

# DESARROLLO DE HIDROGELES FUNCIONALIZADOS CON EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS PERUANAS PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS CRÓNICAS EN PACIENTES DIABÉTICOS

Grupo 1  
Biomateriales  
2025.1

# Contexto

- La diabetes mellitus afecta al 4-5% de la población peruana, y es la 6ta causa de muerte nacional. [1,2].
- Las úlceras de pie diabético son la principal causa de amputación no traumática [3]
- Los pacientes presentan un 25% de riesgo total de sufrir una úlcera en el pie de por vida. [4]
- Las úlceras:
  - Proceso de cicatrización lento
  - Tiende a infectarse por la hiperglucemia en los alrededores.



[1] Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú. Unidad I - Tema 1: Epidemiología de la diabetes. [Internet]. 2022. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2022/01/Unidad-I-Tema-1-Epidemiologia-de-la-diabetes\\_pub.pdf](https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2022/01/Unidad-I-Tema-1-Epidemiologia-de-la-diabetes_pub.pdf)

[2] Villena Chávez J. Diabetes mellitus en el Perú: impacto sobre la salud. Recomendaciones para prevención y atención integral. [Internet]. 2022. Disponible en: <https://anmperu.org.pe/sites/default/files/4.%20Rev%20Diabetes%20Mellitus%20ANM.pdf>

[3] Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. N Engl J Med. 2017;376(24):2367-2375. doi:10.1056/NEJMra1615439. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1615439>

[4] Yovera-Aldana M, Sáenz-Bustamante S, Quispe-Landeo Y, Agüero-Zamora R, Salcedo J, Sarria C, Gonzales-Grandez N, Briceño-Alvarado M, Antezana-Román A, Manrique H, Armstrong DG. Nationwide prevalence and clinical characteristics of inpatient diabetic foot complications: A Peruvian multicenter study. Prim Care Diabetes. 2021;15(3):480-487. <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2021.02.009>

# Antecedentes

## HIDROGELES [8]

- Pueden ser diseñados con propósito multifuncional a modo que sean:
  - Antibacterianos
  - Antioxidantes
  - Angiogénicos
  - Inteligentes

## EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES [9]

- Plantas que demuestran propiedades:
  - Antibacterianas
  - Antioxidantes
  - Cicatrizantes

Tipo de Hidrogel	Matriz Principal	Componente(s) Funcional(es)
Antibacterianos	Chitosan	Antibacterianos naturales (chitosan)
	Pluronic F-127	AgNPs (plata nanoparticulada)
	Polivinil alcohol (PVA)	Sulfadiazina de plata
	Polisacáridos (Chitosan/Alginate)	Propiedades antibacterianas y cicatrizantes
	Grafeno	Partículas de plástico
	Fibroina de seda	Insulina liberada controladamente
Antioxidantes	No especificado	Nanoenzimas y agentes bactericidas
	Quitosano / alginato	Antioxidantes naturales
	Óxido de grafeno reducido	Captura de ROS (especies reactivas de oxígeno)
Pro-Angiogénicos	-	Ácidos nucleicos tetraédricos (TNA)
	Gelatina	Deferoxamina (DFO)
	Bioglass + Hidrogel bioactivo	Deferoxamina (DFO)
	Pluronic F-127	Células madre derivadas de tejido adiposo
Inteligentes	Carbomer 940	Factor de crecimiento ácido fibroblástico (rh-aFGF)
	Pluronic F127	Insulina + e-polilisina + MnO <sub>2</sub>
	Hidrogeles sensibles NIR	Antibióticos liberados por estímulo de luz
	Carragenina + Judia Garrofón + Arándano	Detección de infección por cambio de color
Con células madre	Materiales pH-responsivos	Liberación controlada de antibióticos por pH
	Ácido Hialurónico	Células madre
	Gelatina (microcryogeles)	Células madre
	Fibrina-collágeno	Fracción estromal vascular

[8] Gao D, Zhang Y, Bowers DT, Liu W, Ma M. Functional hydrogels for diabetic wound management. *APL Bioeng.* 2021;5(3):031503. Disponible en: <https://doi.org/10.1063/5.0046682>

[9] Mejía Benavides JE, Jiménez-García SN. Extractos de plantas como tratamientos complementarios en el proceso de cicatrización de heridas de pie diabético. *ACC CIETNA: Rev Esc Enferm.* 2023;10(1). Disponible en: <https://revistas.usat.edu.pe/index.php/cietna/article/view/931/1703?download=pdf>

[10] Vargas-Arana G, Rengifo-Salgado E, Simirgiotis MJ. Antidiabetic potential of medicinal plants from the Peruvian Amazon: A review. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2023;22(3):277-300. doi:10.37360/blacpm.23.22.3.21. Disponible en: <https://blacpm.ms-editions.cl/index.php/blacpm/article/download/339/347/679>

# Propuesta de solución

Desarrollo de un hidrogel de gelatina metacrilada y quitosano, entrecruzado con genipina, que encapsula extractos de plantas peruanas como *Centella asiatica* y *Croton lechleri*

- Modulación de inflamación
- Modulación de estrés oxidativo
- Antibacteriano
- Estimulación de la regeneración tisular



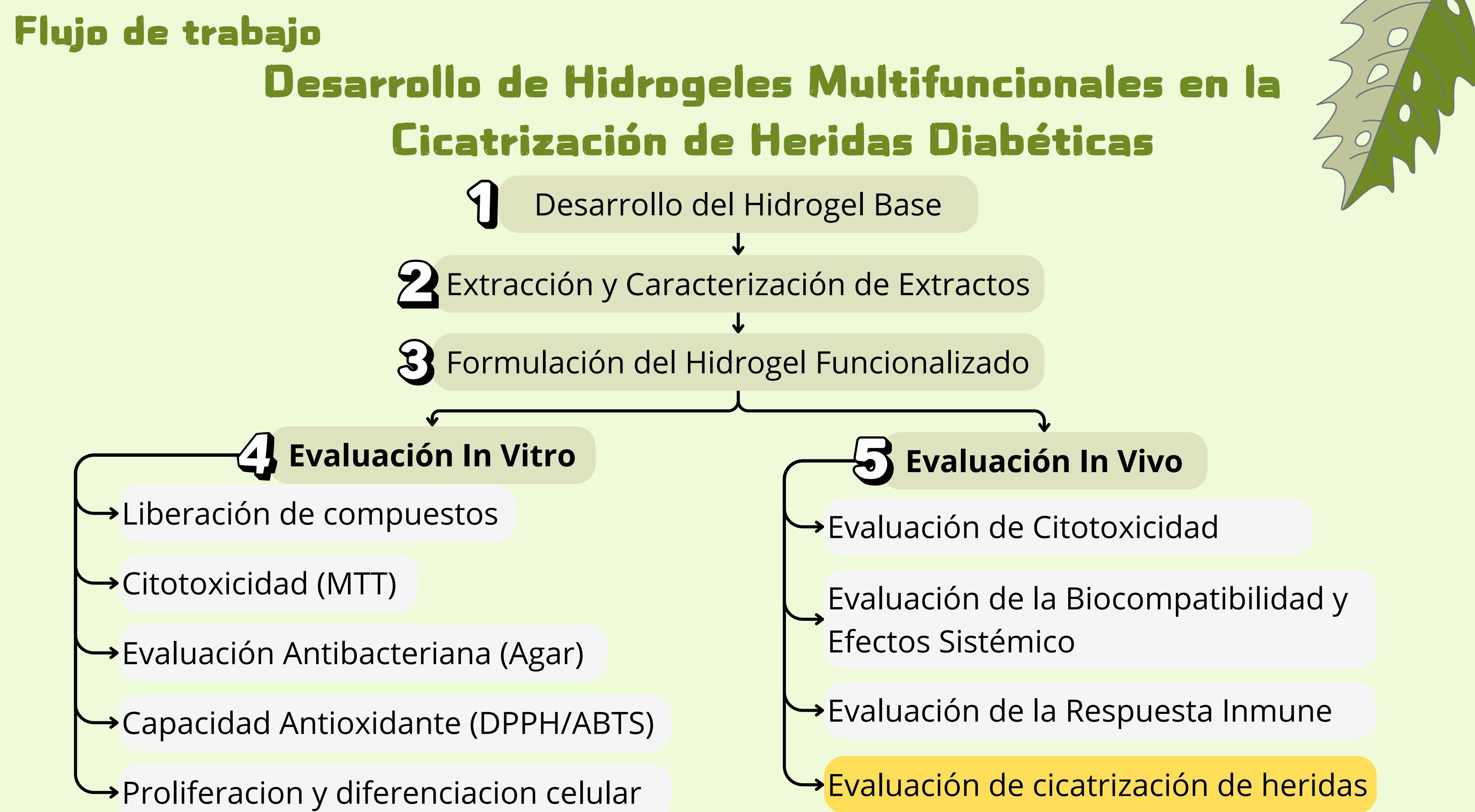
# Objetivos

## GENERAL

Desarrollar hidrogeles multifuncionales, funcionalizados con extractos naturales de plantas peruanas, como *Aloe vera*, *Centella asiatica*, *Caléndula officinalis* y *Plectranthus amboinicus*, para promover la cicatrización de heridas crónicas en pacientes diabéticos, evaluando sus propiedades bioactivas, biocompatibilidad y eficacia en modelos experimentales.

