



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Preparación y evaluación de un hidrogel de PLA-PEG-PLA
para la liberación modificada de *o*-HO-AAVPA en células de
cáncer de mama”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

NOMBRE DEL SUSTENTANTE

Q.F.I. Rosario Magdalena Morales Cerino

DIRIGIDA POR

Ph.D. Miriam V. Flores Merino

Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez

Dr. M. Jonathan Fragozo Vázquez

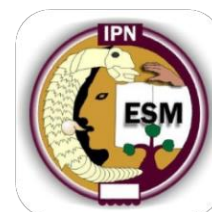
TOLUCA DE LERDO, ESTADO DE MÉXICO, 2020.





Parte del presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Química Experimental de la UAEMex y Laboratorio de Biología Molecular y Celular del CIMED, UAEMex, bajo la dirección de la **Ph.D. Miriam V. Flores Merino** y asesoramiento del **Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez**.

Parte del presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Síntesis Química, bajo el asesoramiento del **Dr. M. Jonathan Fragoso Vázquez** en la Escuela Superior de Medicina del IPN.



Índice

Resumen	I
Abstract	II
1. Antecedentes	1
1.1. Biomateriales	1
1.1.1. Tipos de biomateriales	1
1.1.2. Biomateriales poliméricos	2
1.1.3. Polímeros a nivel farmacéutico	3
1.1.3.1. Hidrogeles	5
1.2. Cáncer	7
1.2.1. Cáncer de mama	8
1.2.1.1. Fármacos para el cáncer de mama.	10
2. Justificación	12
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos particulares	13
4. Hipótesis	13
5. Materiales y metodologías	14
5.1. Materiales	14
5.2. Métodos	14
5.2.1. Copolímero tribloque ABA	14
5.2.2. Acrilación del copolímero	14
5.2.3. Foto polimerización	15
5.2.4. Grado de hinchamiento	15
5.2.5. Curvas de calibración para la medición del o-OH-AAVPA	16
5.2.6. Encapsulamiento del o-HO-AAVPA	16
5.2.7. Liberación <i>in vitro</i>	17

5.2.8.	Evaluación biológica	18
5.2.8.1.	Líneas celulares	18
5.2.8.2.	Determinación de la IC ₅₀ del <i>o</i> -OH-AAVPA	18
5.2.8.3.	Viabilidad celular de los hidrogeles con <i>o</i> -HO-AAVPA	19
5.2.8.4.	Tinción cristal violeta	19
6.	Resultados y discusión	21
6.1.	FT-IR	21
6.2.	Espectrometría de masas	23
6.3.	Espectroscopia de RMN ¹ H y ¹³ C	25
6.4.	DSC y TGA	28
6.5.	Microscopia electrónica de barrido.	32
6.6.	Grado de hinchamiento	33
6.7.	Eficiencia de encapsulamiento	38
6.8.	Liberación del <i>o</i> -OH-AAVPA	41
6.9.	Determinación de la IC ₅₀	43
6.10.	Evaluación de la viabilidad celular	46
7.	Conclusión	50
	Bibliografía	52
	Anexo	59
	Artículo Enviado	59

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los biomateriales por interacción biológica y composición química (Mahyudin & Hermawan, 2016) (Patitapabana, Ajit, & Subash, 2012) (Rezaie, Bakhtiari, & Öchsner, 2015) (L., G., & L., 2016).	2
Figura 2. Síntesis del copolímero tribloque PLA-PEG-PLA	14
Figura 3. Acrilación del copolímero tribloque PLA-PEG-PLA	15
Figura 4. Fotopolimerización del copolímero tribloque metilacrilado	15
Figura 5. Esquema del ensayo de cristal violeta (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016).	20
Figura 6. FT-IR y estructuras químicas del copolímero, copolímero acrilado e hidrogel.	23
Figura 7. Espectro de masas obtenidos por TOF/Q-TOF del copolímero PLA-PEG-PLA	24
Figura 8. Espectro de masas obtenido por TOF/Q-TOF del copolímero acrilado	25
Figura 9. Espectro de masas obtenido por TOF/Q-TOF del hidrogel	25
Figura 10. Espectros de RMN ¹ H, A. copolímero y B. copolímero acrilado y espectros de RMN ¹³ C, C. copolímero y D. copolímero acrilado.	27
Figura 11. Termogramas de DSC-TGA de los productos A. copolímero, B. copolímero acrilado, C. HA y D. HB.	30
Figura 12. Micrografías por SEM de HA a), b), c) y HB e), f), g) y h).	32
Figura 13. Cinética de hinchamiento de HA (a) y HB (b), utilizando como medios de hinchamiento PBS a pH 7.4 y pH 5.5, etanol 96°, medios de cultivo RPMI y DMEM, se distinguen por colores, con n=3 durante 221 horas.	34
Figura 14. Comparación de las cinéticas de hinchamiento de HA y HB teniendo en común el mismo medio de hinchamiento, a. RPMI, b. DMEM, c. PBS pH 7.4, d. PBS pH 5.5 y e. etanol, con n=3, durante 221 h y marcando con la flecha el punto de equilibrio de hinchamiento.	38
Figura 15. Curva de calibración para del <i>o</i> -OH-AAVPA empleando EtOH como disolvente, y midiendo las siguientes concentraciones (16998.13 μM, 5666.04 μM, 1888.68 μM, 629.56 μM, 209.85 μM, 87.91 μM, 69.95 μM y 23.32 μM).	39
Figura 16. Eficiencia de encapsulamiento del <i>o</i> -OH-AAVPA en HA y HB, con n=3	41

