agentes quimioattractivos, incluido el TGF- β , PDGF, la proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) componentes del complemento y péptidos de formilmetionilo producidos por bacterias y productos plaquetarios (Robson et al., 2001; Diegelmann y Evans, 2004). Los neutrófilos fagocitan el material extraño y las bacterias, destruyéndolos, liberando enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dunnill et al., 2017). Poco después de los neutrófilos, los monocitos migran a la herida a través del torrente sanguíneo diferenciándose en macrófagos, los cuales continúan con el proceso de fagocitosis como defensa del sitio lesionado (Snyder et al., 2016). Estas células son fundamentales para las últimas etapas de la respuesta inflamatoria, actuando como células reguladoras y proporcionando un abundante depósito de potentes factores de crecimiento tisular, particularmente el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), así como otros mediadores, que atraen aún más los fibroblastos y células del músculo liso al sitio de la herida (Hart, 2002; Diegelmann y Evans, 2004; Velnar et al., 2009), por lo que los macrófagos son de suma importancia para la transición a la fase proliferativa. La fase de proliferación se caracteriza por la migración de fibroblastos,

su diferenciación a miofibroblastos, la síntesis de colágeno y la angiogénesis, haciendo posible el reabastecimiento de oxígeno y otros nutrientes y formación de tejido de granulación, así como la proliferación de los queratinocitos, que migran desde los bordes de la herida para cerrarla (Falanga, 2005). Los fibroblastos proliferan profusamente y producen las proteínas de la matriz como hialuronano, fibronectina, proteoglicanos y colágeno, constituyendo el tejido de granulación que sustituye a la matriz provisional a base de fibrina (Goldman, 2004; Ramasastry, 2005). Como la fase final, la remodelación es responsable del desarrollo del nuevo epitelio y la formación final del tejido reparado. La remodelación está controlada por un delicado equilibrio entre la degradación y la síntesis de la ECM (Falanga, 2004). Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), producidas por neutrófilos, macrófagos y fibroblastos en la herida, son responsables de la degradación del colágeno. El depósito inicial de las fibras de colágeno es altamente desorganizado, por lo que su organización se logra durante la fase de remodelación (Velnar et al., 2009). A medida que la herida se repara, la apoptosis reduce aún más la densidad de fibroblastos y macrófagos en el sitio lesionado (Greenhalgh, 1998). El resultado final del proceso de RT generalmente es una cicatriz completamente remodelada con un número reducido de células y vasos sanguíneos y una alta resistencia a la tracción, por lo que fuerza original del tejido no se recupera (Velnar et al., 2009).

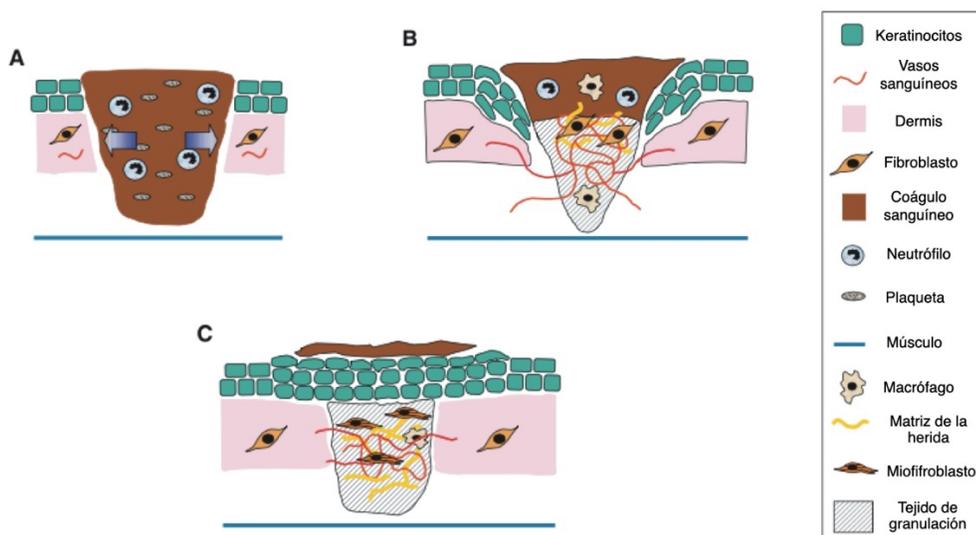


Fig 1. Representación esquemática de las diferentes etapas de reparación tisular. (A) el área herida se protege con la formación de coágulo de sanguíneo, los neutrófilos invaden el sitio de la herida seguidos por los macrófagos; (B) los macrófagos abundan en el tejido de la herida, las células endoteliales y los fibroblastos migran y proliferan en el sitio de la herida para formar nuevos vasos sanguíneos y depositar la nueva matriz extracelular formando el tejido de granulación. Los queratinocitos proliferan en el borde de la herida y migran hacia la dermis lesionada; (C) la herida está completamente llena de tejido de granulación, los fibroblastos diferenciados en miofibroblastos dan lugar a la contracción de la herida y al depósito de colágeno. Modificado de Werner y Grose, 2003.

1.1.3 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

Durante estas fases de la RT la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), una familia de citocinas desempeña diferentes funciones en los que se incluyen: la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la invasión y la quimiotaxis de tejido celular epitelial, fibroblástico e inmune (Diegelmann y Evans, 2004; Gilbert et al., 2016). Sus efectos biológicos están mediados por complejos receptores heteroméricos en la membrana celular, que constan de un receptor de tipo I y uno de tipo II, los cuales son serina-treonina cinasas (Wakefield y Roberts, 2002). Los TGF- β activos se unen con alta afinidad a un receptor de tipo III no señalizador que funciona presentándolo al receptor de tipo II (Roberts, 1998). El receptor de tipo II de TGF- β recluta y fosforila al receptor de tipo I. Este último posteriormente se une y fosforila a Smad2 y Smad3. El complejo Smad2/Smad3 fosforilados se unen a Smad4 y se trasladan al núcleo donde se unen a otros factores de transcripción que confieren especificidad, lo que lleva a la activación de genes (Wakefield y Roberts, 2002).

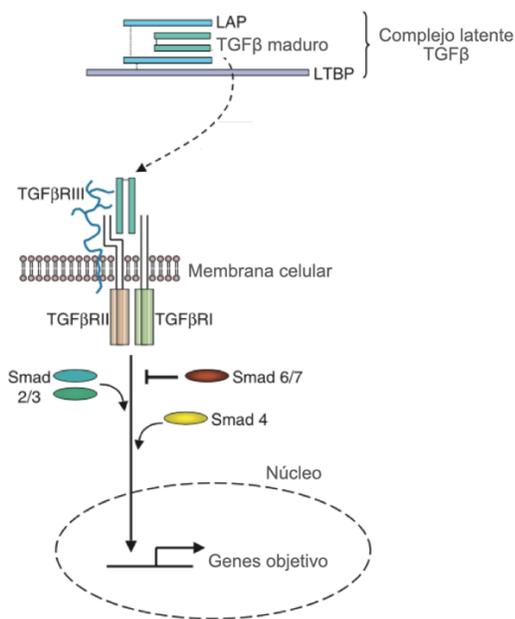


Fig 2. Cascada de señalización celular del factor de crecimiento transformante (TGF- β) mediante la activación de las proteínas Smad. El TGF- β se produce primero como un precursor inactivo que se une a la proteína asociada de latencia (LAP) este se une covalentemente a la proteína de unión de TGF- β latente (LTBP) y se une a un receptor de tipo III que lo presenta a los receptores de transducción de señales (tipo II y tipo I). Tras la unión del ligando, el receptor de tipo II de TGF- β recluta y fosforila el receptor de tipo I. Este último posteriormente se une y fosforila Smad2 y Smad3. Smad2 y Smad3 fosforilados se unen a Smad4 y se trasladan al núcleo donde se unen a otros factores de transcripción que confieren especificidad, lo que lleva a la activación de genes objetivo. Modificado de Werner y Grose, 2003.

Esta familia de proteínas engloba a tres isoformas estructurales (TGF- β 1, - β 2 y - β 3) las cuales tienen distintas y traslapadas funciones durante el proceso de RT (Gilbert et al., 2016) (Fig. 3). TGF- β agrega una señal importante para el inicio de la reparación atrayendo macrófagos y estimulándolos para secretar citocinas adicionales, incluyendo FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), PDGF, TNF α (necrosis tumoral alfa) e IL-1 (interleucina-1) (Diegelmann y Evans, 2004).

Una expresión aberrante de TGF- β s es asociada con defectos durante el proceso de reparación tisular. Por lo que, la actividad excesiva de TGF- β puede conducir a una cicatrización excesiva (Frank et al., 1996). Primero, aumenta la proliferación de fibroblastos y la transcripción de los genes de colágeno, proteoglicanos y fibronectina, aumentando así la producción general de proteínas de la matriz y el depósito exacerbado y desorganizado de fibras de colágeno (Werner y Grose, 2003; Gilbert et al., 2016). Al mismo tiempo, el TGF- β disminuye la secreción de proteasas responsables de la descomposición de la matriz y también estimula el inhibidor de proteasa, inhibidor tisular de metaloproteasa (TIMP) (Hall et al., 2003). Un requisito crítico para una regeneración exitosa de un tejido es la remodelación adecuada de la ECM, donde existe una regulación entre la síntesis y degradación de sus componentes. Los encargados de esta regulación en la remodelación de la ECM son las MMP y sus TIMP. Lo cual puede conducir a la fibrosis de la piel y provocar cicatrices excesivas (Matrisian, 1990; Gilbert et al., 2016)

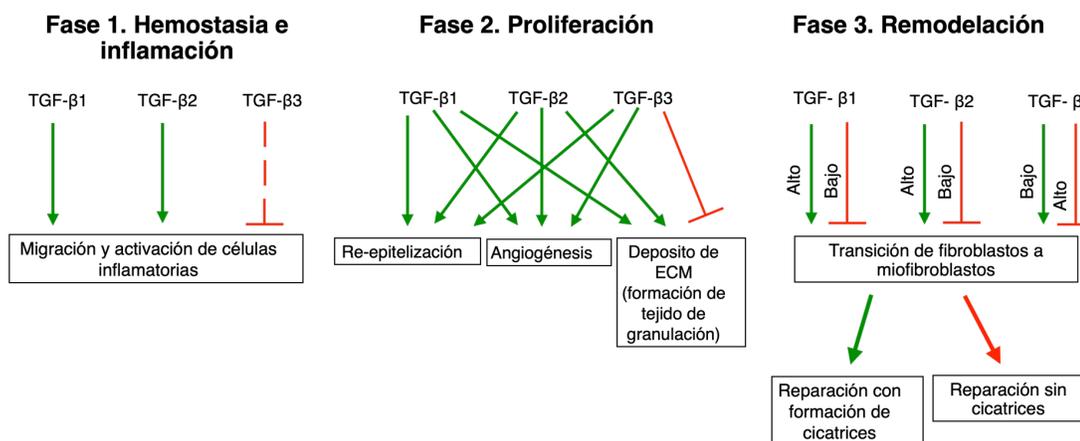


Fig 3. TGF- β 1,- β 2 y - β 3 tienen una función central en las fases de reparación tisular. Durante la hemostasia e inflamación la expresión de las isoformas TGF- β 1 y - β 2 promueve la migración y activación de células inflamatorias. TGF- β 1 y - β 2 permiten la re-epitelización, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y el depósito de ECM, la expresión de TGF- β 3 ha demostrado inhibir el depósito de ECM durante la fase de proliferación. Durante la remodelación una sobreexpresión de TGF- β 1 y - β 2 potencia la transición de fibroblastos a miofibroblastos los cuales aceleran el depósito de ECM y proveen tensión a la herida causando una reparación con formación de cicatrices. Por otro lado TGF- β 3 resulta inhibir esta transición. Flecha verde: estimulante; línea roja continua: inhibitoria; línea roja discontinua: potencialmente inhibitoria. Modificado de Gilbert et al., 2016.

La fibrosis puede definirse como la sustitución de los elementos estructurales normales del tejido por una acumulación excesiva, distorsionada y no funcional de tejido cicatricial (Kovacs, 1991). Muchos problemas clínicos están asociados con la formación excesiva de cicatrices, como: queloides, cicatrices hipertróficas en la piel, adherencias de tendones, esclerodermia, cápsulas alrededor de implantes mamarios, cirrosis hepática, aterosclerosis y pseudoartrosis fibrótica en el hueso (McCormick, 1999; Diegelmann y Evans, 2004). Los queloides son tejido cicatricial protuberante y se ha confirmado que tienen una mayor expresión de TGF- β y también una regulación positiva de los receptores de TGF- β (Babu et al., 1992; Chin et al., 2001). Es por esto por lo que la neutralización de la señalización de TGF- β es un blanco específico para impulsar la regeneración en una serie de afecciones como: trastornos fibroproliferativos, enfermedades vasculares y la reparación de heridas (Shah et al., 1994; McCormick, 1999; Lu et al., 2005).

1.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los derivados radicales de oxígeno (O_2), conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), tienen una función fundamental en el proceso de reparación tisular, ya que actúan como moléculas secundarias de señalización, algunas ROS son: el anión superóxido $\bullet O^-$, peróxido $\bullet O^{-2}$, peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , radicales hidroxilo $\bullet OH$ e iones hidroxilo OH^- (Dunnill et al., 2017). Durante la RT, las ROS actúan como segundos mensajeros para el reclutamiento de leucocitos (neutrófilos y monocitos) en los sitios lesionados, también sirven en la defensa inicial contra patógenos a través de los fagocitos y la explosión de ROS (Yang et al., 2012; Dunnill et al., 2017) (Fig. 3). Varias células utilizan estos radicales, incluidas plaquetas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos (Soneja et al., 2005). Un exceso de los niveles de ROS celulares causa estrés oxidativo lo que perturba la homeostasis que pueden tener efectos perjudiciales en las células.

El control homeostático de los niveles celulares de ROS (estado redox) se mantiene gracias a unas proteínas conocidas como antioxidantes y lo hacen donando sus propios electrones, evitando así que capturen electrones de otras moléculas importantes (Gordillo y Sen, 2003). El glutatión (GSH), es considerado el antioxidante intracelular por excelencia, sin embargo, niveles desregulados de ROS tienen un impacto negativo en el proceso de RT. Exceso de ROS puede conducir a la secreción sostenida de citocinas proinflamatorias (Schieber y Chandel, 2014) y la inducción de metaloproteasas de la matriz. Tanto el exceso de ROS, como de especies reactivas de nitrógeno (RNS), pueden directa e indirectamente (a través de la activación de la proteólisis) modificar o degradar las proteínas de la ECM y también causar

deterioro de la función de los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos (Moseley et al., 2004). Los macrófagos activados por estas citocinas liberan altas concentraciones de NO^* , lo que puede provocar inflamación persistente y daño tisular. La inflamación excesiva no solo retrasa la reparación tisular, sino que también provoca un aumento en la formación de cicatrices (Eming et al., 2007; Sharma et al., 2007).

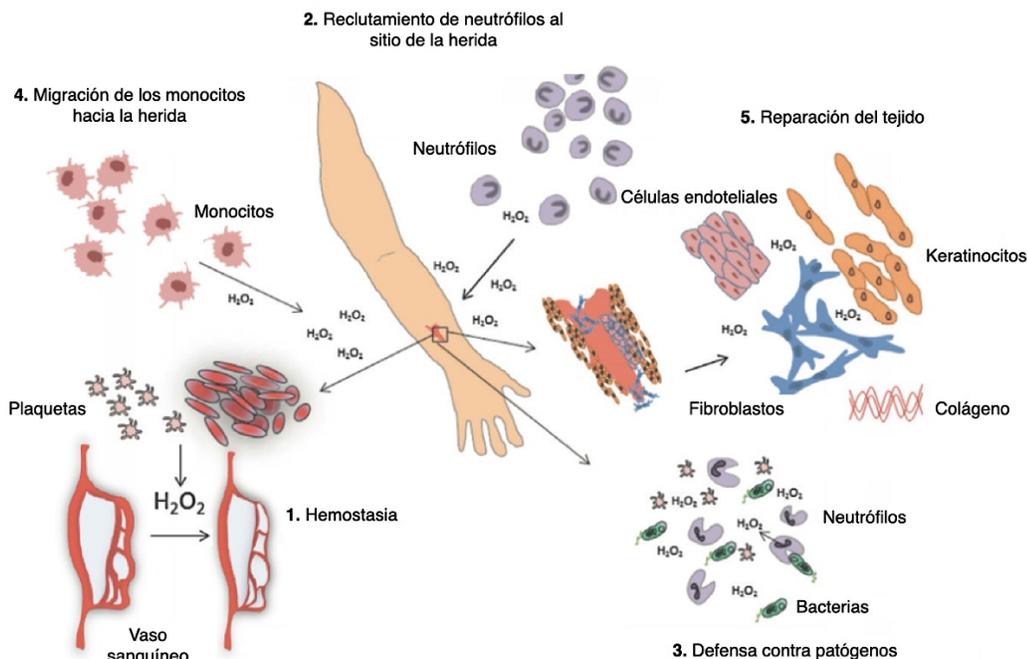


Fig 4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y su función en la reparación tisular mediante: (1) la reducción el flujo sanguíneo y la señalización celular local para la formación de trombos; (2) el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la herida; (3) la fagocitosis para detener el crecimiento bacteriano; (4) la migración de monocitos al hacia el sitio de la herida; (5) estimulando la proliferación y migración de las células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos, para formar nuevos vasos sanguíneo y la nueva ECM. Modificado de Dunnill et al., 2017

Un enfoque para restablecer el equilibrio de ROS indirectamente, como estrategia de curación de heridas, podría ser promover el proceso de reparación tisular con antioxidantes. Esto mediante la integración de compuestos bioactivos anti-inflamatorios y antioxidantes en biomateriales con el objetivo de minimizar complicaciones en los procesos inflamatorios.