## ESPECÍFICOS

1. Desarrollo de un hidrogel base para la cicatrización de heridas.
2. Caracterización de las propiedades físicas y mecánicas del hidrogel base.
3. Extraer y caracterizar los extractos naturales de plantas peruanas.
4. Incorporar los extractos naturales en el hidrogel y caracterizar la interacción.
5. Evaluar la actividad antibacteriana mediante pruebas de difusión en agar,
6. Evaluar la capacidad antioxidante mediante ensayos de DPPH y ABTS
7. Evaluar la biocompatibilidad mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) en fibroblastos y queratinocitos.
8. Evaluar la eficacia del hidrogel funcionalizado en la regeneración de heridas crónicas en modelos animales, analizando la cicatrización y la angiogénesis mediante métodos histológicos y de biomarcadores.
9. Analizar los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando estadísticas descriptivas y analíticas y presentar los resultados en un informe técnico detallado.



# Elección de materiales

## Materiales para el hidrogel

### Quitosano

- **Biocompatible y biodegradable**
- **Propiedades antimicrobianas**
  - Inhibe crecimiento bacteriano, reduce infecciones
- **Antiinflamatorio y hemostático**
  - Ayuda a controlar la inflamación y promueve la coagulación.
- **Estructura porosa**
  - Facilita el intercambio de nutrientes y migración celular
- **Capacidad para encapsular y liberar compuestos bioactivos**
  - Ideal para terapias controladas.

### Gel metacrilado (GelMa)

- **Matriz biocompatible y fácilmente modificable**
  - Inhibe crecimiento bacteriano, reduce infecciones
- **Estabilidad mecánica y elasticidad ajustable**
  - Ayuda a controlar la inflamación y promueve la coagulación.
- **Alto soporte para adhesión y proliferación celular**
  - Facilita el intercambio de nutrientes y migración celular
- **Permeable a oxígeno, agua y factores de crecimiento**
  - Ideal para terapias controladas.
- **Facilita la liberación sostenida de fármacos o extractos**

[5] Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2021;13(19):3256. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/polym13193256>

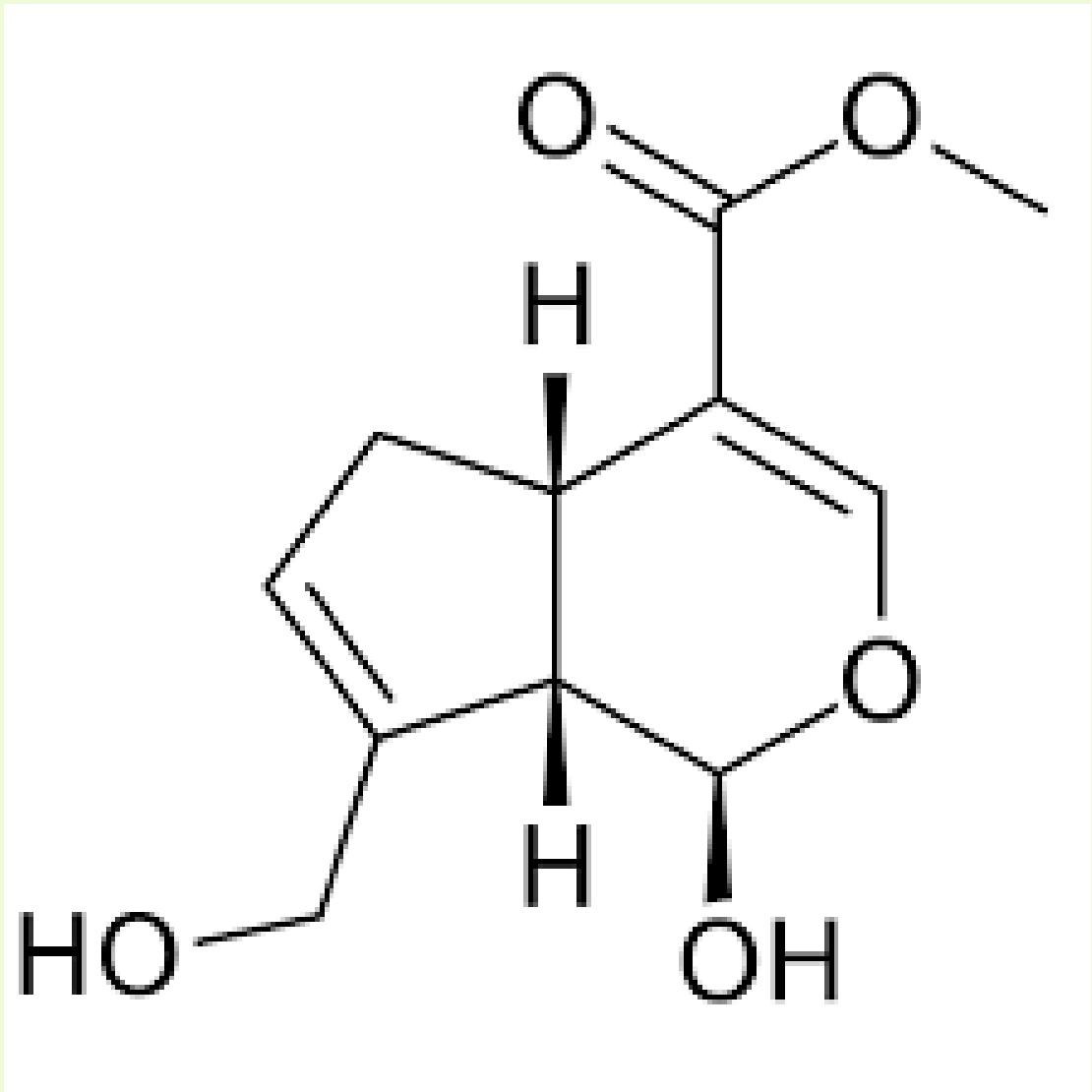
[6] Feng P, Luo Y, Ke C, Qiu H, Wang W, Zhu Y, et al. Chitosan-based functional materials for skin wound repair: Mechanisms and applications. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2021;9:650598. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>

# Elección de materiales

## Materiales para el hidrogel

### Genipina (para el entrecruzamiento)

- **Baja toxicidad:** 5,000 a 10,000 veces menos tóxica que otros entrecruzantes químicos tradicionales, como el glutaraldehído
- **Mejora propiedades físicas:** Aumenta la estabilidad, resistencia mecánica, porosidad
- **Degradación controlada:** Prolonga la vida útil del apósito



# Elección de materiales

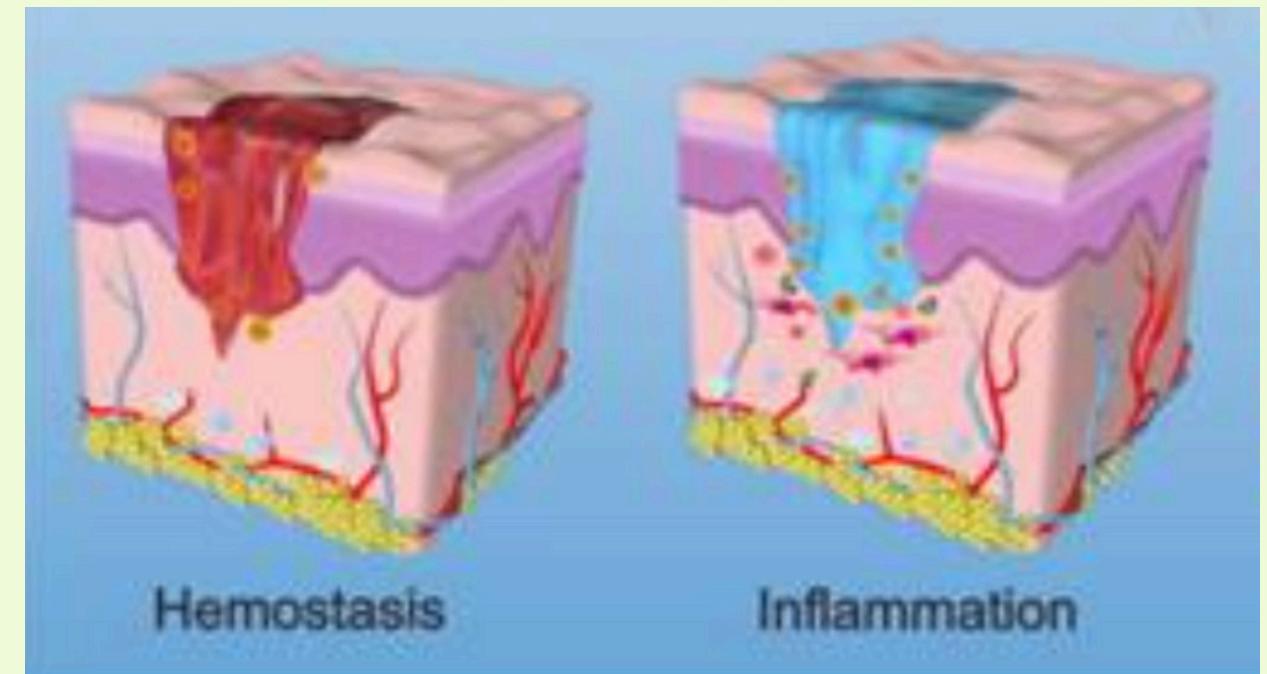
## Plantas medicinales (grupos funcionales)