Figura 17. Curva de calibración para él *o*-OH-AAVPA diluido en PBS pH 7.4: etanol absoluto (5%), midiendo las siguientes concentraciones (2550 μ M, 319 μ M, 159 μ M, 79 μ M, 40 μ M y 20 μ M).
_____ 42

Figura 18. Cinética de liberación del *o*-OH-AAVPA, n=3, 37 °C, 300 RPM y en volumen de 1500 μ L.
_____ 42

Figura 19. Representación gráfica de la IC₅₀ en las diferentes líneas celulares, calculadas en el programa IC₅₀ Calculator|AAT Bioquest. _____ 45

Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular las células a etanol (control), *o*-HO-AAVPA con etanol (*o*-HO-AAVPA), hidrogeles sin *o*-HO-AAVPA (HA y HB) e hidrogeles cargados con *o*-HO-AAVPA (HA *o*-OH y HB *o*-OH) _____ 47

Índice de tablas

Tabla 1. Los mecanismos de la liberación de fármacos se diferencian en el comportamiento de liberación de los mismos a través del tiempo (Perrie & Rades, 2012)	3
Tabla 2. Clasificación de hidrogeles por diferentes criterios (Ahmed, 2015) (Munim & Raza, 2018).	5
Tabla 3. Ejemplos de hidrogeles empleados para la liberación de fármacos lipófilos (Larrañeta, Stewart, Ervine, Al-Kasasbeh, & Donnelly, 2018).	7
Tabla 4. Subtipos de cáncer de mama, receptores y porcentaje de casos. HR es receptor hormonal (ER y PR), HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) (NIH, 2019)	8
Tabla 5. Clasificación de los inhibidores de histona desacetilasa (Connolly & Stearns, 2012) (Verma & Banerjee, Epigenetic Inhibitors , 2015).	10
Tabla 6. Estímulos empleados para la determinación de la IC ₅₀ en las diferentes líneas celulares.	18
Tabla 7. Líneas celulares y estímulos empleados para las pruebas de liberación modificada del o-HO-AAVPA, en la columna de estímulos.....	19
Tabla 8. Números de onda observadas en el espectro IR para los diferentes productos de síntesis (copolímero PLA-PEG-PLA, copolímero acrilado e hidrogel)	21
Tabla 9. Tabla de ANOVA, considerando tres factores (tiempo, medio y % I2959) y como respuesta el grado de hinchamiento.	35
Tabla 10. Determinación de la eficiencia de encapsulamiento.	40
Tabla 11. Tabla de ANOVA, considerando dos factores (tiempo y % I2959) y como respuesta el % de liberación acumulado.....	43

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

PLGA: Acido poli láctico co-glicolico

PEG: Poli (etilen glicol)

PLA: Acido poli láctico

PCL: Poli caprolactona

ER: Receptor de estrógeno

PR: Receptor de progesterona

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

HR: Receptor de hormona

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

ARN: Ácido ribonucleico

HDACs: Histonas desacetilasas

o-HO-AAVPA: Orto hidroxil aril ácido valproico

PBS: Solución salina de fosfatos

% EE: Eficiencia de encapsulamiento

HA: Hidrogel A o hidrogel con 5 % de fotoiniciador I2959

HB: Hidrogel B o hidrogel con 10 % de fotoiniciador I2959

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

TGA: Termo gravimetría

Resumen

Los hidrogeles son biomateriales poliméricos con aplicaciones biomédicas, atractivos por su capacidad para modificar la vida media o el transporte de circulación de principios activos. Los hidrogeles han servido como portadores de medicamentos contra el cáncer, ya que un gran número de estos tienen una solubilidad limitada, como es el caso de o-OH-AAVPA. Por esta razón, sugerimos el uso de un sistema de hidrogel de PLA-PEG-PLA. Los PLA vinculados al PEG forman sistemas con características de sigilo que brindan protección contra diversos mecanismos de degradación dentro de una célula, proporcionando biocompatibilidad y tiempo de circulación prolongado.