1.1.5 Biomateriales

Un biomaterial, por definición, es “una sustancia no farmacológica adecuada para su inclusión en sistemas que aumentan o reemplazan la función de los tejidos u órganos corporales” (Nicolai y Rakhorst, 2008). Estos materiales pueden estar en contacto con fluidos y tejidos corporales durante períodos prolongados sin provocar reacciones adversas o causando mínimas, si es que las hay (Aramwit, 2016).

Los hidrogeles, un tipo de biomateriales, son matrices potencialmente implantables formadas por cadenas poliméricas hidrófilas, unidas por puntos de entrecruzamiento, que constituyen una red tridimensional y son capaces de contener una gran cantidad de agua. Los puntos de entrecruzamiento entre las cadenas que forman un hidrogel evitan su degradación permitiendo su estabilidad en el entorno biológico (Li, 2004). Los biomateriales para reparación de heridas a base de biopolímeros pueden absorber los exudados tisulares, prevenir la deshidratación de la herida y permitir que el oxígeno penetre en el sitio lesionado (Kim et al., 2008). La deshidratación de las heridas perturba el entorno final necesario para estimular el proceso de reparación de la herida y, por tanto, el mantenimiento de un ambiente húmedo es de importancia crítica para una reparación rápida y eficaz de la herida (Varaprasad, et al., 2020). Además, debido a la naturaleza hidrófila y la estructura de los hidrogeles, pueden reaccionar con materiales orgánicos e inorgánicos bioactivos, de manera que las sustancias bioactivas se pueden administrar a la herida de manera sostenida (Anumolu et al., 2011). Hidrogeles con capacidades antioxidantes se utilizan en la medicina regenerativa por su potencial en el proceso de reparación de heridas (Li et al., 2019; Hou et al., 2020).

1.1.6 Alginato de calcio y su aplicación en la reparación tisular

El alginato es un polisacárido producido a partir de las algas pardas y algunas bacterias, es considerado como no tóxico, biocompatible, biodegradable, bioestable y es un biopolímero hidrófilo. Estas características notables convierten al alginato en un polímero idóneo para muchas aplicaciones clínicas y biomédicas avanzadas (Lee y Mooney, 2012). Su estructura consiste en dos residuos de ácido gulurónico (G) y dos de ácido manurónico (M) con enlaces (1,4) (Augst, Kong y Mooney, 2006). Cuando se agregan iones de calcio (Ca^{2+}) al alginato, se forma una estructura de “caja de huevos” bajo la interacción de cationes entre Ca^{2+} y los bloques de guluronato de alginato, dando una estructura entrecruzada de alginato de calcio (Fig. 4) (Cheng et al., 2017; Pereira et al., 2013). Esta unión se ha empleado para entrecruzar el

alginato para una amplia variedad de aplicaciones avanzadas, principalmente para la reparación de heridas, materiales inmovilizadores de células y andamios para ingeniería de tejidos (Karri et al., 2016; Pasparakis y Bouropoulos, 2006). Además, debido a sus grupos funcionales, el alginato se puede mezclar fácilmente con otros biopolímeros formando una estructura reticulada. Estas estructuras de red pueden aumentar la estabilidad física del material y también proporcionar un entorno húmedo para la herida (Karri et al., 2016).

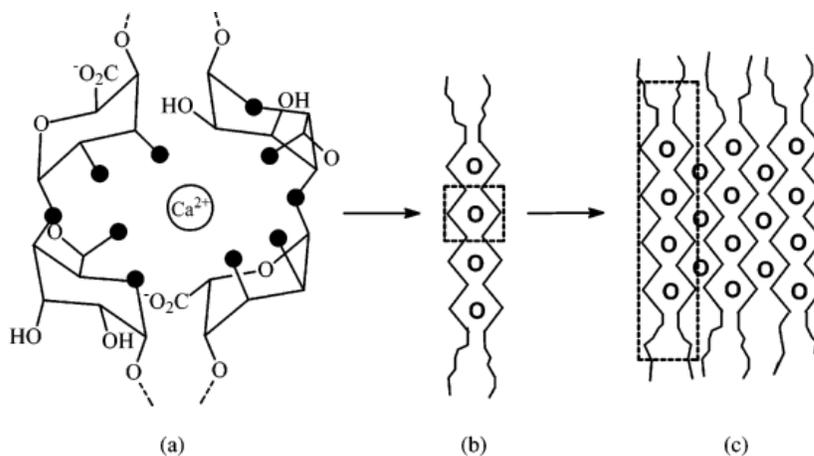


Fig 5. Representación esquemática de la estructura de las zonas de unión de la caja de huevos en geles de alginato de calcio: (a) coordinación de Ca^{2+} en una cavidad creada por un par de secuencias de guluronato a lo largo de las cadenas de alginato (b) dímero de caja de huevos, y (c) multifímero de caja de huevos asociado lateralmente. Tomado de (Fang et al, 2007).

Materiales de alginato como apósitos para heridas están disponibles comercialmente en la actualidad. Rojewska et al., 2017, discutieron acerca de algunos conocidos por su nombre comercial como Nu-derm[®], Algisite M[®] y Melgisorb[®], concluyendo que proveen ambientes húmedos, son muy absorbentes, fáciles de retirar y logran proteger la herida de infecciones. Ehterami et al., 2013, sintetizaron y evaluaron hidrogeles de quitosano-alginato de calcio suplementados con alfa-tocoferol (vitamina E), como compuesto antioxidante, en un modelo de reparación de heridas en rata. Los hidrogeles evaluados aumentaron el crecimiento celular *in vitro* y tuvieron un mayor cierre de la herida que una herida tratada con gasa convencional. Rubio-Elizalde et al., 2019, sintetizaron andamios de alginato de calcio plastificados y suplementados con compuestos antioxidantes de extractos de plantas. Los andamios de alginato demostraron ser biodegradables, biocompatibles y poseer propiedades de absorción de agua capaces de aumentar la proliferación celular de fibroblastos humanos después de 10 días de tratamiento y liberar sus compuestos bioactivos.

1.1.7 N-acetilcisteína (NAC)

La N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco altamente soluble en agua, derivado de la cisteína con un grupo acetilo (-COCH₃) unido a su átomo de nitrógeno y, como la mayoría de los tioles (-SH), puede oxidarse con una gran variedad de radicales y servir como nucleófilo (donante de electrones) (Sumani et al., 2013). Está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso clínico en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Feng, et al., 2015). Es un antioxidante y anti-inflamatorio capaz de infiltrarse en la membrana celular para efectuar su acción y ser precursor del GSH. Además, también funciona como fuente de suministro de glutatión y compensa su agotamiento causado por cantidades excesivas de ROS y manteniendo el equilibrio del sistema redox antioxidante, eliminando directamente los radicales libres y compuestos tóxicos con su grupo tiol (Yamada et al., 2011; Aldini et al., 2018). Las ROS, que oxidan lípidos, proteínas y ADN causando daño celular y posterior muerte celular, han sido implicadas en la fisiopatología de muchos trastornos, incluidas una la reparación tisular deficiente. Los mecanismos de defensa implican el uso de antioxidantes endógenos los cuales eliminan a las ROS o RNS o sus precursores. NAC a demostrado modular tanto *in vitro* como *in vivo* los niveles de ROS y NO*, previniendo el daño tisular oxidativo e inflamatorio en el proceso de reparación tisular (Oguz et al., 2015).

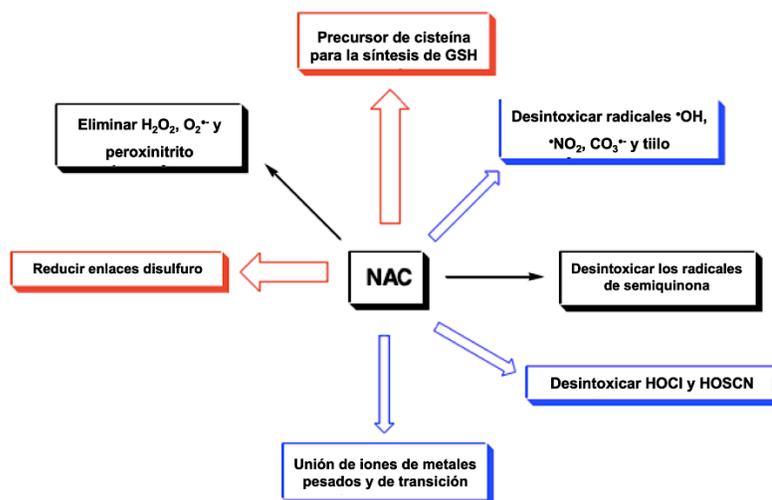


Fig 6. Rutas para las actividades biológicas de NAC. Color rojo - rutas principales, color azul - rutas plausibles, color negro - rutas poco comunes. Modificado de Samuni, et al., 2016.

Oguz et al., 2015, demostraron que la aplicación tópica de N-acetilcisteína mejoró la reparación de heridas en comparación con el dexpanthenol, un fármaco en versión pomada ampliamente usado para estimular la

cicatrización. Los grupos tratados con dexpanthenol y N-acetilcisteína tuvieron resultados similares en términos de tasas de reparación de heridas en ratas. También se ha informado que NAC promueve la cicatrización de heridas en ratas diabéticas y tanto los ratones diabéticos como los no diabéticos que recibieron NAC tuvieron niveles más bajos de marcadores de estrés oxidativo (Aktunc et al., 2010). La NAC se ha suplementado en hidrogeles de óxido de grafeno-colágeno demostrando una reparación 22% más rápida en ratas que el grupo de control no tratado, además, realizaron análisis de expresión genes el cual mostró una regulación negativa del TGF- β después de 14 días de su implantación en el sitio de la herida (Li et al., 2019). Sugiura et al., 2009, demostró que tratar con diferentes concentraciones de NAC era capaz de inhibir las respuestas pro-fibróticas inducidas por TGF- β en fibroblastos. Por último, Gomez-Aparicio et al., 2021, suplementaron con NAC a hidrogeles de gelatina entrecruzada con polímeros metacrilados, los cuales mostraron promover la proliferación celular de fibroblastos dérmicos humanos después de 10 días y reducir el área de una herida en ratones un 30% más en comparación de un grupo tratado con un material comercial después de 7 días de tratamiento. Además, durante sus análisis histológicos del tejido reparado encontraron depósitos de colágeno más organizados en las heridas tratadas con hidrogeles que en las heridas no tratadas. La N-acetilcisteína, es un antioxidante bien caracterizado que ha demostrado un potencial neutralizante de TGF- β por lo que se ha considerado un fármaco muy prometedor para mejorar la reparación de heridas.

1.1.8 *Moringa oleifera*

Una gran variedad de plantas y sustancias naturales han sido examinadas por sus propiedades biológicas. Algunas plantas y productos derivados de ellas han demostrado ser fuentes ricas en compuestos fitoquímicos, los cuales han demostrado poseer capacidad antioxidante (Verma et al., 2009; Craig, 1999). Los compuestos fitoquímicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, y son responsables de protegerlas contra distintos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, incluyendo infecciones, depredadores, radiación ultravioleta, estrés hídrico o salino, además de entregarles colores y sabores a frutas y verduras (Gasaly et al., 2020). El potencial antioxidante que presentan algunas plantas se atribuye principalmente a la cantidad de compuestos polifenólicos que contienen (Fig. 7) (Kumbhare et al., 2012). Los flavonoides son un grupo específico de compuestos fenólicos con propiedades como la captación de radicales libres, inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas y acción anti-inflamatoria (Frankel et al., 1997). La *Moringa oleifera* es una planta miembro de la familia *Moringaceae*, y se cultiva extensamente en muchos países del sudeste asiático, particularmente en Tailandia, India, Filipinas y Pakistán (Fuglie,

2001). Los usos de las especies de *Moringa* son diversos, incluidos el uso de raíces, hojas, flores, vainas verdes y semillas para alimentación humana y animal (Amaglo et al., 2010). Los principales compuestos fitoquímicos presentes en las hojas de *M. oleifera* son: niazinina, niazimicina, b-sitosterol, glucomoringina, n-bencil tiocarbamatos, kaempferol. Además de otras moléculas antioxidantes naturales que incluyen vitaminas, minerales y carotenoides (Azevedo et al., 2018), teniendo un perfil de flavonoides relativamente complejo, siendo los más abundantes: quercetina > kaempferol > isorhamnetina (Amaglo et al., 2010).

Debido a su alto contenido fitoquímico, Azevedo et al., en 2018, evaluaron la aplicación oral y tópica de un extracto acuoso de hojas de *M. oleifera* en un modelo de reparación de heridas cutáneas en ratas diabéticas. Los autores encontraron que la *M. oleifera* influyó positivamente en el proceso de reparación, ya que las ratas tratadas tuvieron un mayor porcentaje de contracción de la herida en los días 2, 5 y 10, en comparación con los controles. Además, Chin et al., 2018, encontraron altas propiedades de proliferación y migración de células de fibroblastos dérmicos humanos y queratinocitos humanos al tratarlas con un apósito que contenía extracto acuoso de hojas de *M. oleifera*. Rubio-Elizalde et al., 2019, sintetizaron andamios de alginato de calcio con *M. oleifera* y *Aloe vera*, en los cuales la *M. oleifera* demostró proporcionar significativamente capacidad antioxidante y propiedades antiinflamatorias a los andamios. Además, mejoraron la proliferación de células de fibroblastos de piel humana después de 10 días de evaluación.

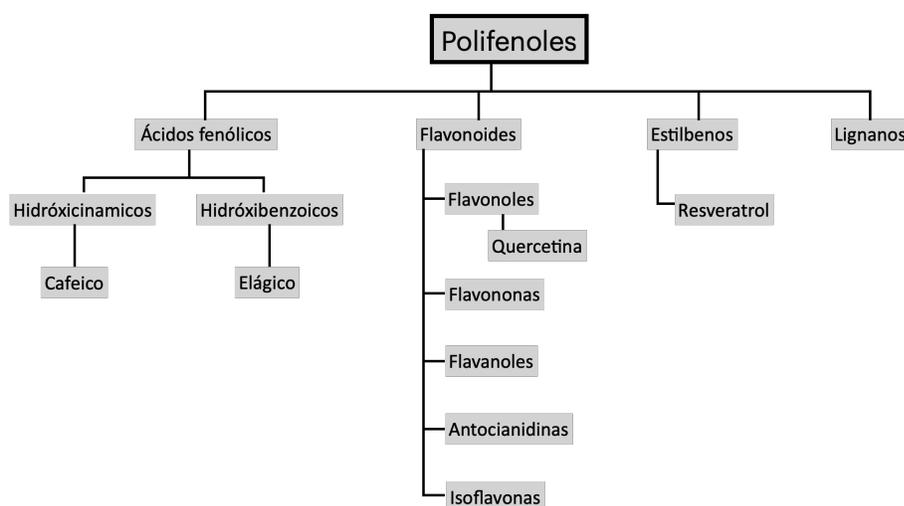


Fig 7. Clasificación de algunos polifenoles y ejemplos. Los polifenoles son los compuestos fitoquímicos a los cuales se les atribuye principalmente la capacidad antioxidante de diferentes plantas. Modificado de Gasaly et al., 2020.

Por lo tanto, existe un interés creciente en los compuestos antioxidantes gracias a su capacidad de prevenir los efectos deletéreos de los radicales libres en procesos biológicos como la reparación tisular. A la par, se ha encontrado una preferencia en los pacientes por los antioxidantes de fuentes naturales en lugar de sintéticos (Santos et al., 2012).

Con base en la información anterior, como estrategia en este trabajo se propone la síntesis de hidrogeles de alginato, entrecruzados con cloruro de calcio (CaCl_2) y plastificados con metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) un polimérico sintético biocompatible y con baja inmunogenicidad (Bozukova et al., 2007; Slaughter et al., 2009) para mejorar su estabilidad en medio acuoso. Además, de estar suplementado con compuestos bioactivos como la N-acetilcisteína (NAC) y un extracto acuoso de *Moringa oleifera*, el cual provea un andamio para la proliferación de células. Así como capacidad antioxidante y neutralizante de TGF- β para modular los diferentes factores que pueden afectar al proceso de reparación tisular y encaminarlo a una regeneración del tejido, en cual la funcionalidad de la piel no se vea afectada.