### *Croton lechleri*

- Proantocianidinas (Procianidinas, taninos condensados)
  - **Potente actividad antioxidante:** neutralizan radicales libres y previenen el daño oxidativo en los tejidos
  - Actividad antimicrobiana y antiviral
  - **Astringentes:** detienen el sangrado
- Alcaloides
  - **Potente actividad antiinflamatoria**
  - Estimula la migración y proliferación de fibroblastos
- Fenoles y compuestos volátiles
  - Contribuyen con la protección antioxidante



Fase I y II de la cicatrización



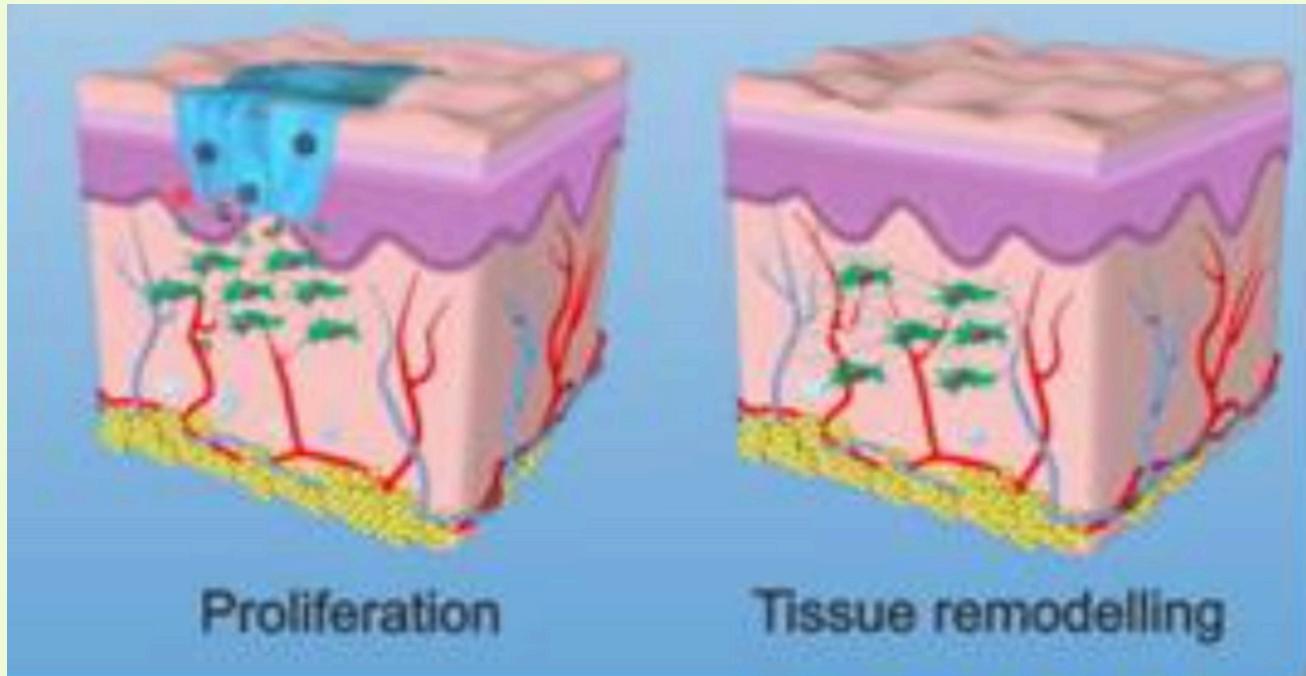
# Elección de materiales

## Plantas medicinales (grupos funcionales)

### *Centella asiática*

- **Asiaticósido**

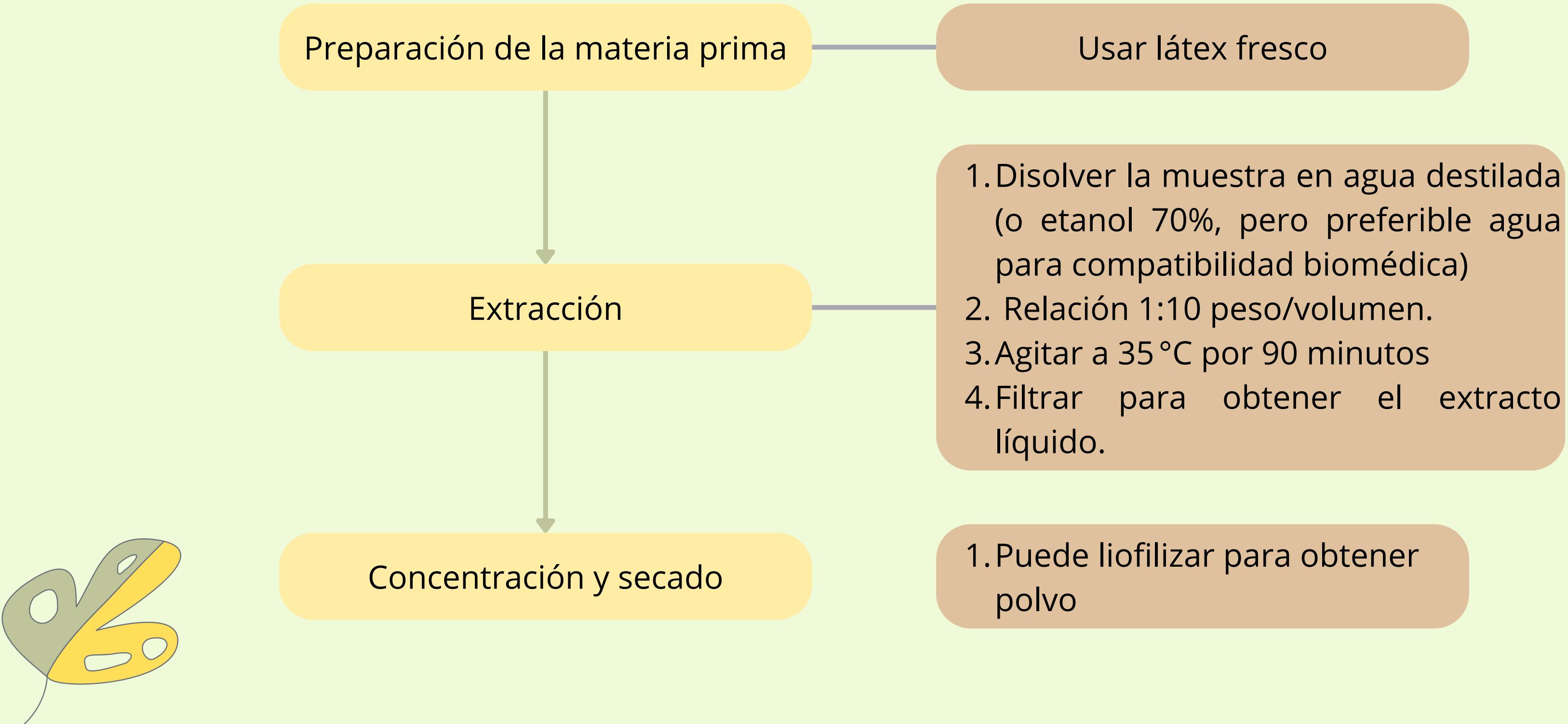
- Migración y proliferación de fibroblastos: formación de tejido de granulación.
- Aumenta la síntesis de colágeno (tipo I y III).
- Inhibe crecimiento bacteriano: reduce infecciones
- Promueve la angiogénesis:
- Actividad antiinflamatoria
- Favorece la epitelización



Fase III y IV de la cicatrización

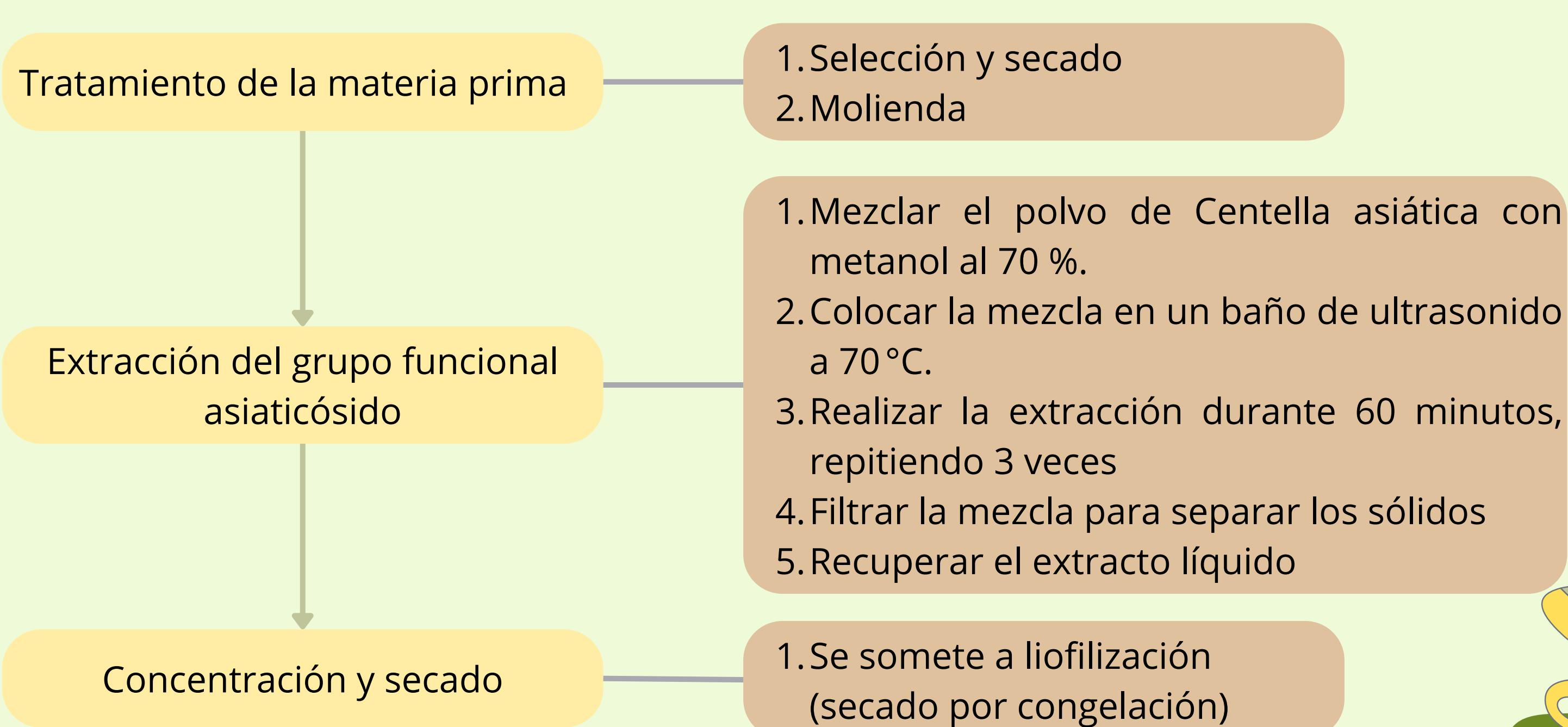
# Síntesis del hidrogel

## A. Protocolo para extracción de grupos funcionales de sangre de grado (*Croton palanostigma*)



# Síntesis del hidrogel

## B. Protocolo para extracción de grupos funcionales de Centella asiática (*Centella asiatica*)



# Síntesis del hidrogel

## B. Fabricación del hidrogel

### Preparación de Soluciones Base

Solución de quitosano

Solución de gelatina metacrilada  
(GelMA)

1. Disolver 1,5g de quitosano en 100mL de ácido acético al 1% v/v (obteniendo una concentración de 1,5% p/v).
2. Agitar a temperatura ambiente en placa calefactora con agitación magnética hasta disolución completa (2-3 h).
3. Ajustar pH a 5,5 usando NaOH 1N, gota a gota.

1. Disolver 2g de GelMA en 100mL de agua destilada caliente (37–40 °C) (concentración final: 2% p/v).
2. Agitar hasta obtener disolución homogénea.

# Síntesis del hidrogel

## B. Fabricación del hidrogel

Encapsulamiento de Centella  
asiatica



1. Dosificar para obtener una concentración final de extracto del 3% p/p respecto al peso total de polímeros usados
2. Peso a usar = 0,105 g de extracto

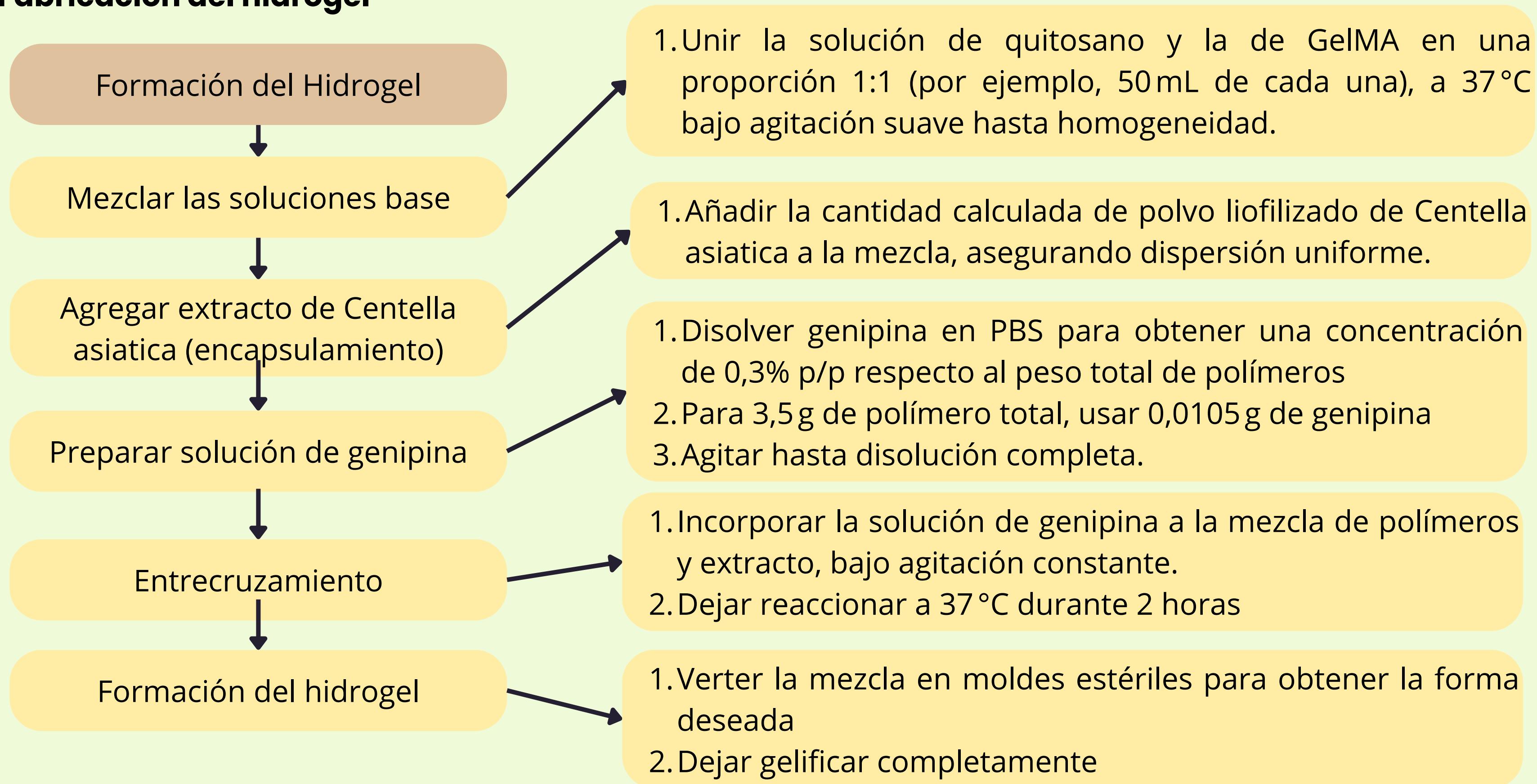
Preparación del extracto de sangre  
de grado



1. reconstituir el polvo liofilizado en una pequeña cantidad de PBS o agua estéril hasta formar una solución/pasta espesa

# Síntesis del hidrogel

## B. Fabricación del hidrogel



# Síntesis del hidrogel

## B. Fabricación del hidrogel

Funcionalización superficial con sangre de grado

Recubrimiento

Secado/adherencia

Almacenamiento

1. distribuir la pasta de sangre de grado uniformemente sobre la superficie expuesta del hidrogel.
2. Dejar reposar a temperatura ambiente durante unos minutos para permitir la adecuada adherencia

1. Dejar reposar a temperatura ambiente unos minutos para fijar el recubrimiento

1. Guardar los hidrogeles funcionalizados en condiciones estériles, a 4 °C hasta su uso

# Síntesis del hidrogel

## Resultados esperados

### 1. Obtención de un hidrogel multifuncional estable

- a. Se obtendrá un hidrogel con buena estructura, porosidad y capacidad para cargar compuestos bioactivos.

### 2. Liberación controlada y localizada

- a. El hidrogel liberará gradualmente los compuestos de Centella asiatica desde el interior y los de sangre de grado rápidamente desde la superficie.

### 3. Biocompatibilidad y bioactividad del sistema

- a. El material favorecerá la adhesión y proliferación celular, sin toxicidad para las células cutáneas.