1.2 Justificación

La piel es considerada el órgano más extenso del cuerpo humano, y se encarga de cubrir y proteger los órganos y músculos. La pérdida o falla de un órgano o tejido como resultado de una lesión, intervención quirúrgica, quemadura u otro tipo de daño es uno de los problemas más frecuentes y costosos en la salud humana. El trasplante de tejidos es una terapia generalmente aceptada para tratar esta problemática. Sin embargo, se ve limitado por la escasez de donantes, complicaciones postoperatorias, posibilidad de rechazo y cuidados intensivos. Debido a esto, la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos busca crear estrategias para reparar y regenerar tejidos y órganos. El desarrollo de hidrogeles biocompatibles biodegradables e implantables con la capacidad de modular la expresión de factores de crecimiento y liberar compuestos bioactivos que induzcan la regeneración y el restablecimiento de la funcionalidad de tejidos. Es altamente prometedor como terapia para personas que presenten lesiones tisulares, patologías metabólicas (diabetes, obesidad, hipertensión), así como enfermedades autoinmunes que comprometan el proceso de RT, causando falla o pérdida del órgano. Además, de proveer una mayor comodidad al paciente al reducir los tiempos de hospitalización y lograr una liberación constante y localizada de los agentes bioactivos en el sitio afectado. Al contrario de los trasplantes de tejidos o las reconstrucciones quirúrgicas, las cuales implican en su mayoría largos tiempos de hospitalización, servicios ambulatorios y una administración sistémica de fármacos. Como respuesta a esta problemática, en este documento de

tesis, se propuso el desarrollo de hidrogeles con la capacidad de neutralizar la expresión de TGF- β , proporcionando un andamio estructural para la proliferación del tejido, así como compuestos bioactivos con actividades antioxidante y anti-inflamatoria que logren la regeneración de los tejidos y el restablecimiento de su funcionalidad.

1.3 Hipótesis

Los hidrogeles desarrollados usando una matriz polimérica de soporte, NAC y un compuesto neutralizante de TGF- β , poseerán propiedades fisicoquímicas relacionadas con su absorción de agua y capacidad hemostática y biológicas como actividades antioxidante, anti-inflamatoria y neutralizante de TGF- β , evaluadas *in vitro*, para su potencial aplicación en la regeneración tisular

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar y caracterizar *in vitro* hidrogeles con actividad antioxidante y neutralizante de TGF- β para su aplicación en regeneración de tejidos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener hidrogeles a base de un polímero natural, NAC y un compuesto con potencial de actividad neutralizante de TGF- β
- Determinar las propiedades fisicoquímicas del hidrogel (capacidad de absorción de agua y capacidad hemostática)

- Evaluar *in vitro* las propiedades biológicas del hidrogel (efecto neutralizante del TGF- β , actividades antioxidante y anti-inflamatoria, con respecto a remoción de NO)
- Demostrar a nivel *in vitro* la biocompatibilidad del hidrogel respecto a su hemocompatibilidad (hemólisis) y viabilidad celular

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de hidrogeles

2.1.1 Preparación del extracto acuoso de *M. oleifera*

Para este trabajo, se utilizó un extracto acuoso de *Moringa oleifera*. Las hojas pulverizadas de *M. oleifera* se obtuvieron de un distribuidor comercial especializado, San Martín®, con certificación de venta de productos orgánicos por parte de Agricert México (Agricert, 2016). El extracto se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Rubio-Elizalde et al., 2019. Se agregaron 25 g de hojas pulverizadas a un vaso de precipitados con 250 mL de agua destilada, previamente calentada a 75 °C, y se dejaron en agitación durante 5 min para después filtrarla dos veces usando papel filtro. La solución resultante de la filtración se centrifugó a 42,336 x g por 10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante, este proceso se repitió dos veces. Se realizó una tercera filtración, utilizando filtros de papel con tamaño de poro de 0.2 µm (Whatman®). El extracto acuoso se congeló a -80 °C durante 24 h y se liofilizó durante 3 días (Labconco FreeZone 1). El extracto liofilizado se guardó a 4 °C hasta su utilización.

2.1.2 Elaboración de los hidrogeles

Los hidrogeles se realizaron con el procedimiento descrito por Rubio-Elizalde et al., 2019 con las siguientes modificaciones (véase Fig. 8): se preparó una solución de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, 18094) al 3 % (m/v) en agua destilada (1), a la cual se añadió metilétermetacrilato de polietilenglicol Mn~500 (PEGMA) (Sigma-Aldrich, 447943) al 0.75 % (v/v) como plastificante (1.2), y se entrecruzó con cloruro de calcio (CaCl₂) 1.5 % (m/v) una relación 1:1 (alginato plastificado:CaCl₂) (1.3). El entrecruzamiento de la estructura polimérica de alginato con calcio provee a los hidrogeles una mayor estabilidad en medios acuosos (Zactiti y Kieckbusch, 2009) y la incorporación de un plastificante, como el PEGMA, ha demostrado mejorar el manejo, estabilidad y flexibilidad de los hidrogeles (Rubio-Elizalde et al., 2019). Después de homogenizar perfectamente la mezcla, utilizando una licuadora de mano, obtuvimos una solución con concentración final de alginato 1.5 % (m/v), CaCl₂ 0.75 % (m/v) y PEGMA 0.375 % (v/v). A esta solución se le agregaron los compuestos bioactivos, es decir, el extracto de *M. oleifera* y/o NAC (2 y 3) a concentraciones finales de 0.01, 0.1 y 0.5 % m/v *M. oleifera* y NAC 40 mM. Las concentraciones de *M. oleifera* (MO) y NAC con

que se sintetizaron los hidrogeles, se determinaron a partir de la viabilidad celular de las células HEK-Blue™ TGF- β y su potencial para promover la regeneración tisular. Obteniendo ocho diferentes condiciones denominadas: Alg, Alg-40NAC, Alg-0.01%MO, Alg-0.1%MO, Alg-0.5%MO, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC. De las diferentes condiciones, se depositaron 600 μ l de cada una en moldes de poliestireno (Corning 3526) (6), se congelaron a -20 °C durante 48 h (7) y se liofilizaron durante 24 h (Labconco FreeZone 1) (8). De este modo se obtuvieron hidrogeles porosos y flexibles.

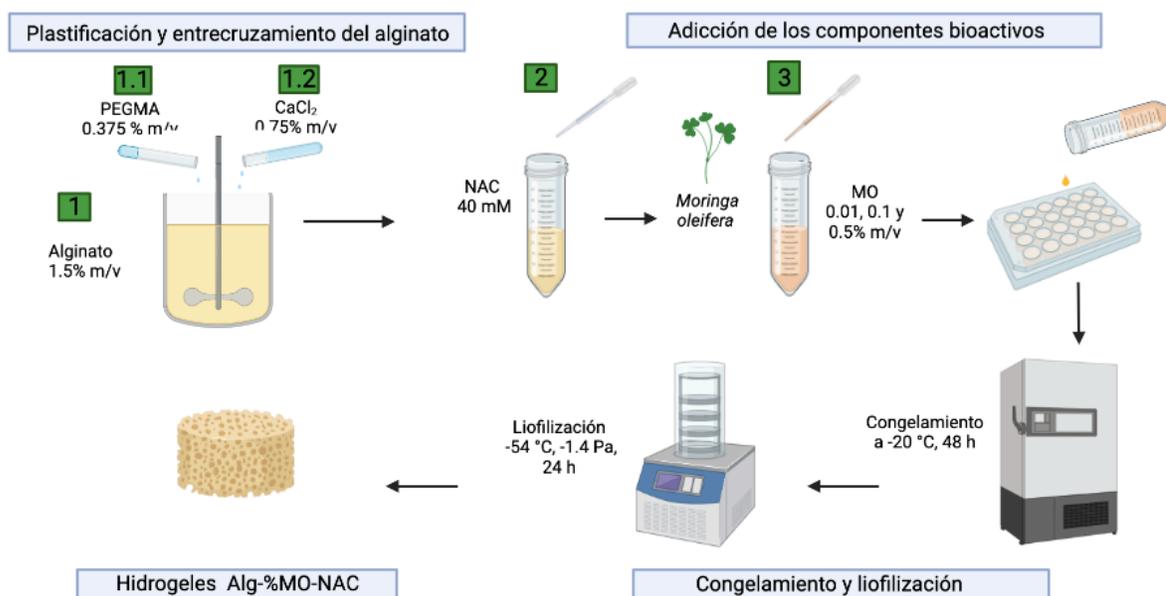


Fig. 8. Proceso de síntesis de los hidrogeles de alginato plastificados con PEGMA y entrecruzados con CaCl_2 adicionados con MO (*Moringa oleifera*) y NAC (N-acetilcisteína). (1) La solución de alginato de sodio se plastificó con PEG-metil éter metacrilato (PEGMA) (1.1) y se entrecruzó con CaCl_2 (1.2), luego se homogenizaron los compuestos bioactivos, la NAC (2) y/o el extracto de *M. oleifera* (3) con el alginato plastificado: CaCl_2 . Las soluciones obtenidas se vertieron en moldes de poliestireno y se congelaron a -20 °C durante 48 h, y luego se liofilizaron durante 24 h para obtener los hidrogeles con propiedades para la regeneración de heridas.

2.2 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles

2.2.1 Absorción de agua o hinchamiento

La absorción de agua, o hinchamiento, se evaluó en función del peso del hidrogel antes y después de estar en contacto con un medio acuoso (Rubio-Elizalde et al., 2019). Evaluamos la propiedad de absorción de

fluidos de nuestros materiales sumergiéndolos en agua. Los hidrogeles se sumergieron en 2 mL de agua destilada durante 15, 30, 60, y 120 minutos, a 37 °C. Transcurrido el tiempo se retiró el agua que no fue absorbida y se pesaron los hidrogeles. La absorción de agua se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Absorción de agua, \%} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

donde M_0 es la masa inicial del apósito y M_t es la masa del apósito a hidratada. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

2.2.2 Evaluación de la capacidad hemostática

La capacidad hemostática se evaluó según la capacidad de los hidrogeles de retener sangre coagulada dentro de su matriz (Kumar et al., 2009). Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos y se colectaron en tubos BD Vacutainer® con citrato dextrosa (ACD), como anticoagulante. Cada hidrogel se infiltró con 100 µL de sangre anticoagulada, la reacción de coagulación inició cuando 10 µL de CaCl₂ (0.2 M) se añadieron a cada muestra, previamente empapada con la sangre. Las muestras se incubaron a 37° C por 15, 30, 45 y 60 min. Subsecuentemente, 1.5 mL de agua destilada se agregaron cuidadosamente, para no perturbar el coagulo, y se incubó nuevamente a 37° C durante 5 min. Posteriormente, se colectó el sobrenadante de cada muestra y centrifugó a 300 x g (Eppendorf modelo 5418) durante 10 min. Se transfirieron 200 µL del sobrenadante a una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (lector de placas Epoch Biotek®).

2.3 Evaluación *in vitro* de las propiedades biológicas de los hidrogeles

2.3.1 Evaluación del efecto neutralizante del TGF-β de los hidrogeles

El efecto neutralizante de TGF-β de los hidrogeles se evaluó usando el sistema de células HEK-Blue™ TGF-β (InvivoGen hkb-tgfb). Estas células permiten la detección de TGF-β bioactivo ya que expresan un gen indicador a fosfatasa alcalina embrionaria secretada, o SEAP, la cual se va a secretar cuando se active la vía TGF-β dependiente de Smad. La cantidad secretada se puede evaluar con la solución QUANTI-Blue™ un reactivo colorimétrico que permite la detección de SEAP a 655 nm. Las células HEK-Blue™ TGF-β se cultivaron usando Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10 % suero fetal

bovino (SFB), 1 % de antibiótico/antimicótico y 100 µg/mL de Normicina. Los hidrogeles se sumergieron en 600 µL de medio de cultivo celular DMEM (suplementado con 10 % SFB y 1 % de antibiótico/antimicótico) durante 3 horas. Una vez pasado este tiempo el ensayo se llevó a cabo según el protocolo indicado por el fabricante, de la siguiente forma: en una placa de 96 pozos se agregaron 20 µL del medio pretratado con cada hidrogel, después 20 µL de TGF-β1 humano recombinante, a 10 ng/mL, se añadieron para lograr estimular a las células y, por último, se añadieron 160 µL de la suspensión de células (~ 280,000 células/mL) y se incubó a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 h. Pasado el tiempo se tomaron 20 µL del sobrenadante de células y se mezclaron con 180 µL de solución QUANTI-Blue™. Se incubó a 37 °C por 1 h y se determinó el efecto neutralizante de TGF-β según los niveles de SEAP secretados usando un espectrofotómetro a 655 nm. Como control positivo se usaron las células estimulas con TGF-β1 y medio de cultivo como control negativo.

2.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogeles

La actividad antioxidante se determinó mediante el reactivo ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). La oxidación de ABTS con persulfato de potasio (KPS) genera un catión de radicales libres, ABTS^{•+}, y este se reduce en presencia de antioxidantes. El ABTS^{•+} es un reactivo colorimétrico azul-verdoso que al ser neutralizado se vuelve transparente (Skotti et al., 2014). Su absorbancia se detecta a 734 nm y, entre mayor sea la capacidad antioxidante (remoción de radicales libres) de los hidrogeles, menor será la absorbancia medida, de tal forma que es posible determinar el potencial antioxidante de los hidrogeles mediante espectrofotometría UV-Visible. Los hidrogeles se sumergieron durante 6 min en 1.8 mL de ABTS^{•+}, previamente oxidado con KPS. Pasado este tiempo, se tomaron 200 µL del sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 pozos. Se calculó el porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm (Lector de placas BioTek Epoch) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del ABTS}^{\bullet+}, \% = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

donde: $\text{Abs}_{\text{control}}$ y $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ son los valores de absorbancia del control y la muestra a los 6 min, respectivamente, se utilizó como control la absorbancia del ABTS^{•+} con agua. El ensayo se realizó por triplicado.

2.3.3 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria

Para determinar la actividad anti-inflamatoria se evaluó la capacidad para remover o neutralizar el radical óxido nítrico (NO^{*}) de los hidrogeles. El radical NO^{*} es un mediador pro-inflamatorio, que cuando se libera a altas concentraciones durante condiciones patológicas y desencadena inflamación (Sharma, et al., 2007). Los hidrogeles se pusieron en contacto con 1.2 mL de nitroprusiato de sodio (SNP), un donador de NO^{*}, el cual después se hizo reaccionar con el reactivo de Griess 1X para producir un complejo de color rosado-rojo, que se descompone en presencia de compuestos removedores de NO^{*} (Kavoosi & Amirghofran, 2017). Cuanto menor sea la absorbancia medida a 540 nm, mayor será la capacidad de remoción de NO^{*} y, por lo tanto, mayor la capacidad anti-inflamatoria relacionada con la remoción de NO^{*} de los hidrogeles (Rubio-Elizalde et al., 2019). La remoción del NO se determinará de la siguiente manera:

$$\text{Remoción de NO}^*, \% = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

donde: Abs_{control} y Abs_{muestra} son los valores de absorbancia del control y la muestra, respectivamente. Se utilizó como control la absorbancia del SNP con agua, y el ensayo se realizó por triplicado.

2.4 Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad de los hidrogeles

2.4.1 Prueba de hemocompatibilidad

Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos y se colectaron en tubos BD Vacutainer® con citrato dextrosa (ACD) como anticoagulante. Las pruebas de hemólisis se basaron en la literatura reportada (Geng, et al., 2018; Ooi, et al., 2019) con algunas modificaciones. Cada hidrogel se sumergió en 2 mL de PBS 1X por 30 min a 37° C, después de esto se agregaron 40 µL de sangre a la solución, se homogenizó cuidadosamente y se incubó por 1 h a 37 °C. Como control positivo, 40 µL de sangre se agregaron a un tubo con 2 mL de agua destilada, de igual manera 40 µL de sangre se agregaron a un tubo con PBS 1X como control negativo. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 700 x g por 10 min, luego se transfirieron 200 µL del sobrenadante de cada muestra a una placa de 96 pozos. La hemoglobina liberada, a causa de la lisis de los eritrocitos, se determinó midiendo la absorbancia del

sobrenadante a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (lector de placas Epoch Biotek®). El porcentaje de hemólisis fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Hemólisis, \%} = \frac{D_s - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100 \quad (5)$$

donde D_s es la absorbancia del sobrenadante del hidrogel, D_{nc} es la absorbancia del control negativo y D_{pc} es la absorbancia del control positivo.

2.4.2 Ensayo de viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular se determinó cuantitativamente usando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, M5655). Se cultivaron células de fibroblastos de piel humana CCD-1112sk (ATCC CRL-2429) y fibroblastos de ratón L929 (ECACC 8501142), usando Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementado con 10 % SFB y 1 % de antibiótico/antimicótico. La viabilidad celular se evaluó por contacto directo con los hidrogeles. Se colocaron los hidrogeles en placas de 24 pozos con 1 mL de suspensión celular (~ 200,000 células), se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 h. Pasado el tiempo se retiraron 500 µL del sobrenadante, se añadieron 60 µL de MTT a cada pozo y se incubó durante 3 h. Para disolver los precipitados de formazán formados de la reacción del MTT con las células metabólicamente activas, se adicionaron 300 µL ácido clorhídrico (HCl) 0.01M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %, y se incubó por 18 h. Después se transfirieron 200 µL de sobrenadante a una placa de 96 pozos y la absorbancia se leyó a 570 nm (lector de placas BioTek Epoch).

Para la evaluación de proliferación celular se utilizaron las células L929. Nuevamente se colocó cada hidrogel en placas de 24 pozos y se sembraron ~200,000 células por pozo con medio IMDM suplementado. A continuación, las placas se incubaron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C. El medio se cambió a las primeras 24 h, después se realizó el recambio cada 72 h. Los hidrogeles se incubaron durante 3, 6 y 10 días. La proliferación celular se determinó usando el reactivo MTT, como se describió anteriormente. La viabilidad celular y proliferación se expresó como la absorbancia a 570 nm de las muestras después de los diferentes periodos de incubación. Se utilizaron las células en monocapa como control positivo y el medio de cultivo IMDM como control negativo, se promediaron los resultados de tres muestras para obtener cada medición.

2.5 Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 8, mediante: un ANOVA de una vía, con comparación múltiple de Tukey para: hemocompatibilidad y capacidad hemostática, con comparación múltiple de Dunnett para: viabilidad celular, neutralización de TGF- β , actividad antioxidante y anti-inflamatoria, y un ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey para la proliferación celular. Cada condición de hidrogeles se analizó por triplicado (n=3). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y, *** ($p < 0.001$).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis de los de hidrogeles

3.1.1 Evaluación de la citotoxicidad y potencial neutralizante TGF- β de *M. oleifera* y NAC

Las concentraciones de compuestos bioactivos con las que se sintetizarían los hidrogeles se determinaron según su biocompatibilidad y potencial neutralizante de TGF- β . Por lo tanto, se inició evaluando la viabilidad celular del extracto acuoso de *M. oleifera* en células HEK-Blue™, ya que estas permiten la detección del TGF- β bioactivo. La viabilidad celular se determinó mediante el reactivo MTT, el cual es transformado por las deshidrogenasas mitocondriales en las células metabólicamente activas, en un precipitado de formazán de color violeta-cafe. El formazán disuelto, permite correlacionar la densidad óptica a 540 nm con el número de células viables (Kumar et al., 2018). Se inició evaluando las concentraciones de 1 y 2 % m/v de *M. oleifera* (MO), ya que previamente se reportó que suplementar los hidrogeles con compuestos con capacidad antioxidante y inflamatoria (respecto a la remoción de NO^{*}), así como actividad antimicrobiana, contribuye a promover la reparación tisular (Cárdenas Carreón, A, 2019, Rubio-Elizalde et al., 2019). Como resultado de la comparación con la monocapa de células sin tratamiento, las células tratadas con las soluciones de *M. oleifera* al 0.5, 1 y 2 % m/v disminuyeron su viabilidad celular a un 44.74, 34.89 y 24 %, respectivamente, después de 24 h a 37 °C, 5 % CO₂. (Fig. 9).

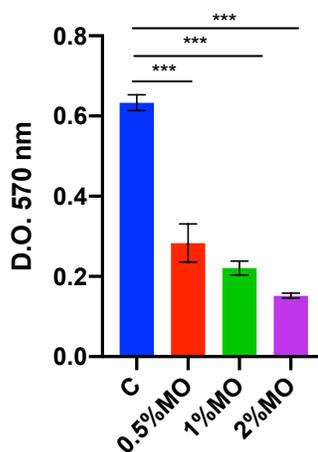


Fig. 9. Viabilidad de las células HEK-Blue™ TGF- β tratadas con soluciones de 0.5, 1 y 2% m/v de *M. oleifera* con el método colorimétrico MTT. Como control positivo (C) células sin *M. oleifera* (MO). Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como *** ($p < 0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett.

Debido a que las concentraciones de 0.5, 1 y 2 % resultaron citotóxicas para las células HEK-Blue™ TGF-β con las que se evaluaría el potencial de neutralización de TGF-β, se evaluaron entonces nuevas concentraciones de *M. oleifera*, así como concentraciones de 20 y 40 mM de NAC. Estas concentraciones de NAC han demostrado, en trabajos previos, ayudar a mejorar la biocompatibilidad de algunos biomateriales (Vargas Barona, 2020, Gomez-Aparicio et. al, 2021). Los extractos de *M. oleifera* al 0.01 % y 0.1 % m/v obtuvieron una viabilidad celular del 91.05 y 85.18 %, respectivamente (Fig. 10), los cuales resultaron no ser significativamente diferentes a la viabilidad celular obtenida para la monocapa de células, i.e. sin ningún tratamiento, al realizar el análisis estadístico. A su vez se observó un aumento en la viabilidad del 242.10 y 347.82 % en las células HEK-Blue™ TGF-β al tratarlas con 20 y 40 mM de NAC, respectivamente (Fig. 10).

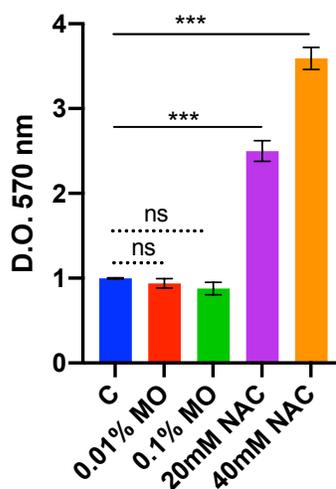


Fig. 10. Viabilidad de las células HEK-Blue™ TGF-β tratadas con soluciones de 0.01 y 0.1% m/v de *M. oleifera* y 20 y 40 mM de NAC con el método colorimétrico MTT. Como control positivo (C) células sin *M. oleifera* (MO) o NAC. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como *** ($p < 0.001$) y ns: no significativo ($p > 0.05$), en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett.

Para garantizar los resultados en el ensayo de neutralización de TGF-β, se decidió evaluar concentraciones de *M. oleifera* que no resultaran citotóxicas para las células. Por lo que se evaluó tanto la citotoxicidad por medio del ensayo de MTT, así como, el efecto neutralizante TGF-β mediante el reactivo QUANTI-Blue™ de las soluciones al 0.01, 0.1 y 0.5 % m/v de *M. oleifera* suplementadas con 40 mM de NAC. La estimulación de las células HEK-Blue™ TGF-β con TGF-β induce la activación de la vía de señalización TGF-β dependiente

de Smad, induciendo la producción de SEAP. La cantidad de SEAP secretada en el medio extracelular se puede evaluar fácilmente con la solución QUANTI-Blue™ a 655 nm.

Ninguna de las condiciones evaluadas demostró afectar la viabilidad celular después de 24 h a 37 °C, 5 % CO₂ mediante el reactivo MTT (Fig. 11a). Las soluciones de 0.1 y 0.5 % m/v de *M. oleifera* suplementadas con 40 mM de NAC demostraron mejorar la viabilidad un 287.35 % y 234.72 %, respectivamente. En este análisis se observó *M. oleifera* con NAC logró mitigar la citotoxicidad de 0.5 % de *M. oleifera* que en el análisis previo disminuyó la viabilidad hasta un 44.73 % (Fig. 9). Todas las concentraciones, bajo las condiciones evaluadas, demostraron actividad de neutralización de TGF-β, logrando un 29.94% de neutralización con 0.01% MO; 18.34 % con la proporción 0.01%MO-40NAC; 34.12 % con 0.1%MO-40NAC y 35.52 % con 0.5%MO-40NAC (Fig. 11b). A partir de estos resultados se estableció que éstas serían las concentraciones de *M. oleifera* y NAC para incorporar a los hidrogeles.

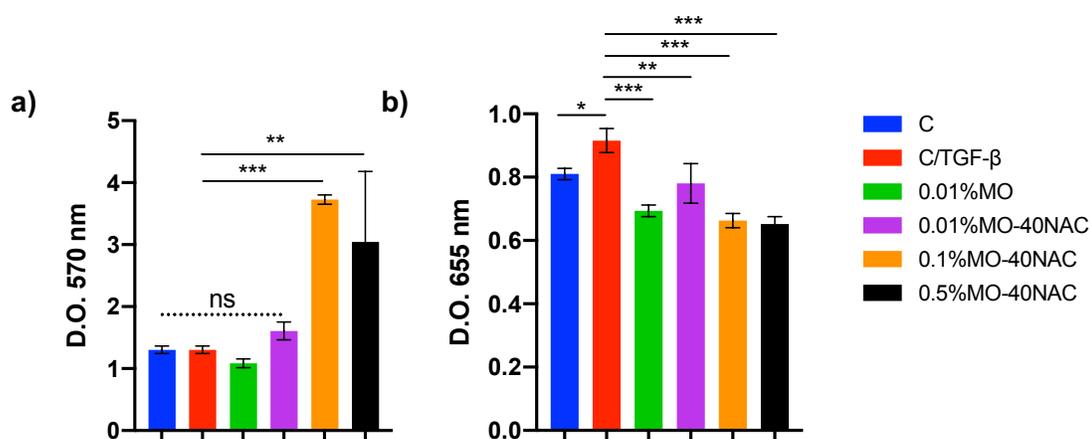


Fig. 11. a) Citotoxicidad de las soluciones de 0.01, 0.1 y 0.5 % m/v de *M. oleifera* con 40 mM de NAC usando MTT. b) Efecto neutralizante de TGF-β usando el reactivo QUANTI-Blue™. Como control (C) se usaron células sin ningún tratamiento. Como control positivo (C/TGF-β) se utilizaron células estimuladas con 10 ng/mL de TGF-β. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3/grupo). El nivel de significancia está denotado como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns: no significativo ($p > 0.05$), en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett.

3.1.2 Preparación de hidrogeles de alginato de calcio suplementados con *M. oleifera* y NAC.

Se obtuvieron ocho tipos de hidrogeles (Fig. 12), los cuales fueron constituidos por alginato de calcio y PEGMA como matriz polimérica tridimensional de soporte denominados de la siguiente manera: (1) Alg, matriz polimérica “blanco”; (2) Alg-40NAC; (3) Alg-0.01%MO; (4) Alg-0.1%MO; (5) Alg-0.5%MO; (6) Alg-

0.01%MO-40NAC; (7) Alg-0.1%MO-40NAC y (8) Alg-0.5%MO-40NAC. Los hidrogeles obtenidos tenían una apariencia porosa y resultaron suaves y ligeramente flexibles al tacto.

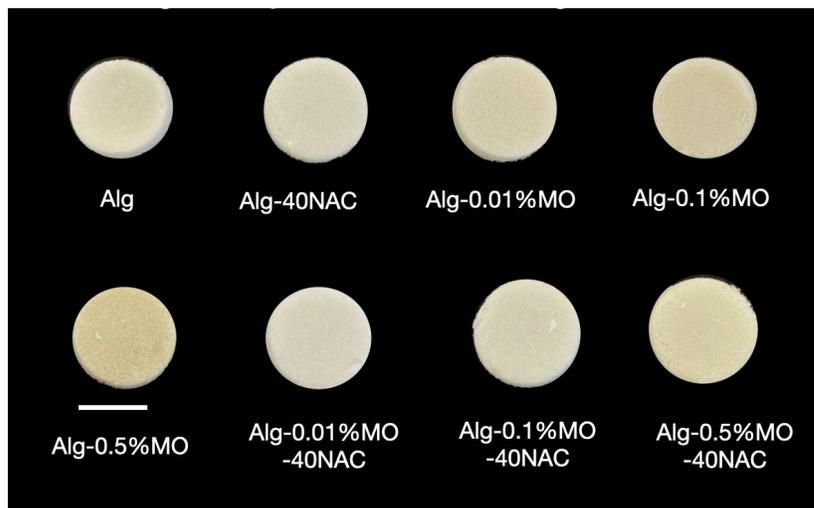


Fig. 12. Fotografías de la vista superior de los hidrogeles obtenidos. La barra de escala indica 10 mm.

3.2 Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad de los hidrogeles

3.2.1 Viabilidad celular en fibroblastos CCD-1112Sk

Para conocer la biocompatibilidad de los hidrogeles sintetizados se evaluó la viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk. Se activaron y cultivaron las células en placas de 100 mm con IMDM suplementado, según se describió en la metodología. En este ensayo ~200,000 células se cosecharon en presencia de los diferentes hidrogeles sintetizados durante 24 h a 37 °C, 5% CO₂.

La matriz polimérica de alginato (Alg) demostró ser biocompatible con los fibroblastos, obteniendo un 102.97 % de viabilidad celular en comparación con la monocapa de células. En las condiciones en la que los hidrogeles fueron suplementados solo con 40 mM de NAC, o las diferentes concentraciones de *M. oleifera* (0.01, 0.1 y 0.5 %) en conjunto con la NAC, se observó un aumento en la viabilidad celular de hasta un 289.30 %. Por otro lado, el aumentar la concentración de *M. oleifera* a 0.1 % y 0.5 %, sin suplementar con NAC, disminuyó la viabilidad de los fibroblastos CCD-1112Sk a un 79.75 y 28.70 %, respectivamente, como se muestra en la gráfica (Fig. 13).

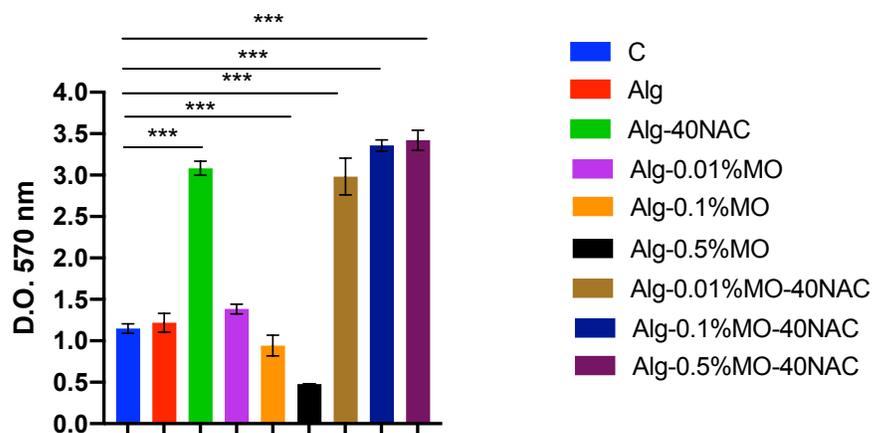


Fig. 13. Viabilidad de los fibroblastos CCD-1112sk en contacto directo con los hidrogeles. Como control positivo (C): monocapa de células CCD-1112sk. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3/\text{grupo}$). El nivel de significancia está denotado como *** ($p < 0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett con respecto al control positivo (C).

3.2.2 Viabilidad en células HEK-Blue™ TGF- β

Con este ensayo se evaluó de manera indirecta el efecto de los hidrogeles en la viabilidad de las células HEK-Blue™ TGF- β .

Las células cultivadas con el medio pre-tratado con los hidrogeles suplementados con 0.01 y 0.1% de *M. oleifera*, obtuvieron valores similares en la evaluación de su viabilidad en comparación con la monocapa de células sin tratamiento. Sin embargo, al aumentar la concentración de *M. oleifera* a 0.5 % m/v la viabilidad celular disminuyó hasta al 73.22 %. De la misma manera que en la evaluación de viabilidad de los fibroblastos CCD-1112sk (Fig. 13), las células HEK-Blue™ TGF- β en las cuales los hidrogeles fueron suplementados con 40 mM de NAC, presentaron un aumento en la viabilidad celular de hasta un 184.44 %, por lo que el suplementar con NAC los hidrogeles con una concentración de 0.5% de *M. oleifera*, logró incrementar la viabilidad del 73.22 % al 160.05 % (Fig. 14). Debido a los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad de las células CCD-1112sk y HEK-Blue™ TGF- β , se decidió seguir con las evaluaciones pertinentes para los hidrogeles: Alg, Alg-40NAC, Alg-0.01%MO, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC.

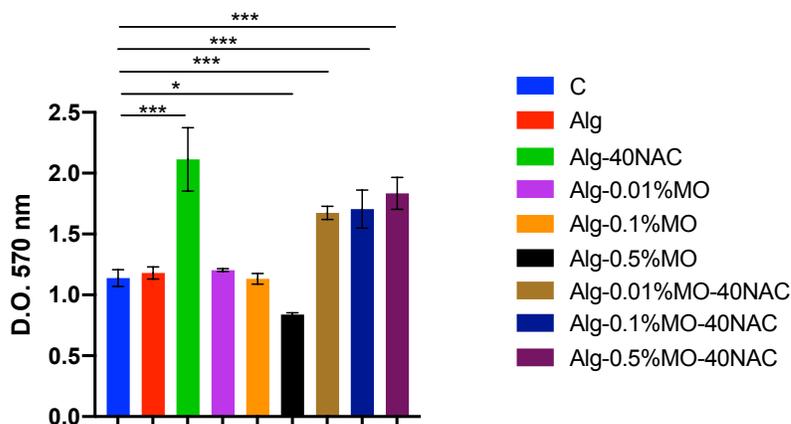


Fig. 14. Biocompatibilidad de los hidrogeles en células HEK-Blue™ TGF-β. Como control positivo (C): monocapa de células HEK-Blue™ TGF-β. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como * ($p < 0.05$), y *** ($p < 0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett con respecto al control positivo (C).

3.2.3 Prueba de hemocompatibilidad

Según la ISO-10993 para la evaluación biológica de equipos médicos en su parte 4: selección de pruebas para interacciones con sangre para biomateriales, porcentajes de hemólisis menores o iguales al 5% establecen uno de los criterios para demostrar su hemocompatibilidad. Esta prueba *in vitro* se utiliza para evaluar el daño de los eritrocitos al poner en contacto los diferentes hidrogeles que se sintetizaron con la sangre obtenida de donadores sanos durante 1 h a 37 °C.