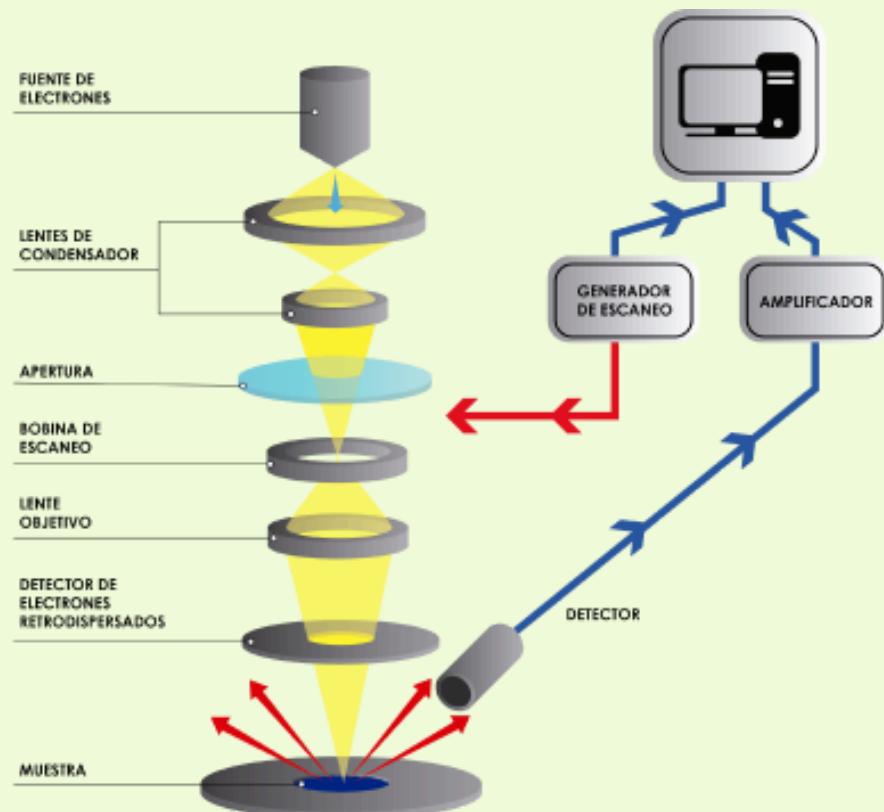
### 4. Efectividad multifásica

- a. Se logrará efecto hemostático, antimicrobiano y antiinflamatorio inicial (sangre de grado) y efecto regenerador y remodelador prolongado (Centella asiatica).

# Caracterización del hidrogel

## Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Haz de electrones impacta la muestra y se generan electrones secundarios



### Determinar la porosidad:

- Determinar el volumen disponible para favorecer una circatrización eficiente.
- Un nivel de porosidad ideal de aproximadamente 80% [1]

### Analizar el tamaño, forma y distribución de poros

- Favorecer la migración celular, la vascularización y la proliferación.
- Detectar alteraciones por incorporación de extractos.
- Los poros deben presentar tamaños de 100 - 400  $\mu\text{m}$  [1]

### Evaluar la morfología de la matriz.

- Aumentar la eficacia de intercambio de nutrientes y migración celular al observar la interconexión de poros.
- Poros interconectados, con formas de esferas/láminas bien definidas
- Superficies rugosas que favorecen la adhesión celular [2]

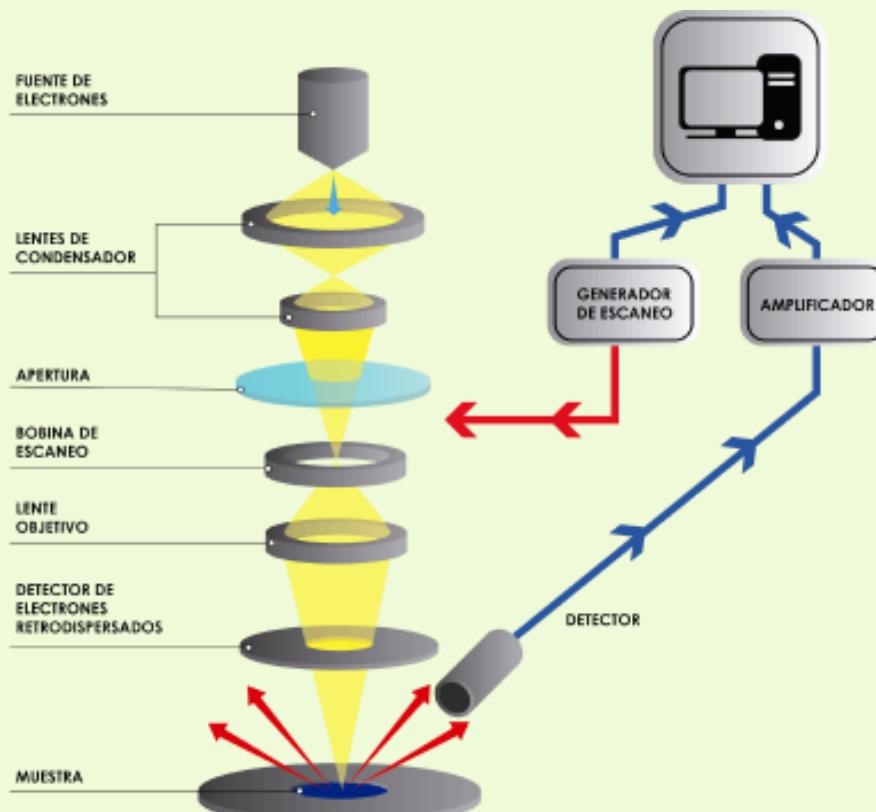
[1] Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010;16(4):371-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0639>.

[2] Martinez-Garcia FD, Fischer T, Hayn A, Mierke CT, Burgess JK, Harmsen MC. A beginner's guide to the characterization of hydrogel microarchitecture for cellular applications. *Gels* [Internet]. 2022;8(9):535. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/gels8090535>

# Caracterización del hidrogel

## Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)

Haz de electrones impacta la muestra y se generan rayos X característicos para cada elemento.



## Verificar la composición real de la matriz

- El quitosano y el GelMa aportan C, O y N. [1]
- Garantizar que la base polimérica esté presente correctamente (identificar si hubo concentración errónea o algún proceso de degradación)

## Detectar la presencia de sales, buffers o contaminantes

- El uso de un buffer fisiológico provoca la presencia de Na y Cl [2]
- Evaluar si se usó correctamente el buffer fisiológico que no afecte la celularidad.

## Confirmar la incorporación de los extractos

- Identificar si hubo una distribución homogénea de los compuestos de la Centella asiatica y Croton lechleri.

[1] Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010;16(4):371-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0639>

[2] Magli S, Rossi L, Consentino C, Bertini S, Nicotra E, Russo L. Combined analytical approaches to standardize and characterize biomaterials formulations: Application to chitosan-gelatin cross-linked hydrogels. *Biomolecules* [Internet]. 2021;11(5):683. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11050683>

# 4 Ensayo de análisis in vitro

## Liberación de compuestos bioactivos

### Objetivo

Evaluar la cinética de liberación de los componentes vegetales encapsulados.

1. Colocar discos del hidrogel funcionalizado en PBS pH 7.4 (a 37°C)
2. Tomar alícuota periodicamente según las fases.
3. Cuantificar los compuestos activos liberados.
4. Calcular el porcentaje de liberación acumulativa.

### Fase Inicial

- Liberación rápida del 20 - 40% de los compuestos. [1]
- Se busca combatir la inflamación y prevenir infecciones.

### Fase Intermedia

- Liberación acumulada del 50 - 60% de los compuestos. [1]
- Proveer un ambiente sustentador para la proliferación celular.
  - - Simular el efecto del factor de crecimiento epidérmico []

### Fase Prolongada

- Liberación acumulada 80 - 95% de los compuestos. [2]
- Apoyar remodelación tisular prolongada (soporte terapéutico)

[1] Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010;16(4):371-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0639>

[2] Magli S, Rossi L, Consentino C, Bertini S, Nicotra E, Russo L. Combined analytical approaches to standardize and characterize biomaterials formulations: Application to chitosan-gelatin cross-linked hydrogels. *Biomolecules* [Internet]. 2021;11(5):683. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11050683>