La mayoría de los materiales evaluados resultaron ser altamente hemocompatibles al tener un porcentaje de hemólisis menor al 5 % en lo que respecta a la hemoglobina liberada de la lisis de los eritrocitos a 540 nm. La hemólisis fue mayor con los hidrogeles Alg-40NAC, sin embargo, al agregar 0.1 % de *M. oleifera* al hidrogel de NAC el porcentaje de hemólisis disminuyó de 4.56 al 1.64 % (Fig. 15) mejorando su hemocompatibilidad. No se observó un mayor efecto positivo en la disminución del porcentaje de hemólisis al aumentar la concentración a 0.5 % de *M. oleifera* (Fig. 15).

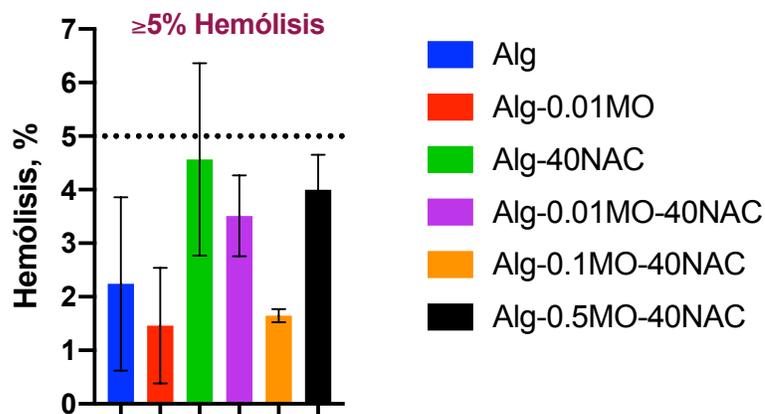


Fig. 15. Evaluación *in vitro* de la hemocompatibilidad de los hidrogeles, representada con el porcentaje de hemólisis. El ensayo se llevo a cada poniendo en contacto durante una 1 h los hidrogeles con sangre obtenida de voluntarios. PBS 1X como control positivo y agua destilada como control negativo. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3/grupo), no fueron encontradas significancias mediante un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey.

3.3 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles

3.3.1 Absorción de agua o hinchamiento

Los hidrogeles obtenidos a base de alginato de calcio suplementados con *M. oleifera* y NAC fueron evaluados con respecto a su capacidad de absorción de agua, al ser sumergidos durante 15, 30, 60 y 120 min en 2 mL de PBS 1X a 37 °C.

Los resultados obtenidos muestran que los porcentajes mas altos de absorción de aguase obtuvieron con la matriz polimérica que contenía solamente alginato y 0.01 % m/v de *M. oleifera*, es decir, Alg y Alg-0.01%MO, las cuales obtuvieron 1,652.23 y 1,818.29 %, respectivamente, después de 120 min sumergidos en agua. Los porcentajes de absorción de agua disminuyeron al añadir NAC y aumentar la concentración de *M. oleifera* en los hidrogeles, siendo 1,567.03 % para Alg-40NAC; 1,310.88 % para los hidrogeles de Alg-0.01%MO-40NAC; 1,573.10 % para Alg-0.1%MO-40NAC y 1,043.39 % para los hidrogeles a base de Alg-0.5%MO-40NAC (Fig. 16). La capacidad de absorción se mantuvo constante en todas las condiciones después de los 30 min, a lo largo del tiempo hasta 120 min.

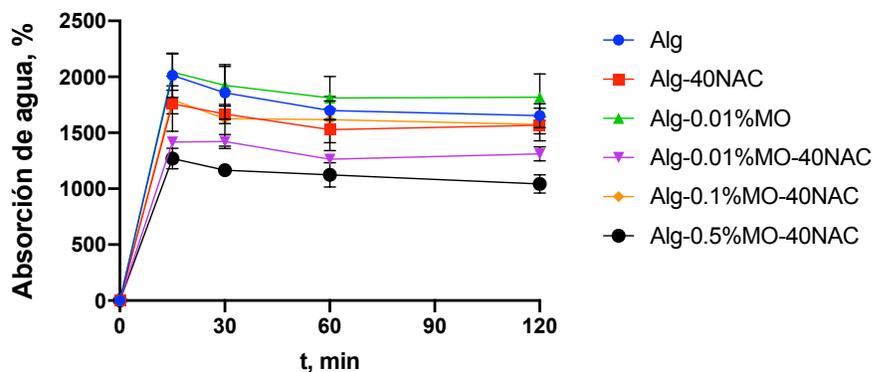
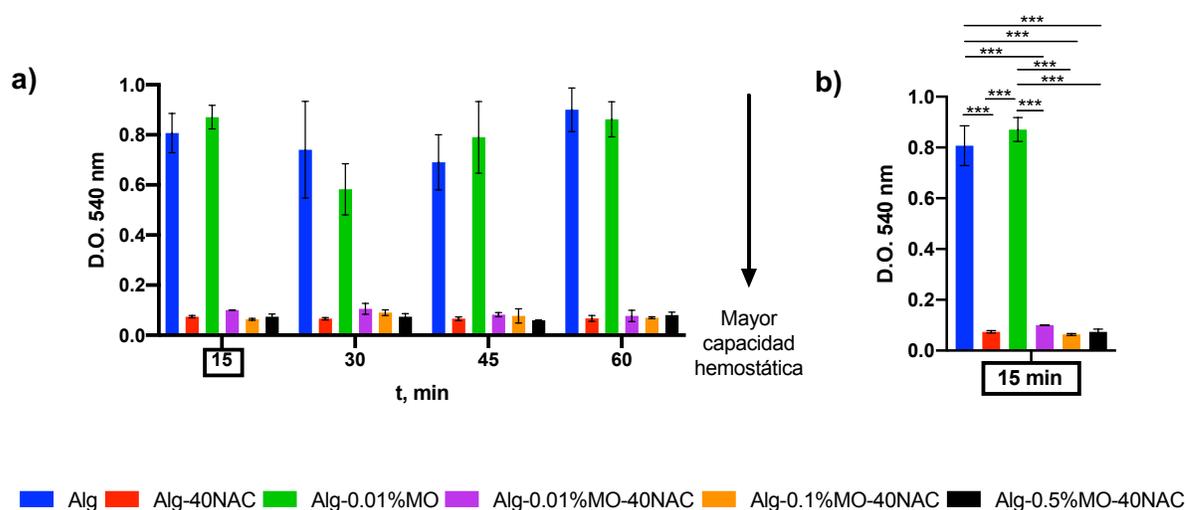


Fig. 16. Capacidad de absorción de agua de los hidrogeles de alginato suplementados con *M. oleifera* y NAC. La capacidad de absorción de agua se ve disminuida al añadir NAC y agregar las concentraciones de 0.1 y 0.5% de *M. oleifera* a los hidrogeles. Después de 30 min, la capacidad de absorción se mantuvo constante para cada tipo de hidrogel. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3/grupo).

3.3.2 Capacidad hemostática

El ensayo de coagulación sanguínea en los hidrogeles nos muestra la capacidad hemostática de los materiales. Se miden a 540 nm los glóbulos rojos hemolizados que no quedaron atrapados en el coágulo al agregar 1.5 mL de agua a los hidrogeles con sangre coagulada durante diferentes tiempos. Una mayor absorbancia se asocia a menor eficiencia hemostática de los hidrogeles en términos de tasa de coagulación.

Las lecturas mayores después de 15 min fueron 0.81 y 0.87 de correspondientes a los hidrogeles Alg y Alg-0.01%MO, respectivamente. Los hidrogeles con 40 mM NAC obtuvieron densidades ópticas mucho menores, es decir de 0.07 para los hidrogeles de Alg-40NAC; 0.10 con Alg-0.01%MO-40NAC; 0.06 con Alg-0.1%MO-40NAC y 0.07 con Alg-0.5%MO-40NAC (Fig. 17b), demostrando mayor capacidad hemostática (Fig. 17c). Los valores de hemoglobina liberada se mantuvieron constantes en los hidrogeles después de los 15 min (Fig. 17a).



c)

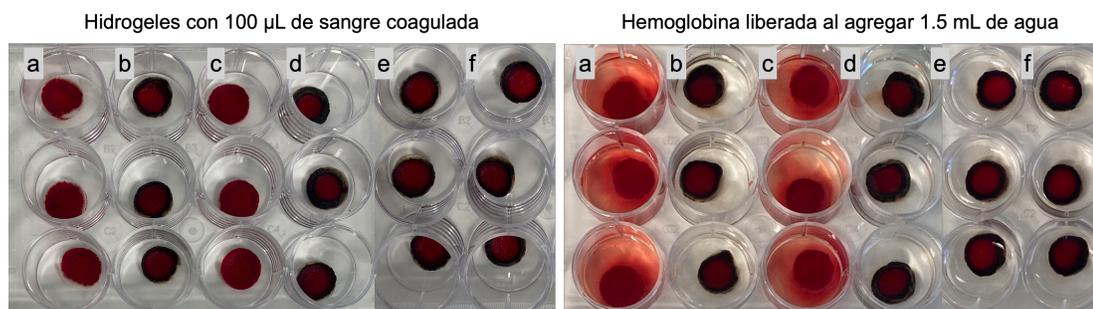


Fig. 17. Capacidad hemolítica de los hidrogel (a) perfil de coagulación de la sangre a través del tiempo (b) comparación de la capacidad hemostática a los 15 min entre los hidrogel (c) fotografías representativas de la capacidad de coagulación. Imágenes obtenidas de coagular 100 uL sangre en los hidrogel después 15 min y la hemoglobina liberada después de agregar 1.5 mL de agua a los hidrogel donde: (a) Alg, (b) Alg-40NAC, (c) Alg-0.01%MO, (d) Alg-0.01%MO-40NAC, (e) Alg-0.1%MO y (f) Alg-0.5%MO-40NAC. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3/\text{grupo}$). El nivel de significancia está denotado como *** ($p < 0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey.

3.4 Evaluación *in vitro* de las propiedades biológicas de los hidrogel

3.4.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogel

Para determinar la capacidad antioxidante de los hidrogel se pusieron contacto con el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y se midió la capacidad de nuestros hidrogel para inhibir la oxidación de este radical. Los compuestos poliméricos de la matriz de los hidrogel demostraron no inhibir los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Sin embargo, al

suplementar con 0.01 % *M. oleifera* la matriz polimérica de Alg se observó un aumento significativo en el porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} del 53.43 %. Sin embargo, los hidrogeles a base de Alg-40NAC, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC lograron inhibir al 100 % de los radicales ABTS^{•+} cuando se pusieron en contacto con la solución del compuesto oxidado (ABTS^{•+}) (Fig. 18).

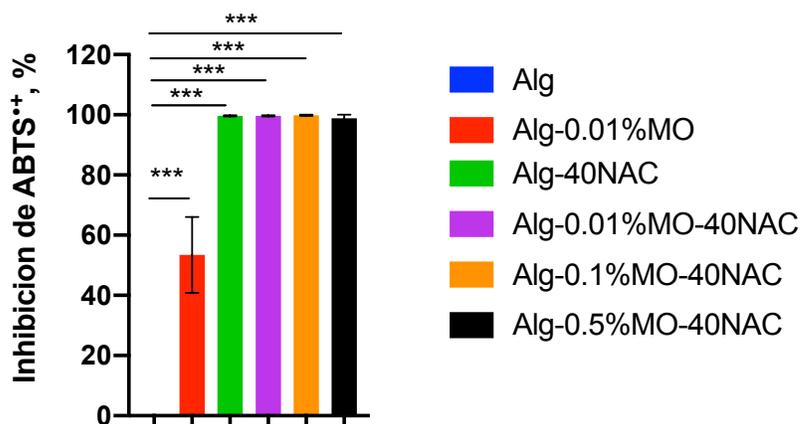


Fig. 18. Actividad antioxidante expresada en porcentaje de inhibición de ABTS^{•+}. Como referencia, se comparan todas las condiciones con la matriz polimérica Alg. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como *** ($p < 0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett.

3.4.2 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria con respecto a la remoción de NO[•]

Se evaluó el porcentaje de remoción de óxido nítrico (NO[•]) asociado al potencial de actividad antiinflamatoria de los hidrogeles con un donador de NO[•]. Los hidrogeles a base de Alg-40NAC, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC, removieron el NO[•] del medio entre un 68 – 73 %, demostrando potencial de actividad anti-inflamatoria. El aumento en el porcentaje de remoción de NO[•] en el hidrogel Alg-0.01%MO, suplementado solamente con *M. oleifera* sin NAC, no fue significativo, así como tampoco el hidrogel a base de solamente alginato (Alg), es decir, sin adición de NAC o *M. oleifera* (Fig. 19).

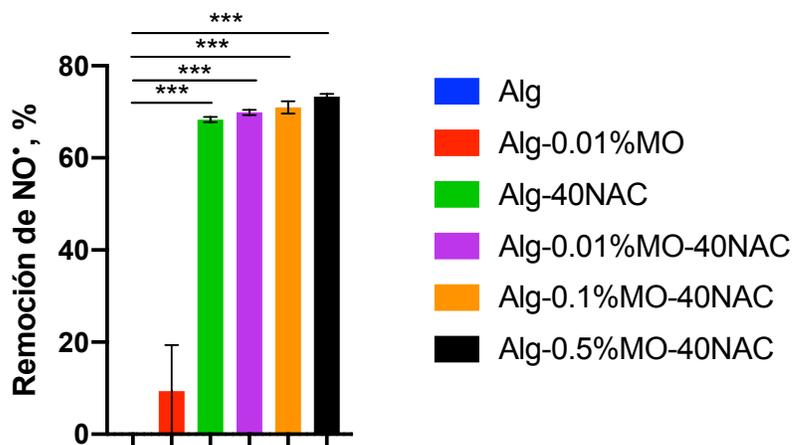


Fig. 19 Actividad anti-inflamatoria relacionada al porcentaje de remoción del radical oxido nítrico (NO[•]). Se comparan todas las condiciones con la matriz polimérica a base de alginato (Alg), sin adición de los compuestos activos NAC o *M. oleifera*. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como *** ($p<0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett.

3.4.3 Evaluación del efecto neutralizante del TGF- β de los hidrogeles

El análisis del efecto neutralizante del TGF- β de los hidrogeles se llevó a cabo según establecía el protocolo del fabricante en las células HEK-Blue[™] TGF- β , con el reactivo colorimétrico QUANTI-Blue[™]. No se encontró un efecto neutralizante en ninguno de los tratamientos con los hidrogeles cuando se estimularon las células con TGF- β (Fig. 20a). Sin embargo, al evaluar la neutralización en células con niveles basales TGF- β con los hidrogeles de Alg-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC, se obtuvieron absorbancias de 0.20, 0.24 y 0.21, respectivamente, las cuales fueron significativamente menores a 0.28, que reportaron las células control (Fig. 20b). Una disminución en la absorbancia significa una menor expresión de TGF- β de las células al analizarse con el reactivo QUANTI-Blue[™] a 655 nm.

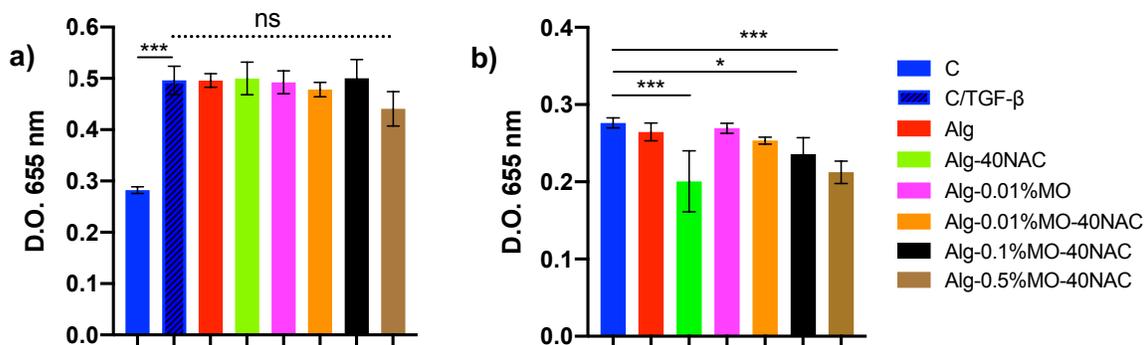


Fig. 20. Efecto neutralizante de TGF- β de los hidrogeles en a) células HEK-Blue™ TGF- β estimuladas y b) células HEK-Blue™ TGF- β sin estimular. Como controles se utilizaron la monocapa (C) y las células tratadas con 20 μ L de 10 ng/mL de TGF- β (C/ TGF- β). Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$ /grupo). El nivel de significancia esta denotado como * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$) y ns: no significativo ($p > 0.05$), en un ANOVA de una vía con una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Dunnett con respecto al control correspondiente.

3.5 Evaluación de la biocompatibilidad en fibroblastos L929

3.5.1 Pruebas de viabilidad y proliferación celular

En este ensayo se analizó la viabilidad celular de los fibroblastos L929 (~ 200,000 células por hidrogel) en presencia de los diferentes hidrogeles durante 24 h, 3, 6 y 10 días a 37 °C, 5 % CO₂. Las células tratadas con los hidrogeles Alg, Alg-40NAC, Alg-0.01%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC demostraron mejorar la viabilidad celular en un 123, 189.03, 246.26 y 256.49 %, respectivamente, en comparación con la monocapa de células, después de 24 h de cultivo (Fig. 21a).