# Ensayo de análisis *in vitro*

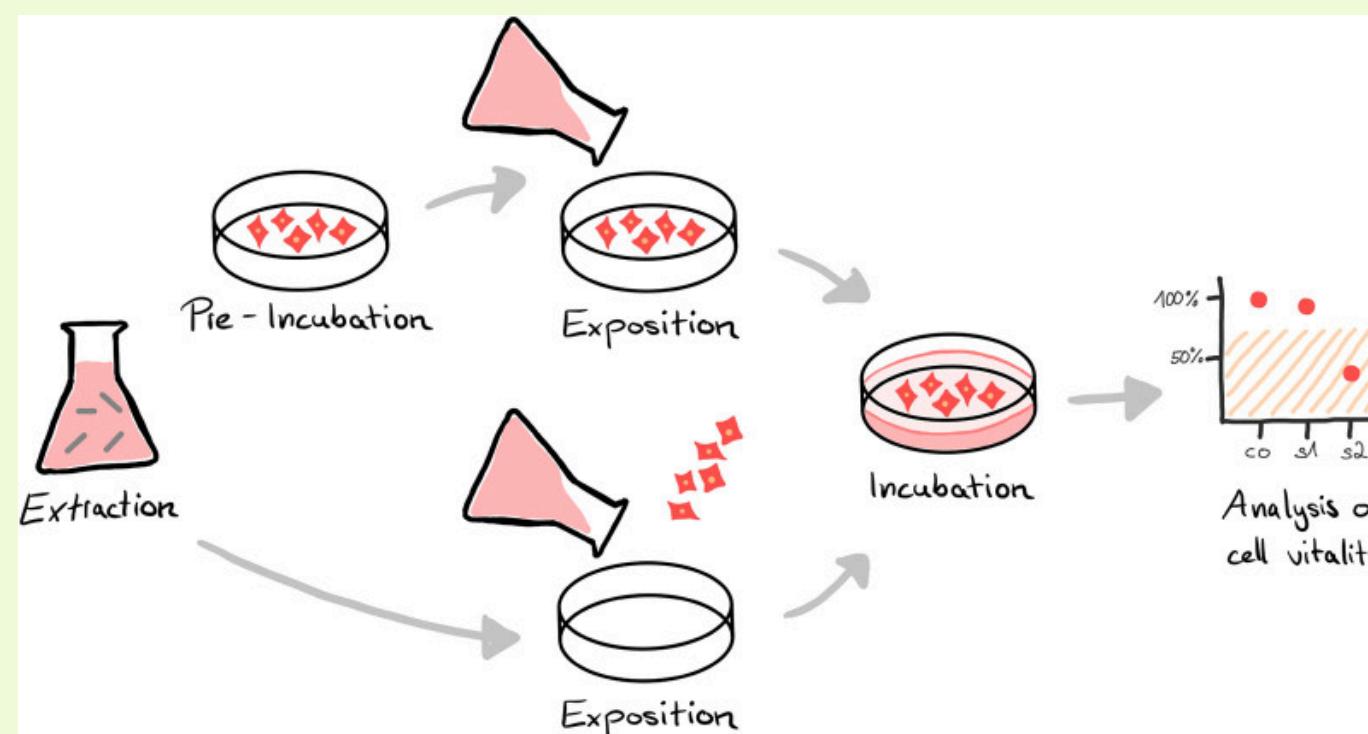
## Citotoxicidad (MTT)

### Objetivo

Validar la biocompatibilidad del hidrogel funcionalizado (no se inducen efectos tóxicos en líneas celulares utilizadas para estas pruebas).

### Norma ISO 10993-5

No hay citotoxicidad si la viabilidad celular es mayor o igual a 70% tras la exposición [1]



- Preparación de extracto relación superficie/medio ( $6 \text{ cm}^2/\text{mL}$ ) e incubar por 24 h a  $37^\circ \text{ C}$ .
- Exposición celular con L-929 (fibroblastos de ratón) por 24 - 72 horas.
- Evaluar la viabilidad mediante reducción de MTT a formazán por enzimas mitocondriales (cambio de color).
- Comparar con controles: Negativo (material biocompatible: Polietileno) y Positivo (material citotóxico: PVC).

# Ensayo de análisis in vitro

## Evaluación antibacteriana (Agar)

### Microorganismos evaluados

- *Staphylococcus aureus*. [A]
- *Pseudomonas aeruginosa*. [A]

### Test de difusión en agar

1. Se cultivan los microorganismos en agar Mueller-Hinton.
2. Se colocan discos del hidrogel sintetizado.
3. Incubación de 18 - 24 horas a 37° C.
4. Medición del halo de inhibición



Zona de inhibición (mm)	Interpretación
≥ 15	Alta eficacia
10 - 25	Eficacia moderada
< 10	Baja Eficacia

Ejemplos en hidrogeles similares:

1. TA-AgNPs/alginate: aproximadamente 11 mm para *S. aureus* y *Pseudomonas* [B] [C]
2. CTZ2 hidrogel obtuvo 8-9 mm contra *S. aureus* [C]

[1] Gruber S, Nickel A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Front Med Technol* [Internet]. 2023;5:1195529. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmedt.2023.1195529>

[2] El-Naggar MY, Gohar YM, Sorour MA, Waheed MG. Hydrogel Dressing with a Nano-Formula against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Diabetic Foot Bacteria. *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016;26(2):408-20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1506.06048>

[3] Srichaiyapol O, Maddocks SE, Thammawithan S, Daduang S, Klaynongsruang S, Patramanon R. TA-AgNPs/Alginate hydrogel and its potential application as a promising antibiofilm material against polymicrobial wound biofilms using a unique biofilm flow model. *Microorganisms* [Internet]. 2022;10(11):2279. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10112279>

# Ensayo de análisis in vitro

## Capacidad Antioxidante (DPPH/ABTS)

### Objetivo

Evaluar la capacidad del hidrogel funcionalizado para neutralizar radicales libres

- Los extractos vegetales, aportan catecoles, fenoles y flavonoides con propiedades antioxidantes

1. Tomar una muestra definida del hidrogel (30 mg).
2. Disolverla en agua destilada o metanol/aquosa.
3. Añadir solución de DPPH (200  $\mu$ M) o ABTS+ (radicales estables).
4. Incubar en la oscuridad según la solución (considerando tiempos y longitudes de onda distintos)
5. Medir la absorbancia y calcular el % de inhibición.

Solución	% Inhibición
DPPH	$\geq 60$ [1]
ABTS	$\geq 70$ [2]

[1] Gruber S, Nickel A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Front Med Technol* [Internet]. 2023;5:1195529. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmedt.2023.1195529>

[2] Srichaiyapol O, Maddocks SE, Thammawithan S, Daduang S, Klaynongsruang S, Patramanon R. TA-AgNPs/Alginate hydrogel and its potential application as a promising antibiofilm material against polymicrobial wound biofilms using a unique biofilm flow model. *Microorganisms* [Internet]. 2022;10(11):2279. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10112279>

# 5 Ensayo de análisis in Vivo

## Modelo experimental

- Ratón (*Mus musculus*)
- Machos
- 6-8 semanas, 20-30 g
- Condiciones:
  - Ratones sanos
  - Diabéticos inducidos  
(modelo de diabetes tipo 1 con estreptozotocina (STZ))