En el ensayo de proliferación, la cantidad de células viables durante 3, 6 y 10 días se mantuvo constante en los hidrogeles de Alg, Alg-40NAC y Alg-0.01%MO-40NAC. Por el contrario, cuando las células se cultivaron con los hidrogeles de Alg-0.5%MO-40NAC se observó una disminución en la densidad óptica, relacionada con las células viables a través de los días, como se muestra en la gráfica (Fig. 21b).

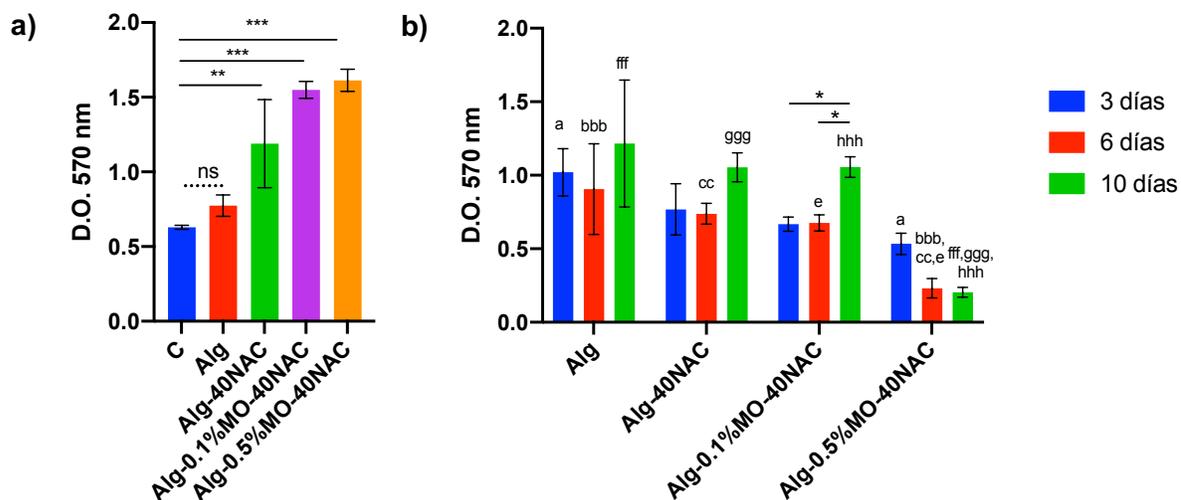


Fig. 21. Biocompatibilidad de los hidrogeles en fibroblastos L929 a) viabilidad celular y b) proliferación celular durante 10 días. Viabilidad celular de los fibroblastos L929 después de 24 h y proliferación celular durante 3,6 y 10 días en presencia de los hidrogeles. Como control positivo (C) monocapa de células L929 para evaluación de viabilidad. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3/grupo). El nivel de significancia esta denotado como *,a,e ($p<0.05$), **,cc ($p<0.01$) y, ***,bbb,fff,ggg,hhh ($p<0.001$) en un ANOVA de una vía con una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para viabilidad celular y un ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey para la proliferación celular.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se sintetizaron hidrogeles suplementados con NAC y extracto de *M. oleifera*, al añadirlos a una solución de alginato de calcio-PEGMA. El primer paso para la síntesis de los hidrogeles fue determinar las concentraciones de compuestos biactivos con los cuales se iban a suplementar los hidrogeles. Estas concentraciones debían garantizar mantener la viabilidad de las células HEK-Blue™ TGF-β, ya que se utilizó el sistema de células reportadoras HEK-Blue™ para determinar el potencial neutralizante de TGF-β (Gasperin-Bulbarela et al., 2021). Para este fin se midió la disminución de la densidad óptica a 655 nm del reactivo QUANTI-Blue™, el cual cambia a un color violeta-azul en presencia de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP). Usando el reactivo MTT, que mide indirectamente la actividad metabólica de las células vivas mediante la reducción del MTT a formazán (Kumar et al., 2018), pudimos detectar cualquier aumento o disminución en el número de células viables al ser tratadas con las diferentes concentraciones de NAC y extracto de *M. oleifera*. Las células fueron evaluadas con 0.5, 1 y 2 % m/v de *M. oleifera* (MO), estas concentraciones fueron reportadas en trabajos anteriores para mejorar las propiedades antioxidantes, inflamatoria (respecto a la capacidad de neutralización de NO*) y actividad antimicrobiana, en biomateriales usados como andamios para reparación tisular (Cárdenas Carreón, A, 2019, Rubio-Elizalde et al., 2019). Sin embargo, estas concentraciones resultaron ser citotóxicas para las células HEK-Blue, bajo nuestras condiciones de evaluación, en comparación con los fibroblastos CCD-1112sk y L929 con los que se habían evaluado por Cárdenas Carreón, A, 2019 y Rubio-Elizalde et al., 2019. Por otro lado, la citotoxicidad también pudiera ser atribuida a una diferencia entre los metabolitos encontrados en nuestro extracto como flavonoides, alcaloides, fenoles, taninos y sus derivados, debida al lote y estacionalidad de las hojas utilizadas de *M. oleifera*, sin embargo, un análisis metabólico de nuestro extracto es necesario para confirmar esta hipótesis. Con base en estos resultados, evaluamos concentraciones menores del extracto de *M. oleifera*, y encontramos que 0.01 y 0.1 % m/v de *M. oleifera* no afectaban significativamente la viabilidad de las células HEK-Blue™ TGF-β, en comparación con las que no fueron tratadas. A la par, se trataron las células HEK-Blue™ TGF-β con 20 y 40 mM de NAC, para poder determinar la concentración de NAC con la que se cargarían los hidrogeles, junto con el extracto de *M. oleifera*. Como resultado de tratar las células con NAC, observamos un aumento en la viabilidad celular de hasta un 347.82 % después de 24 h. La NAC, además, de ser un fuerte antioxidante debido su grupo tiol, actúa como precursor del antioxidante intracelular glutatión (GSH) favoreciendo su biosíntesis (Samuni et al., 2013). Se ha demostrado que un entorno nuclear reducido, proporcionado por el GSH, es necesario para la proliferación celular (Markovic et al., 2007), por lo que es plausible atribuir el incremento en la viabilidad celular a la estimulación de la biosíntesis del GSH por la NAC. Los resultados mostraron que el

extracto *M. oleifera* en su concentración mas baja, i.e. 0.01 % m/v, así como al suplementar las concentraciones más altas (0.1 y 0.5 %m/v) con 40 mM de NAC, lograron reducir la producción de TGF- β de las células estimuladas, hasta en un 29.94 %, 34.12 y 35.52 %, respectivamente, disminuyendo la D.O. a 655 nm incluso por debajo de los niveles basales de TGF- β de las células no estimulas. A la par del ensayo de neutralización, se continuó evaluando la viabilidad celular de los tipos de hidrogeles sintetizados. Encontramos que, aunque la adición de NAC a los hidrogeles aumentó hasta un 287.35 % la viabilidad celular, esto no repercutió en la capacidad neutralizante de TGF- β de los hidrogeles compuestos. Además, se eliminó por completo el efecto citotóxico de las concentraciones mas altas de *M. oleifera* (0.1 y 0.5 % m/v) al combinarlas con NAC, observándose el mismo incremento en la viabilidad celular que en las células cultivadas con solo NAC, i.e. sin extracto de *M. oleifera*. La capacidad de NAC para reducir la producción de TGF- β se debe a que NAC puede actuar como nucleófilo, teniendo la capacidad de reducir los enlaces disulfuro de la estructura proteica de TGF- β cambiando su estructura bioactiva (dímero) a la forma inactiva (monómero), lo que causa un bloqueo directo a su función y señalización celular (Meurer et al., 2005; Sugiura et al., 2009). Por otro lado, no existen estudios previos que analicen la capacidad neutralizante de TGF- β de extractos de *M. oleifera*. Sin embargo, ha sido ampliamente reportado su potencial antioxidante (Kumbhare et al., 2012), debido a esto y a el efecto neutralizante que mostró durante esta evaluación podemos hipotetizar que actúa de manera similar que la NAC, sin embargo, se requieren mas evaluaciones para conocer el mecanismo de neutralización del extracto de *M. oleifera*. De este modo pudimos atribuir la disminución de TGF- β a un potencial efecto neutralizante de nuestros hidrogeles suplementados con *M. oleifera* y NAC, y no a la muerte de las células por un efecto citotóxico de la concentración de *M. oleifera*.

Con los parámetros antes mencionados y confirmando el potencial de neutralización de TGF- β de nuestro extracto de *M. oleifera* y la NAC, se sintetizaron los hidrogeles de alginato entrecruzados con calcio y plastificados con PEGMA, a los cuales se suplementaron con 40 mM de NAC y diferentes concentraciones de *M. oleifera* (0.01, 0.1 y 0.5 % m/v). Aunque las concentraciones de 0.1 y 0.5 % m/v por si solas demostraron ser citotóxicas, se decidió evaluar estas concentraciones dentro del sistema polimérico del hidrogel de alginato de sodio-PEGMA para así poder discutir las diferencias al tratar las células con los extractos directamente y en un sistema de polimérico.

Para aplicaciones asociadas a la reparación tisular, la biocompatibilidad es una característica fundamental, ya que los hidrogeles deben servir como soporte para las células que van a sustituir al tejido dañado, a la par que se liberan los compuestos bioactivos, sin provocar efectos indeseables a las células con las que estarán en contacto (Veerasubramanian et al., 2018). Se evaluó la biocompatibilidad de los hidrogeles respecto a su hemocompatibilidad y la viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112sk y

células HEK-Blue™ TGF-β después de 24 h. Los fibroblastos, después de una lesión tisular responden a factores de crecimiento como el TGF-β y proliferan sintetizando principalmente fibras de colágeno y proteoglicanos que son componentes de la ECM. También ejercen una acción mecánica sobre el arreglo y empaquetado de colágeno para garantizar el cierre de la lesión (Tettamanti et al., 2004). Como era de esperarse, las evaluaciones de viabilidad celular de los hidrogeles que contenían NAC obtuvieron hasta un 287 % de viabilidad y eliminaron la citotoxicidad de las concentraciones de 0.1 y 0.5 % m/v de *M. oleifera*. Esto concuerda con hallazgos previos, donde NAC mostró estimular la proliferación celular de diferentes biomateriales para reparación tisular (Hou et al., 2020; Li et al., 2020; Gomez-Aparicio et al., 2021). Por otro lado, aun dentro de un sistema polimérico, los hidrogeles con 0.1 y 0.5 % *M. oleifera*, sin adición de NAC, resultaron citotóxicas. Esta respuesta respecto a la viabilidad celular se observó tanto en los fibroblastos CCD-1112sk, como en las células HEK-Blue™ TGF-β. Debido a que la viabilidad celular en los hidrogeles con Alg-0.1%MO y Alg-0.5%MO disminuyó, lo cual no es beneficioso durante el proceso de reparación tisular ya que no se lograría encaminar hacia la regeneración como se propone en este trabajo, las evaluaciones posteriores solo se realizaron en los siguientes hidrogeles: Alg, Alg-40NAC, Alg-0.01%MO, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC. Siguiendo con las evaluaciones de biocompatibilidad, se analizó la hemocompatibilidad de los materiales, con el fin de conocer si existen efectos nocivos que resulten de la interacción de los hidrogeles con células sanguíneas: eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Weber et al., 2018; Jiang et al., 2019). En este trabajo se evaluó la hemocompatibilidad específicamente respecto a la lisis de eritrocitos al estar en contacto con los hidrogeles. El porcentaje de eritrocitos lisados se determinó mediante la medición de cantidad de hemoglobina liberada a 540 nm (Ooi et al., 2019). Todos los hidrogeles sintetizados bajo las condiciones de este trabajo obtuvieron valores de hemólisis menores al 5 %, con respecto a la lisis de eritrocitos. Biomateriales con porcentajes menores o iguales al 5 % de hemólisis al estar en contacto con la sangre son considerados como altamente hemocompatibles según la ISO-10993-4 (Seyfert et al., 2002). Conocer la hemocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles es de suma importancia ya que provee información acerca del comportamiento de los eritrocitos cuando los hidrogeles se implanten en una herida, lo cual es importante para futuros análisis *in vivo*.

Uno de los requisitos para que los materiales se apliquen como hidrogeles en heridas es su capacidad de absorción de exudados. Exudado, es un término genérico que se utiliza para identificar el líquido producido a partir de heridas y que se genera como parte de la respuesta inflamatoria (Cutting, 2003). Hidrogeles con buena absorción de agua pueden absorber el exudado de la piel lesionada, lo que ayuda a que se forme un ambiente húmedo y estable para promover la regeneración de tejidos y acelerar su reparación (Cheng et al., 2018). Sin embargo, si la tasa de absorción es baja, el exudado puede acumularse,

provocando maceración de la piel y proliferación bacteriana (Dhivya et al., 2015; Shishatskaya et al., 2016). Los hidrogeles de alginato de calcio-PEGMA denominados como Alg, demostraron absorber el agua hasta 1,652.24% respecto a su peso seco después de 120 min. La capacidad de absorción de los hidrogeles de alginato se logra debido a la naturaleza hidrófila de este polímero dada por las unidades de ácido manurónico y gulurónico que lo comprenden (Dhivya et al., 2015). La absorción de agua disminuyó en hidrogeles que contenían NAC y altas concentraciones de *M. oleifera*, i.e. 0.1 y 0.5% m/v. Esto se puede atribuir a la liberación de estos compuestos al medio. El análisis de liberación de NAC en sistemas de hidrogeles demostró que ~100% de la NAC es liberado dentro de las primeras 2 a 4 h después de colocar los hidrogeles en un medio acuoso (Li et., 2019; Gomez-Aparicio, et al., 2021). Con respecto al perfil de liberación de compuestos fitoquímicos de extractos de *M. oleifera* en andamios de alginato, se reportó su liberación en un ~70% durante los primeros 30 min (Rubio-elizalde et al., 2019). Los hidrogeles sintetizados demostraron porcentajes de absorción de agua mayores que el de los apósitos comerciales para heridas: Tegaderm™ (3M), Bioclusive® (Johnson & Johnson) y Op Site (Smith & Nephew) (Yoo y Kim 2008). Además, valores de absorción entre 1200–1400% han demostrado ser adecuados para promover la hemostasia, proporcionar la humedad adecuada y facilitar actividades celulares para la reparación de los tejidos dañados (Sudheesh Kumar et al., 2010; Cheng et al., 2017; Veerasubramanian et al., 2018). Por lo tanto, todos los hidrogeles sintetizados en este trabajo exhibieron una adecuada absorción de agua para su aplicación en la reparación de tejido.

La capacidad hemostática determina la capacidad de los hidrogeles de atrapar la sangre en un coágulo dentro de su matriz, logrando así detener procesos hemorrágicos (Zhao et al., 2017). La hemostasia es parte de la primera fase de la reparación tisular, y el lograr detener una hemorragia de manera más rápida después de un daño tisular asegurará la progresión del proceso de reparación del tejido (Furie y Furie, 2005), la protección del sitio lesionado brindada por el coágulo formado, así como disminuir las probabilidades de hemorragias excesivas (Rickenbacher et al., 2009; Chen et al., 2020). Durante este ensayo se empapó por completo a los hidrogeles con sangre, y se dió inicio al proceso de coagulación al agregar CaCl_2 , para luego incubar los hidrogeles empapados con la sangre durante diferentes tiempos. Al final de cada tiempo los glóbulos rojos que no quedaron atrapados en el trombo fueron hemolizados al agregar agua destilada, dando como resultado la liberación de hemoglobina. Entre mayor la hemoglobina liberada, menor el coágulo formado y, por lo tanto, menor capacidad hemostática de los hidrogeles (Ooi et al., 2019). Hidrogeles de alginato de calcio se han utilizado como agentes hemostáticos, ya que el intercambio de iones calcio que tiene lugar cuando se pone en contacto con una herida, es capaz de activar la cascada de coagulación (Kaneda et al., 2008; Timmons, 2009). La NAC por el contrario muestra, *in vitro*, un efecto anti-agregante sobre las plaquetas humanas, y puede interferir con la actividad de los factores

de coagulación (Niemi et al., 2006; Wijesundera et al., 2009). Sin embargo, en esta evaluación los hidrogeles que fueron suplementados con NAC demostraron poseer mejor capacidad hemostática que los hidrogeles de Alg, respecto a hemoglobina liberada en agua destilada. NAC es considerado un compuesto de unión a metales, ya que posee dos sitios potenciales de unión: su grupo tiol y carboxilo (Samuni et al., 2013), una interacción entre el calcio entrecruzado dentro de la matriz de alginato con la NAC puede volverlos mas biodisponibles al contacto con la sangre, ya que sabemos que la NAC es liberada rápidamente en medios acuosos. Una mayor biodisponibilidad de iones calcio es capaz de mejorar la capacidad hemostática de los hidrogeles de alginato y contrarrestar las propiedades anti-coagulantes del NAC, ya que el Ca^{2+} es un factor crucial en la activación de la cascada de coagulación (Green, 2006; Kaneda et al., 2008).