## Grupo control

### Grupo de Herida Sin Diabetes

### Grupo de Ratones Diabéticos

1. Herida inducida en la piel

- a. Dorso
- b. Patas

2. Aplicación de Hidrogel

3. Toma de muestras

- a. Herida
- b. Tejido circundante
- c. Sangre y órganos distantes

Aplicación del hidrogel

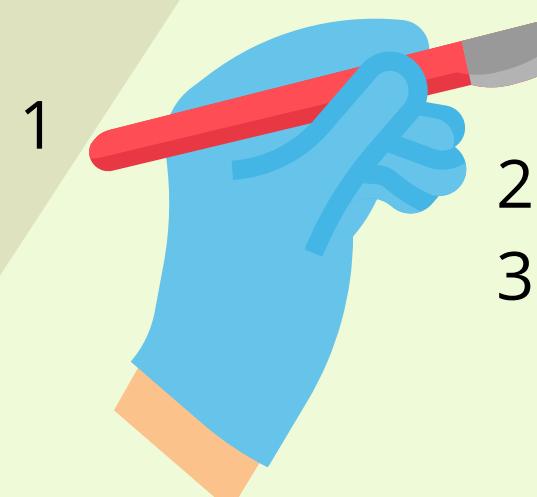
Día 7

Día 14

Día 21

Día 28

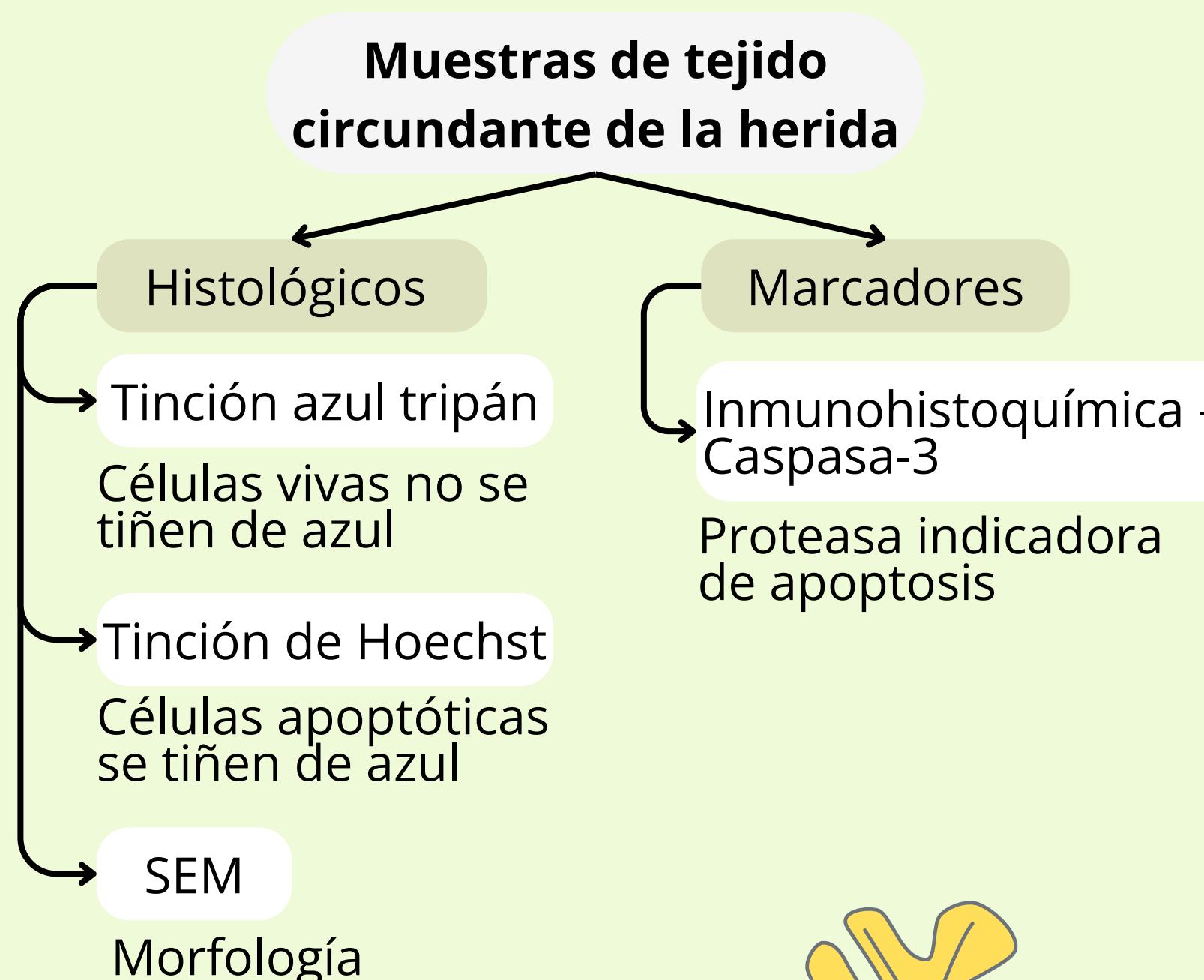
Toma de muestras



# Ensayo de análisis in Vivo

## Evaluación de Citotoxicidad

**Objetivo:** Evaluar si el hidrogel funcionalizado causa daño celular en los tejidos circundantes a la herida, asegurando que no sea tóxico para el organismo, evaluado en un modelo vivo.



### Resultados Esperados

#### 1. Viabilidad Celular:

- Se espera que más del 80% de las células en los tejidos circundantes sean viables.
- La tinción de Tripán Azul debe mostrar que la mayoría de las células son vivas.
- La tinción de Hoechst debe mostrar pocos núcleos apoptóticos, indicando que la apoptosis no es excesiva.

#### 2. Apoptosis:

- La inmunohistoquímica con Caspasa-3 debe mostrar baja cantidad de células apoptóticas, indicando que el hidrogel no está causando muerte celular excesiva.

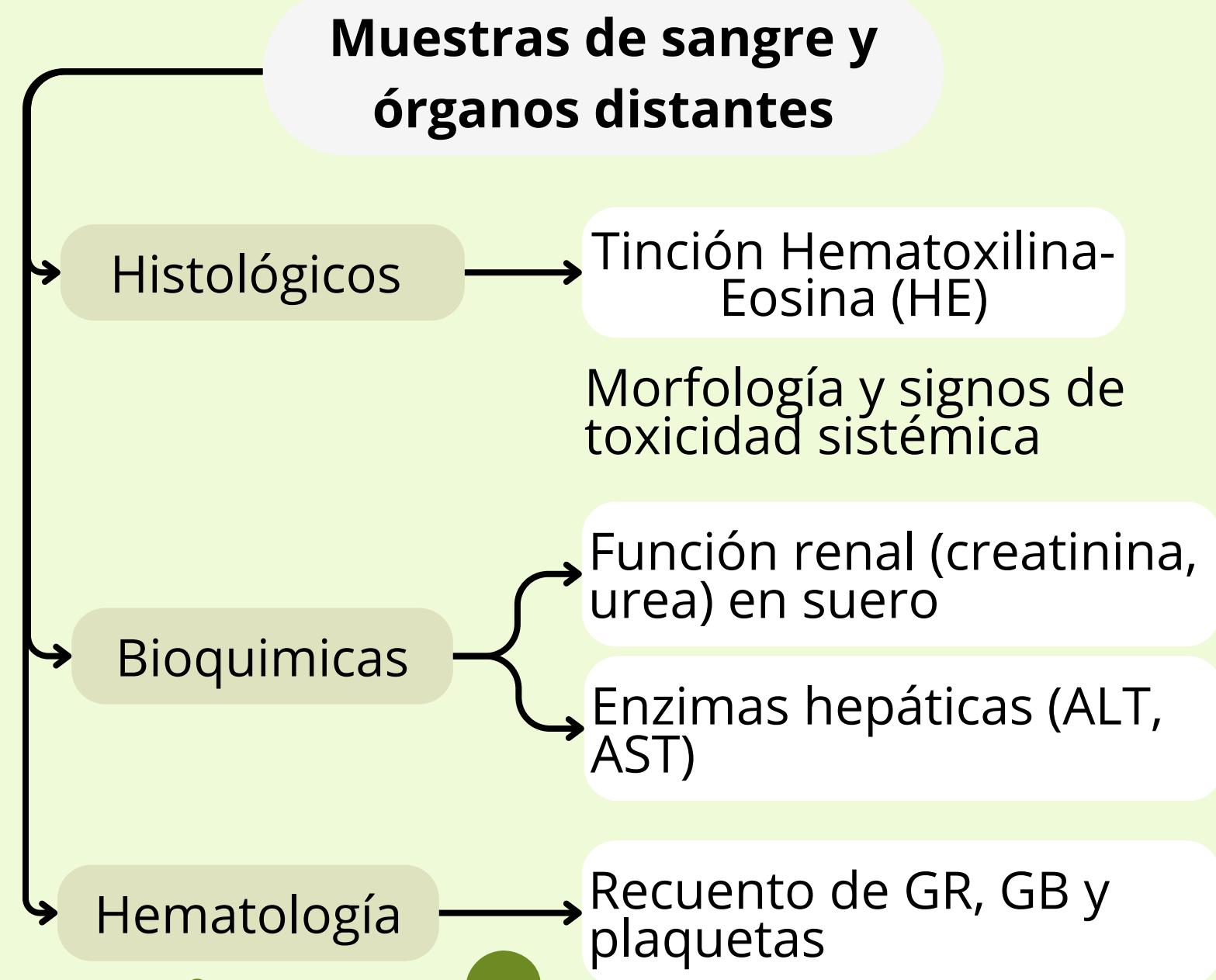
#### 3. Integridad Estructural Celular:

- En el análisis mediante microscopía electrónica, las células deben mostrar estructura y función normales, sin signos de necrosis o daño severo.

# Ensayo de análisis in Vivo

## Evaluación de la Biocompatibilidad y Efectos Sistémico

**Objetivo:** Evaluar si el hidrogel funcionalizado causa efectos adversos sistémicos en los órganos internos de los ratones, garantizando que el material sea seguro para el organismo en su conjunto



### Resultados Esperados

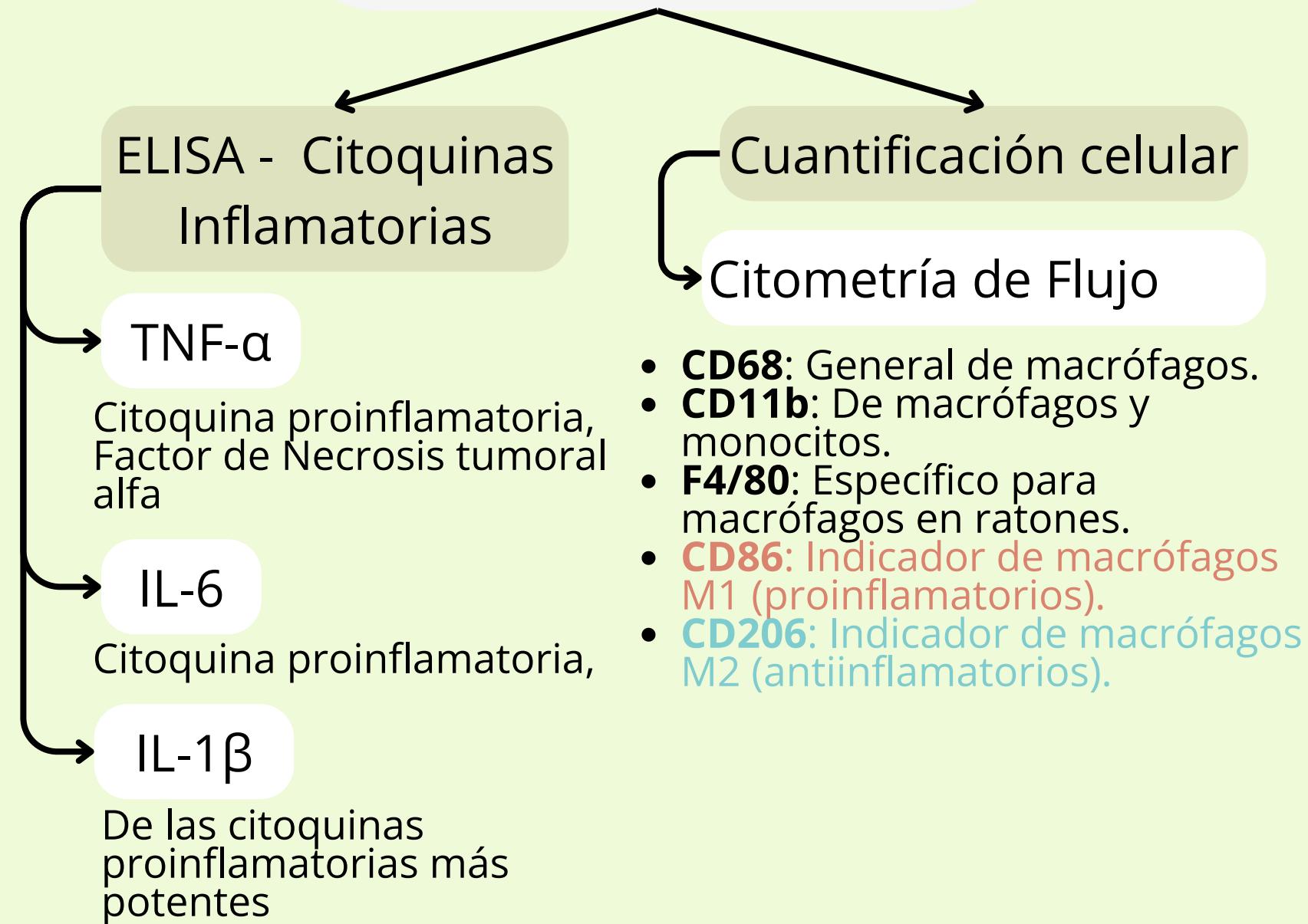
- 1. Análisis Histológicos de Órganos:**
  - a. Los tejidos de los órganos (hígado, riñones, pulmones) deben mostrar una estructura normal sin necrosis, fibrosis o inflamación crónica.
- 2. Función Hepática y Renal:**
  - a. Niveles normales de enzimas hepáticas (ALT, AST) y de creatinina y urea en suero, indicando que el hidrogel no causa daño hepático ni renal.
- 3. Hematología:**
  - a. Recuento normal de glóbulos rojos, blancos y plaquetas, sin alteraciones hematológicas que sugieran efectos adversos en la hematopoyesis.