Después de una lesión tisular, la respuesta inflamatoria es parte del proceso de reparación tisular y es necesario para el restablecimiento del tejido dañado (Julier et al., 2017). Sin embargo, estadios prolongados durante la etapa de inflamación han demostrado dificultar el proceso de reparación, aumentar la cicatrización e incluso encaminar a la formación de heridas crónicas, es decir heridas que no sanan (Archana et al., 2016; Veerasubramanian et al., 2018). El NO^* es considerado como un mediador proinflamatorio que induce inflamación por su producción excesiva en situaciones anormales (Sharma et al., 2007). Por lo tanto, evaluamos el potencial anti-inflamatorio respecto a la capacidad de remoción de NO^* de nuestros hidrogeles, utilizando SNP como donador de NO^* . El NO^* es capaz de reaccionar con el Reactivo de Griess, un compuesto colorimétrico que se puede monitorear a 540 nm, una menor absorbancia del R. Griess será una mayor capacidad de remoción de NO^* , la cual se puede asociar a la actividad inflamatoria de los hidrogeles. Los hidrogeles Alg-40NAC, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-NAC y Alg-0.5%MO-NAC demostraron porcentajes de 68.32, 69.89, 70.97 y 73.28 %, respectivamente, siendo la matriz polimérica de Alg y Alg-0.01%MO, los hidrogeles sin capacidad de remoción NO^* . La remoción del NO^* de los hidrogeles se debe a la reacción del grupo sulfhidrilo de NAC con el NO^* donado por SNP, produciendo S-nitrosotioles (Vriesman et al., 1997), dotando a los hidrogeles con potencial de actividad anti-inflamatoria, relacionada con la remoción del NO^* .

Otros factores que afectan y encaminan al proceso de reparación a la formación de cicatrices son altos niveles de especies reactivas de oxígeno, ROS, ya que promueven una mayor liberación de citocinas pro-inflamatorias y activación de las proteínas pro-apoptóticas para la posterior inducción de la muerte celular, dando lugar a una deficiente reparación y formación de cicatrices (Yang et al., 2012; Schieber et al., 2014; Dunnill et al., 2017). Propiedades antioxidantes en hidrogeles para la reparación tisular son deseables, ya que proveen a los hidrogeles con la capacidad de neutralizar las ROS. La actividad antioxidante de nuestros

hidrogeles se evaluó usando con el reactivo ABTS^{•+}, el cual en presencia de moléculas antioxidantes disminuirá su coloración verde-azul a 734 nm. Los hidrogeles Alg-40NAC, Alg-0.01%MO-40NAC, Alg-0.1%MO-NAC y Alg-0.5%MO-NAC, al estar en contacto con el ABTS^{•+} por 6 min, demostraron inhibir el ~100 % de la oxidación del reactivo. Como se mencionó antes, la capacidad antioxidante de NAC se atribuye a su grupo sulfhidrilo, el cual puede ser oxidado por una gran variedad de radicales y también servir como nucleófilo (Aldini et al., 2018; Samuni et al., 2013). Por último, el Alg-0.01%MO suplementado únicamente con *M. oleifera*, esto es sin NAC, demostró también inhibir al ABTS^{•+} en un 53.43 %. Compuestos fenólicos contenidos en extractos de diferentes plantas han demostrado ser los principales contribuyentes de su actividad antioxidante (Zhang et al., 2011; Skotti et al., 2014). Análisis de compuestos fitoquímicos realizados en diferentes extractos de *M. oleifera* han demostrado que poseen compuestos antioxidantes (Ali et al., 2004; Shahriar et al., 2012). Las propiedades biológicas como la actividad antioxidante y anti-inflamatoria han demostrado tener un papel como moduladores durante el proceso de reparación tisular, y se ha determinado que su correcto equilibrio durante los procesos de reparación tisular puede llegar a promover el proceso de regeneración mayoritariamente al de cicatrización, evitando así la aparición de cicatrices excesivas o fibrosis en el sitio lesionado (Hou et al., 2020). Es cierto que el equilibrio redox de las células es delicado y que un exceso de compuestos antioxidantes y anti-inflamatorios podrían llegar a ser perjudiciales (Dean, et al., 1997; Dunnill et al., 2017), sin embargo, basándonos en los resultados obtenidos de la viabilidad celular en los fibroblastos CCD-112sk, así como en las células HEK-Blue™ TGF-β evaluadas en este trabajo, los hidrogeles mostraron propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias seguras para las células.

Como se analizó en este trabajo, diferentes factores y moléculas orquestan la reparación tisular. El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) es una citocina que existe como tres isoformas diferentes (TGF-β1, 2 y 3) y desempeña funciones críticas en la cicatrización de heridas y la fibrosis (Pakyari et al., 2013). Además, se ha reportado que específicamente la sobreexpresión de TGF-β1 disminuye el nivel de glutatión intracelular y estimula la producción de ROS (Sugiura et al., 2009). La evaluación *in vitro* del potencial neutralizante de TGF-β de los hidrogeles se llevó a cabo mediante el sistema de células reportadoras HEK-Blue™ TGF-β y el reactivo QUANTI-Blue™. Se evaluó la acción de los hidrogeles sobre los niveles reportados de TGF-β de las células, usando medio de cultivo DMEM recuperado después de 3 horas en contacto con los hidrogeles. Sin embargo, al estimular las células con TGF-β para proveer un ambiente celular de sobreexpresión de esta citocina y tratarlos con el medio pretratado de los hidrogeles, no se observó capacidad neutralizante de los hidrogeles sintetizados con las concentraciones de NAC y *M. oleifera* que ensayos previos demostraron neutralización. Esto pudo ser debido a que la cantidad liberada de compuestos bioactivos al medio de cultivo no fue la suficiente para ejercer su actividad de

neutralización. Esta disminución en la actividad neutralizante puede deberse a los procesos fisicoquímicos que se llevaron a cabo para la síntesis de los hidrogeles y su interacción con los compuestos poliméricos. Diferencias en la actividad de neutralización al tratar directamente a las células con los compuestos bioactivos en comparación con los hidrogeles, se atribuyen a que su biodisponibilidad no es la misma al estar atrapados dentro de una matriz polimérica, sin embargo, no se esperaba que esto afectara en su totalidad su acción neutralizante. Por lo que, se decidió evaluar el tratamiento en células no estimuladas con TGF- β esto con el fin de conocer si la liberación de NAC y *M. oleifera* de los hidrogeles eran capaces de neutralizar un estado basal de producción celular de TGF- β . Durante esta evaluación, sí se observó una disminución significativa en la densidad óptica del reactivo QUANTI-Blue™ en las células tratadas con los hidrogeles Alg-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC, siendo la condición de Alg-40NAC la que tuvo absorbancias inferiores asociadas a una mayor capacidad de neutralizar TGF- β del medio extracelular. No se observó capacidad de neutralización con los hidrogeles Alg-0.1%MO, al contrario que al tratar las células con la solución de 0.1% w/v de *M. oleifera*. Lo cual sugiere que sí existe una interacción entre el(los) compuesto(s) en *M. oleifera* que neutraliza(n) TGF- β con la matriz polimérica de alginato. Los hidrogeles sintetizados en este trabajo demostraron neutralizar el TGF- β producido por células en condiciones basales, sin embargo, es necesario realizar estudios donde los hidrogeles puedan estar contacto directo con el sistema biológico reportador de TGF- β , para confirmar su capacidad de neutralización cuando existe una producción excesiva de TGF- β .

Por último, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad y proliferación celular por 3, 6 y 10 días en fibroblastos dérmicos de ratón L929, esto con el fin de saber la biocompatibilidad de los hidrogeles sintetizados para ensayos *in vivo* en un modelo murino. Conociendo las características fisicoquímicas, biológicas, su potencial neutralizante de TGF- β y su biocompatibilidad, se escogieron las siguientes condiciones: Alg, Alg-40NAC, Alg-0.1%MO-40NAC y Alg-0.5%MO-40NAC para evaluarlas con las células L929. Las pruebas de viabilidad celular mediante el reactivo MTT en las células L929 durante las primeras 24 h mostraron resultados satisfactorios, ya que ninguno de los hidrogeles evaluados resultó citotóxico. Además, como se esperaba, la viabilidad celular aumentó considerablemente en los hidrogeles con NAC, cumpliendo con la misma respuesta que en las evaluaciones que se realizaron con los fibroblastos CCD-1112sk y las células HEK-Blue™ TGF- β . Por otro lado, los resultados de la proliferación de las células viables en contacto con los hidrogeles en las condiciones de Alg y Alg-40NAC, se mantuvieron constantes a lo largo de 3, 6 y 10 días, un aumento considerable de las células viables solo se observó en los hidrogeles de Alg-0.1%MO-40NAC durante los días 6 al 10. Por el contrario, cuando se trataron las células con los hidrogeles de Alg-0.5%MO-40NAC se observaron efectos citotóxicos desde el día 3 con una disminución de la viabilidad celular en comparación con Alg. La disminución de la proliferación celular en Alg-0.5%MO-40NAC puede

atribuirse a una liberación prolonga de compuestos del extracto de *M. oleifera*, aunque se reportó la liberación en un 70 % de los compuestos fenólicos de *M. oleifera* durante los primeros 30 min en medios acuosos (Rubio-Elizalde et al., 2019), otros componentes del extracto pudieron quedar atrapados dentro de la matriz liberándose lentamente causando citotoxicidad. Por otro lado, los resultados sugieren que la NAC es liberada casi en su totalidad después de 24 h, ya que no se observó un aumento en la viabilidad celular después de 3 días, ni su efecto citoprotector con 0.5 % m/v de *M. oleifera*. Sin embargo, análisis para determinar el contenido de fitoquímico del extracto de *M. oleifera*, así como de liberación tanto de NAC y *M. oleifera* se requieren para confirmar esta hipótesis. Las evaluaciones realizadas en este trabajo muestran que los hidrogeles de alginato de calcio suplementados con NAC y *M. oleifera* poseen propiedades para promover la regeneración tisular.

Capítulo 5. Conclusiones

En los estudios realizados en este trabajo, se establecieron y analizaron diferentes concentraciones del extracto acuoso de *M. oleifera* y NAC que demostraron potencial de neutralización de TGF- β , con los que se desarrollaron hidrogeles de alginato de calcio.

Los hidrogeles compuestos con Alg-MO-NAC demostraron su biocompatibilidad al duplicar la viabilidad celular de los fibroblastos de piel humana y de ratón durante las primeras 24 h con respecto a los hidrogeles de Alg, lo que se atribuyó principalmente al efecto antioxidante de la NAC. Resultaron ser hemocompatibles respecto al porcentaje de lisis de eritrocitos, tal como lo establece la ISO 10993-4, teniendo menos del 5 % de hemólisis. Aunque todos los hidrogeles resultaron hemocompatibles, Alg-MO-NAC demostró porcentajes de hemólisis inferiores en comparación con Alg-NAC.

Durante la realización de los hidrogeles estos demostraron ser excelentes vehículos para la NAC y *M. oleifera* ya que los compuestos activos fueron capaces de liberarse de la matriz polimérica al estar en contacto con medio de cultivo y las diferentes líneas celulares. La liberación de estos compuestos bioactivos de los hidrogeles permitió la neutralización del TGF- β secretado de las células cuando no existía sobreexpresión.

Respecto a la absorción de agua los hidrogeles obtuvieron porcentajes suficientes para absorber exudados, encaminar la hemostasia y mantener una húmeda herida para su correcta reparación. Derivado de la reacción entre el calcio del alginato con el grupo sulfhidrilo de NAC, permitieron que los hidrogeles Alg-MO-NAC formaran más rápidamente y mantuvieran un coágulo sanguíneo estable.

Tanto la NAC como *M. oleifera* proveyeron capacidad de eliminar radicales libres asociada a la actividad antioxidante a los hidrogeles. Los hidrogeles de Alg-MO-NAC demostraron mayor actividad antioxidante con respecto a los de Alg-MO, con base al porcentaje de inhibición de ABTS^{**}. Los hidrogeles Alg-MO-NAC obtuvieron porcentajes de remoción del radical óxido nítrico de hasta el 73 %, lo que se asociada a propiedades anti-inflamatorias.

En este trabajo se obtuvieron hidrogeles de alginato de calcio con actividad antioxidante, anti-inflamatoria y neutralizante de TGF- β , los cuales demostraron ser biocompatibles y poseer propiedades fisicoquímicas como absorción de agua y capacidad hemostática. Por lo tanto, los biomateriales fabricados demostraron su potencial para su aplicación en regeneración tisular y para futuras evaluaciones *in vivo*.

Literatura citada

- Aktunc, E., Ozacmak, V. H., Ozacmak, H. S., Barut, F., Buyukates, M., Kandemir, O., Demircan, N. 2010. N-acetyl cysteine promotes angiogenesis and clearance of free oxygen radicals, thus improving wound healing in an alloxan-induced diabetic mouse model of incisional wound. *Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology*, 35(8), 902-909.
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., Sergio, F. 2018. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, 52(7), 751–762.
- Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Curto, R. B. L., Rosa, E. A., Turco, V. L., Giuffrida, A., Crea, F., Timpo, G. M. 2010. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.
- Annabi, N., Tamayol, A., Uquillas, J. A., Akbari, M., Bertassoni, L. E., Cha, C., Camci-Unal, G., Dokmeci, M. R., Peppas, N. A., Khademhosseini, A. 2014. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 26(1), 85-124.
- Anumolu, S. S., Menjoge, A. R., Deshmukh, M., Gerecke, D., Stein, S., Laskin, J., Sinko, P. J. 2011. Doxycycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries. *Biomaterials*, 32(4), 1204–1217.
- Aramwit, P. 2016. 1 - Introduction to biomaterials for wound healing. En M. S. Ågren (Ed.), *Wound Healing Biomaterials*. Woodhead Publishing, pp. 3-38.
- Archana, D., Dutta, P.K., Dutta, J. 2016. Chitosan: a potential therapeutic dressing material for wound healing. En: K.P. Dutta (Ed.), *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*, Springer, India, New Delhi. pp. 193–227.
- Atala, A., Irvine, D. J., Moses, M., Shaunak, S. 2010. Wound healing versus regeneration: Role of the tissue environment in regenerative medicine. *MRS Bulletin*, 35(8), 597–606.
- Ates, B., Abraham, L., Ercal, N. 2008. Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radical Research*, 42(4), 372-377.
- Augst, A. D., Kong, H. J., Mooney, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623-633.
- Azevedo, Í. M., Araújo-Filho, I., Teixeira, M. M. A., Moreira, M. D. F. D. C., Medeiros, A. C. 2018. Wound healing of diabetic rats treated with *Moringa oleifera* extract 1. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 33, 799-805.
- Babu, M., Diegelmann, R., and Oliver, N. 1992. Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-beta. *Journal of Investigative Dermatology*, 99, 650.

- Bozukova, D., Pagnouille, C., De Pauw-Gillet, M. C., Desbief, S., Lazzaroni, R., Ruth, N., Jérôme, R., Jérôme, C. 2007. Improved performances of intraocular lenses by poly(ethylene glycol) chemical coatings. *Biomacromolecules*, 8(8), 2379–2387.
- Broughton, G, Janis, J.E., Attinger, C.E. 2006. The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7 suppl): 12S – 34S.
- Bu, Y., Zhang, L., Liu, J., Zhang, L., Li, T., Shen, H., Wang, X., Yang, F., Tang, P., Wu, D. 2016. Synthesis and Properties of Hemostatic and Bacteria-Responsive in Situ Hydrogels for Emergency Treatment in Critical Situations. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(20), 12674–12683.
- Cardenas Carreon, A.A. 2019. Desarrollo y evaluación *in vitro* de andamios a base de colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 91 pp.
- Catanzano, O., D’Esposito, V., Formisano, P., Boateng, J. S., Quaglia, F. 2018. Composite Alginate-Hyaluronan Sponges for the Delivery of Tranexamic Acid in Postextractive Alveolar Wounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(2), 654–661.
- Cetin, D., Kahraman, A. S., Gumusderelioglu, M. 2012. Novel pHEMA-gelatin SPHs as bone scaffolds in dynamic cultures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2803–2812.
- Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. 2002. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2(2), 67–77.
- Chen, Y., L. Yan, Yuan, T., Zhang Q., Fan, H. 2011. Asymmetric polyurethane membrane with in situ-generated nano-TiO₂ as wound dressing. *J. Appl. Polym. Sci.*, 119, 1532–1541
- Chen, Y., Wu, L., Li, P., Hao, X., Yang, X., Xi, G., Liu, W., Feng, Y., He, H., Shi, C. 2020. Polysaccharide Based Hemostatic Strategy for Ultrarapid Hemostasis. *Macromolecular Bioscience*, 20(4), 1900370.
- Chen, Y., Yan, L., Yuan, T., Zhang, Q., & Fan, H. 2011. Asymmetric polyurethane membrane with in situ-generated nano-TiO₂ as wound dressing. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(3), 1532-1541.
- Cheng, F., Liu, C., Wei, X., Yan, T., Li, H., He, J., Huang, Y. 2017. Preparation and Characterization of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO)-Oxidized Cellulose Nanocrystal/Alginate Biodegradable Composite Dressing for Hemostasis Applications Feng, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 5, 3819–1699.
- Chin, C. Y., Jalil, J., Ng, P. Y., Ng, S. F. 2018. Development and formulation of Moringa oleifera standardised leaf extract film dressing for wound healing application. *Journal of ethnopharmacology*, 212, 188-199.
- Chin, G. S., Liu, W., Peled, Z., Lee, T. Y., Steinbrech, D. S., Hsu, M., Longaker, M. T. 2001. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 108, 423.

- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., Cory, J. G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*, 3(7), 207-212.
- Cutting, K.F. 2003. Wound exudate: composition and functions. *British Journal of Community Nursing*, 8(Sup3), S4–S9.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. 1997. Biochemistry and Pathology of Radical-Mediated Protein Oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., Georgopoulos, N. T. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96.
- Ehrlich, H. P., Krummel, T. M. 1996. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound repair and regeneration*, 4(2), 203-210.
- Ehterami, A., Salehi, M., Farzamfar, S., Samadian, H., Vaez, A., Ghorbani, S., Ai, J., Sahrapeyma, H. 2019. Chitosan/alginate hydrogels containing Alpha-tocopherol for wound healing in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 204–213.
- Eming, S. A., Krieg, T., Davidson, J. M. 2007. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525.
- Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N., Anseth, K. S. 2009. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*, 30(35), 6702–6707.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), 1736-1743.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P. A., Li, L. 2007. Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(10), 2456–2462.
- Fernández-Colino, A., Iop, L., Ventura Ferreira, M. S., Mela, P. 2019. Fibrosis in tissue engineering and regenerative medicine: treat or trigger? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 17–36.
- Frank, S., Madlener, M., Werner, S. 1996. Transforming growth factors β 1, β 2, and β 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10188–10193.
- Frankel, E. N. 1997. Nutritional benefits of flavonoids. In *Food Factors for Cancer Prevention* (pp. 613-616). Springer, Tokyo.

- Fuglie, L. J. 2001. The miracle tree: The multiple attributes of Moringa. Church World Service, West Africa Regional Office.
- Furie, B., Furie, B. C. 2005. Thrombus formation in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3355-3362.
- Gasaly, N., Riveros, K., Gotteland, M. 2020. Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 317-327
- Geng, H., Dai, J., Li, J., Di, Z., Liu, X. 2016. Antibacterial ability and hemocompatibility of graphene functionalized germanium. *Scientific Reports*, 6, 1–9.
- Gilbert, R., Vickaryous, M., Vilorio-Petit, A. 2016. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Journal of Developmental Biology*, 4(2), 21.
- Goldman, R. 2004. Growth factors and chronic wound healing: past, present and future. *Advances in Skin and Wound Care*, 17, 24 – 35
- Gomez-Aparicio, L. S., Bernáldez-Sarabia, J., Camacho-Villegas, T. A., Lugo-Fabres, P. H., Díaz-Martínez, N. E., Padilla-Camberos, E., Licea-Navarro, A., Castro-Ceseña, A. B. 2021. Improvement of the wound healing properties of hydrogels with N-acetylcysteine through their modification with methacrylate-containing polymers. *Biomaterials Science*, 9(3), 726-744.
- Gordillo G.M. y Sen C.K. 2003. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 186, 259–63.
- Green, D. 2006. Coagulation cascade. *Hemodialysis International*, 10(S2), S2-S4.
- Greenhalgh DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1019 – 1030
Falanga V. 2004 The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 32, 88–94
- Hall, M. C., Young, D. A., Waters, J. G., Rowan, A. D., Chantry, A., Edwards, D. R., and Clark, I. M. 2003. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 10304
- Hart, J. 2002 Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal Wound Care*, 11, 205–209.
- Heldin, C. H., Moustakas, A. 2012. Role of Smads in TGF β signaling. *Cell and tissue research*, 347(1), 21-36.
- Hou, J., Chen, L., Zhou, M., Li, J., Liu, J., Fang, H., Zeng, Y., Sun, J., Wang, Z. 2020. Multi-layered polyamide/collagen scaffolds with topical sustained release of N-Acetylcysteine for promoting wound healing. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1349–1361.

- Howes, E. L., Sooy, J. W., Harvey, S. C. 1929. The healing of wounds as determined by their tensile strength. *Journal of the American Medical Association*, 92(1), 42-45
- Jaipan, P., Nguyen, A., Narayan, R. J. 2017. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications*, 7(3), 416–426.
- Jespersen, J. 1988. Pathophysiology and clinical aspects of fibrinolysis and inhibition of coagulation. Experimental and clinical studies with special reference to women on oral contraceptives and selected groups of thrombosis prone patients. *Danish Medical Bulletin*, 35, 1–33.
- Jiang, Y., Li, Y., Richard, C., Scherman, D., Liu, Y., Jiang, Y., Li, Y., Richard, C., Scherman, D., Liu, Y. 2019. Materials Chemistry B Materials for biology and medicine Hemocompatibility Investigation and Improvement of Near-Infrared persistent luminescence nanoparticle ZnGa₂O₄:Cr³⁺ by Surface PEGylation. *J. Mater. Chem. B*, 7(24), 3796–3803.
- Julier, Z., Park, A. J., Briquez, P. S., Martino, M. M. 2017. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia*, 53, 13–28.
- Kaneda, K., Kuroda, S., Goto, N., Sato, D., Ohya, K., Kasugai, S. 2008. Is Sodium Alginate an Alternative Hemostatic Material in the Tooth Extraction Socket? *Journal of Oral Tissue Engineering*, 5(3), 127-133.
- Karri, V. V. S. R., Kuppusamy, G., Talluri, S. V., Mannemala, S. S., Kollipara, R., Wadhvani, A. D., Malayandi, R. 2016. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1519–1529.
- Kavoosi, G., Amirghofran, Z. 2017. Chemical composition, radical scavenging and anti-oxidant capacity of *Ocimum Basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 189–199.
- Kim, J. O., Park, J. K., Kim, J. H., Jin, S. G., Yong, C. S., Li, D. X., Choi, H.-G. 2008. Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gelmatrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1–2), 79–86.
- Kim, P., Yuan, A., Nam, K. H., Jiao, A., Kim, D. H. 2014. Fabrication of poly(ethylene glycol): Gelatin methacrylate composite nanostructures with tunable stiffness and degradation for vascular tissue engineering. *Biofabrication*, 6(2). 024112.
- Kovacs, E. J. 1991. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today*, 12, 17.
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D. 2018. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471.
- Kumbhare, M., Guleha, V., Sivakumar, T. 2012. Estimation of total phenolic content, cytotoxicity and in-vitro antioxidant activity of stem bark of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 144–150.

- Langer, R., Vacanti, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- Lawrence, W.T. Physiology of the acute wound. *Clinics in Plastic Surgery*, 25, 321 – 340.
- Lee, K. Y., Mooney, D. J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126.
- Li, J. 2004. Polymeric hydrogels. En: Teoh S. H. (Ed.), *Engineering Materials for Biomedical Applications*. World Scientific Pub: New Jersey. pp. 7-1-7–14.
- Li, J., Zhou, C., Luo, C., Qian, B., Liu, S., Zeng, Y., Hou, J., Deng, B., Sun, Y., Yang, J., Yuan, Q., Zhong, A., Wang, J., Sun, J., Wang, Z. 2019. N-acetyl cysteine-loaded graphene oxide-collagen hybrid membrane for scarless wound healing. *Theranostics*, 9(20), 5839–5853.
- Lin, C. H., Lin, K. F., Mar, K., Lee, S. Y., Lin, Y. M. 2016. Antioxidant N-Acetylcysteine and glutathione increase the viability and proliferation of MG63 cells encapsulated in the gelatin methacrylate/VA-086/blue light hydrogel system. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(8), 792-800.
- Lin, S.Y., Chen, K.S., Run-Chu, L. 2001. Design and evaluation of drug- loaded wound dressing having thermo responsive, adhesive, absorptive, and easy peeling properties. *Biomaterials*, 22, 2999 – 3004.
- Lowman, A. M., Peppas, N. A. 1999. Hydrogels. En: Mathiowitz E. (Ed.) *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Wiley: New York. pp. 397–418.
- Lu, L., Saulis, A. S., Liu, W. R., Roy, N. K., Chao, J. D., Ledbetter, S., Mustoe, T. A. 2005. The temporal effects of anti-TGF- β 1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *Journal of the American College of Surgeons*, 201(3), 391-397.
- Maeda, M., Kojima, S., Sugiyama, T., Jin, D., Takai, S., Oku, H., Kohmoto, R., Ueki, M., Ikeda, T. 2017. Effects of gelatin hydrogel containing anti-transforming growth factor- β antibody in a canine filtration surgery model. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 985.
- Martin, P., Parkhurst, S.M. 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, 131, 3021–34.
- Matrisian, L. M. 1990. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*, 6, 121–125.
- McCormick, L. L., Zhang, Y., Tootell, E., Gilliam, A. C. 1999. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *Journal of Immunology*, 163(10), 5693–5699.
- Mehendale, F.M.P., Martin, P. The cellular and molecular events of wound healing. In: Falanga V, ed. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001: 15–37.

- Monteiro, N., Thirvikraman, G., Athirasala, A., Tahayeri, A., França, C. M., Ferracane, J. L., Bertassoni, L. E. 2018. Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dental Materials*, 34(3), 389–399.
- Moseley, R., Stewart, J.E., Stephens, P., Waddington, R.J., Thomas, D.W. 2004. Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: lessons learned from other inflammatory diseases? *British Journal of Dermatology*, 150, 401–13.
- Nicolai, J., Rakhorst, G., 2008. Introduction. In: Rakhorst, G., Ploeg, R. (Eds.), *Biomaterials in Modern Medicine: The Groningen Perspective*. World Scientific Publishing Co., Inc, New Jersey, USA.
- Niemi, T. T., Munsterhjelm, E., Pöyhiä, R., Hynninen, M. S., Salmenperä, M. T. 2006. The effect of N-acetylcysteine on blood coagulation and platelet function in patients undergoing open repair of abdominal aortic aneurysm. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 17(1), 29–34.
- Ning, Z., Tan, B., Chen, B., Lau, D. S. A., Wong, T. M., Sun, T., Peng, S., Li, Z., Lu, W. W. 2019. Precisely Controlled Delivery of Abaloparatide through Injectable Hydrogel to Promote Bone Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1900020.
- Nocca, G., D'Antò, V., Desiderio, C., Rossetti, D. V., Valletta, R., Baquala, A. M., Schweickl, H., Lupi, A., Rengo, S., Spagnuolo, G. 2010. N-acetyl cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. *Biomaterials*, 31(9), 2508–2516.
- Oguz, A., Uslukaya, O., Alabalik, U., Turkoglu, A., Kapan, M., Bozdog, Z. 2015. Topical N-acetylcysteine improves wound healing comparable to dexpanthenol: An experimental study. *International Surgery*, 100(4), 656–661.
- Ooi, C. H., Ling, Y. P., Abdullah, W. Z., Mustafa, A. Z., Pung, S. Y., Yeoh, F. Y. 2019. Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(4).
- Pamfil, D., Vasile, C., Tarțâu, L., Vereștiuc, L., Poiată, A. 2017. PH-Responsive 2-hydroxyethyl methacrylate/citraconic anhydride-modified collagen hydrogels as ciprofloxacin carriers for wound dressings. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 32(4), 355–381.
- Parwani, L., Bhatnagar, M., Bhatnagar, A., Sharma, V., Sharma, V. 2016. Evaluation of *Moringa oleifera* seed biopolymer-PVA composite hydrogel in wound healing dressing. *Iranian Polymer Journal*, 25, 919–931.
- Pasparakis, G., Bouropoulos, N., 2006. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 323(1-2), 34–42.
- Pool, J. G. 1997. Normal hemostatic mechanisms: a review. *American Journal of Medical Technology*, 43, 776–780.

- Roberts, A. B. 1998. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Mineral Electrolyte Metabolism*, 24, 111–119.
- Robson, M. C., Steed, D. L., Franz, M. G, 2001. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38, 72 – 140
- Rojewska, A., Karewicz, A., Boczkaja, K., Wolski, K., Kępczyński, M., Zapotoczny, S., Nowakowska, M. (2017). Modified bionanocellulose for bioactive wound-healing dressing. *European Polymer Journal*, 96, 200–209.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., Castro-Ceseña, A. B. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455–467.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., Berk, M. 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(8), 4117–4129.
- Santos, A. F., Argolo, A. C., Paiva, P. M., & Coelho, L. C. 2012. Antioxidant activity of Moringa oleifera tissue extracts. *Phytotherapy Research*, 26(9), 1366-1370.
- Schieber, M., Chandel, N. S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), 453–462.
- Seyfert, U. T., Biehl, V., Schenk, J. 2002. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*, 19(2–6), 91–96.
- Shah, M., Foreman, D. M., & Ferguson, M. W. (1994). Neutralising antibody to TGF-beta 1, 2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *Journal of Cell Science*, 107(5), 1137-1157.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259
- Shirahama, H., Lee, B. H., Tan, L. P., Cho, N. J. 2016. Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis. *Scientific Reports*, 6, 31036–31036.
- Shishatskaya, E. I., Nikolaeva, E. D., Vinogradova, O. N., Volova, T.G. 2016. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(11), 165.
- Singer, A. J., Clark, R. A. F. 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 738–746.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46–54.

- Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A. 2009. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 21(32–33), 3307–3329.
- Snyder, R. J., Lantis, J., Kirsner, R. S., Shah, V., Molyneaux, M., Carter, M. J. 2016. Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair and Regeneration*, 24(4), 613–629.
- Soneja, A., Drews, M., Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57, 108.
- Sudheesh Kumar, P. T., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S. V, Tamura, H., Jayakumar, R. 2010. Preparation and characterization of novel b-chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 80, 761–767.
- Sugiura, H., Ichikawa, T., Liu, X., Kobayashi, T., Wang, X. Q., Kawasaki, S., Togo, S., Kamio, K., Mao, L., Ann, Y., Ichinose, M., Rennard, S. I. 2009. N-acetyl-l-cysteine inhibits TGF- β 1-induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 22(6), 487–491.
- Sultana, N., Khan, T. H. 2013. Water Absorption and Diffusion Characteristics of Nanohydroxyapatite (nHA) and Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-) Based Composite Tissue Engineering Scaffolds and Nonporous Thin Films. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 479109. doi:10.1155/2013/479109
- Tsai, M. L., Huang, H. P., Hsu, J. D., Lai, Y. R., Hsiao, Y. P., Lu, F. J., Chang, H. R. 2014. Topical N-Acetylcysteine Accelerates Wound Healing in Vitro and in Vivo via the PKC/Stat3 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 7563–7578.
- Vacanti, J. P., Langer, R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*, 354, S32–S34.
- Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Kanikireddy, V., Toro, C., & Sadiku, E. R. (2020). Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116025.
- Vargas Barona, A. 2020. Fabricación de andamios a base de alginato plastificado para la entrega de compuestos bioactivos de *M. oleifera* y N-acetilcisteína (NAC) para cicatrización de heridas. Tesis de Licenciatura en ingeniería en nanotecnología. Universidad Tecnológica Emiliano Zapata del Estado de Morelos. 108 pp.
- Veerasubramanian, P. K., Thangavel, P., Kannan, R., Chakraborty, S., Ramachandran, B., Suguna, L., Muthuvijayan, V. 2018. Corrigendum to “An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with Avena sativa extracts for diabetic wound healing” [*Colloids Surf. B Biointerfaces* 165 (2018) 92–102] (S0927776518300973) (10.1016/j.colsurfb.2018.02.022)). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 319. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.038
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. 2009. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528.

- Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196-2201.
- Vriesman, M. F., Haenen, G. R. M. M., Westerveld, G.-J., Paquay, J. B. G., Voss H.-P., Bast, A. 1997. A method for measuring nitric oxide radical scavenging activity. Scavenging properties of sulfur-containing compounds. *Pharmacy World and Science Journal*, 19, 283–286.
- Wakefield, L.M., Roberts, A.B. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 1: 22–29, 2002.
- Werner, S., Grose, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835-870.
- Whitby, D. J., Ferguson, M. W. 1991. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development*, 112(2), 651-668.
- Wichterle, O., Lim, D. 1960. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706), 117–118.
- Wijeyesundera, D. N., Karkouti, K., Rao, V., Granton, J. T., Chan, C. T., Raban, R., Carroll, J., Poonawala, H., Beattie, W. S. 2009. N-acetylcysteine is associated with increased blood loss and blood product utilization during cardiac surgery. *Critical Care Medicine*, 37(6), 1929-1934
- Yahyouche, A., Zhidao, X., Czernuszka, J. T., Clover, A. J. P. 2011. Macrophage-mediated degradation of crosslinked collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 7(1), 278–286.
- Yamada, M., Ishihara, K., Ogawa, T., Sakurai, K. 2011. The inhibition of infection by wound pathogens on scaffold in tissue-forming process using N-acetyl cysteine. *Biomaterials*, 32(33), 8474–8485.
- Yamada, M., Ogawa, T. 2009. Chemodynamics underlying N-acetyl cysteine-mediated bone cement monomer detoxification. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 2963–2973.
- Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., Karakhanova, S. 2012. Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249–270.
- Yannas, I. V. 2009. Principles of skin regeneration. En: D. P. Orgill y C. Blanco (Eds.), *Biomaterials for Treating Skin Loss*. Woodhead Publishing Limited:England (1st ed.). pp. 212-230.
- Yoo, H. J. y Kim, H. D. 2008. Characteristics of waterborne polyurethane/poly (N-vinylpyrrolidone) composite films for wound-healing dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 331–338.
- Zhao, X., Wu, H., Guo, B., Dong, R., Qiu, Y., Ma, P. X. 2017. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 122, 34–47.