# Ensayo de análisis in Vivo

## Evaluación de la Respuesta Inmune

**Objetivo:** Evaluar la respuesta inmune inducida por el hidrogel funcionalizado, especialmente la inflamación en los tejidos circundantes a la herida, y determinar si genera una respuesta inmunitaria excesiva que afecte la cicatrización.

### Muestras de sangre y tejido circundante a la herida



### Resultados Esperados

#### 1. Citoquinas Inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ):

a. Niveles de citoquinas inflamatorias estén moderadamente elevados al inicio pero que luego bajen, después de los 14-21 días podrían indicar una inflamación crónica, sugiriendo una respuesta inmune excesiva.

#### 2. Infiltración de Macrófagos (CD68, CD11b, F4/80):

a. Macrófagos deben estar presentes en cantidades moderadas, la mayoría deben ser M2 (CD206+), lo que indica una respuesta antiinflamatoria y la resolución de la inflamación.

#### 3. Resolución de la Inflamación:

a. La inflamación en la herida debe resolverse progresivamente, especialmente entre los 21-28 días, sin generar una respuesta inmune crónica que afecte la cicatrización.

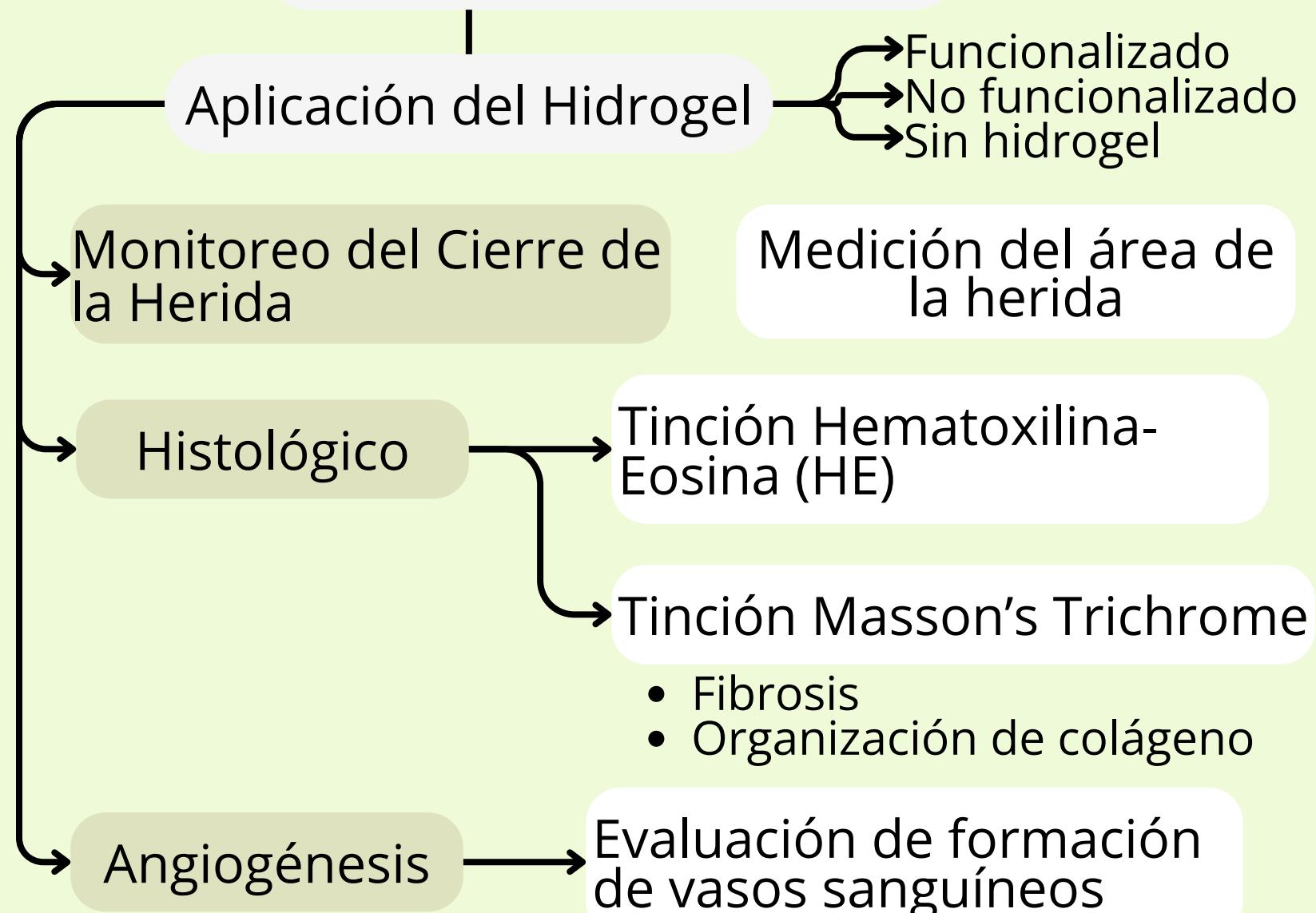
# Ensayo de análisis in Vivo

## Evaluación de cicatrización de heridas

### Objetivo:

Evaluar la eficacia del hidrogel funcionalizado en la cicatrización de heridas crónicas en ratones, especialmente en modelos de heridas inducidas en piel, observando el cierre de la herida y la regeneración tisular.

### Inducción de Heridas



### Resultados Esperados

#### 1. Cierre de la Herida:

- a. Se espera que el grupo tratado con el hidrogel funcionalizado muestre un cierre de la herida más rápido, significativamente mayor en porcentaje especialmente a los 14-21 días (fase de remodelación)

#### 2. Formación de Tejido de Granulación:

- a. Más tejido granuloso a etapas tempranas, indicando regeneración en el grupo tratado

#### 3. Regeneración de la Epidermis:

- a. El grupo experimental debería mostrar una regeneración más completa de la epidermis y una reparación adecuada de la dermis.

#### 4. Fibrosis y Colágeno:

- a. Se espera que el hidrogel funcionalizado minimice la fibrosis y favorezca una organización adecuada del colágeno.

#### 5. Angiogénesis:

- a. Se espera observar una formación de nuevos vasos sanguíneos en el grupo tratado.

# Análisis Estadísticos

**Objetivo:** Validar los resultados obtenidos de los ensayos de cicatrización, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana mediante pruebas estadísticas para asegurar la relevancia y significancia de los datos.

## 1. Pruebas de Normalidad:

- Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución de los datos.

## 2. Comparación de Grupos:

- Análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias entre los diferentes grupos experimentales (hidrogel funcionalizado, control sin tratamiento, control con hidrogel no funcionalizado).
  - a. Prueba post-hoc para determinar qué grupos son significativamente diferentes entre sí.

## 3. Correlaciones:

- Correlación de Pearson o Spearman para analizar la relación entre las variables (por ejemplo, entre cierre de herida y nivel de actividad antioxidante).

## 4. Pruebas de Significancia:

- $p < 0.01$  para considerar los resultados como estadísticamente significativos (más riguroso en estudios médicos).

**Gracias**