En este trabajo, se realizó la síntesis del tribloque PLA-PEG-PLA y luego se reticuló con diferentes porcentajes de I2959 (5% y 10%). Luego se probó un hidrogel de PLA-PEG-PLA, como portador de o-OH-AAVPA en las líneas celulares MDA MB 231, HCC 1937, MCF 7 y 3T3 SWISS. Encontramos que el hidrogel A tiene la mayor capacidad de hinchamiento ($634.59\% \pm 2.39$) en medio de cultivo RPMI, la eficiencia de encapsulación fue $98.47\% \pm 0.9952$ con una liberación total de o-HO-AAVPA a las 24 h. El hidrogel B tiene una capacidad de hinchamiento de $480.7204\% \pm 33$ en solución de PBS (pH 7.4), una eficiencia de encapsulación de $95.59\% \pm 0.4537$ y liberación total de o-HO-AAVPA a las 96 h. Los efectos sobre la viabilidad celular fueron más bajos que el hidrogel con 5% de I2959.

En conclusión, HB fue el hidrogel propuesto para continuar con estudios adicionales, ya que tiene una menor variabilidad, lo que permite una menor viabilidad celular de las células cancerosas tratadas con el hidrogel cargado con o-HO-AAVPA.

Abstract

Hydrogels are polymeric biomaterials with biomedical applications, attractive for their capacity to modify half-life or circulation transport of active principles. Hydrogels have served as carriers of anticancer drugs, since a large number of these have limited solubility, such it is the case of *o*-OH-AAVPA. For this reason, we suggest the use of a hydrogel system of PLA-PEG-PLA. PLA linked to PEG, form systems with stealth characteristics giving protection against various degradation mechanisms inside a cell providing biocompatibility and prolonged circulation time.

In this work the synthesis of the PLA-PEG-PLA triblock was carried out and then crosslinked with different percentages of I2959 (5 % and 10 %). Then a hydrogel of PLA-PEG-PLA, as an *o*-OH-AAVPA carrier was tested in the MDA MB 231, HCC 1937, MCF 7 and 3T3 SWISS cell lines. We found that the hydrogel A has the greatest swelling capacity ($634.59 \% \pm 2.39$) in RPMI culture medium, the encapsulation efficiency was $98.47 \% \pm 0.9952$ with a total release of *o*-HO-AAVPA at 24 h. The hydrogel B has the swelling capacity of $480.7204 \% \pm 33$ in PBS solution (pH 7.4), an encapsulation efficiency of $95.59 \% \pm 0.4537$, and total release of *o*-HO-AAVPA at 96 h. Effects on cell viability were lower than the hydrogel with 5 % of I2959.

In conclusion, HB was the proposed hydrogel to continue with additional studies, since it has lower variability, which allows for lower cell viability of cancer cells treated with the hydrogel loaded with *o*-HO-AAVPA.

1. Antecedentes

1.1. Biomateriales

Un biomaterial es cualquier material, superficie o constructo diferente a un fármaco, que interactúa con sistemas biológicos, puede ser natural, sintético o semi-sintético, comprende todo o parte de una estructura viva o bien, se puede definir como un dispositivo que tiene como objetivo principal preservar y mejorar la calidad de vida de un individuo, a través de realizar, evaluar, tratar, aumentar o reemplazar la función natural, de un órgano o un tejido. Entre las características deseables de un biomaterial es que tenga respuesta inmune mínima o ausente (biocompatibilidad), así como ser un material biodegradable y/o bioreabsorbible para que desaparezca después de cumplir su función, aplicado al área farmacéutica se utilizan para mejorar la cinética de liberación y prevenir la acumulación del transportador, en general las características dependerán de la aplicación prevista (Pavlovic, 2015) (Sulistioso Giat, Agung, & Hendra, 2016) (Marjanović-Balaban & Jelić, 2018).

Los biomateriales que tenemos hoy en día son el resultado de cuatro generaciones, que se caracterizan por el tipo de material empleado; la primer generación disponía solo de materiales en su entorno tales como madera, caucho, huesos y dientes de animales, en la segunda generación se emplean materiales como: hierro, zinc, oro y vidrio, teniendo beneficios debido a la revolución industrial, la tercera y cuarta generación es la época moderna de los biomateriales y nace con los polímeros, debido a que estos materiales se consideran prometedores por su elaboración y transformación (Migonney, 2014) (Triplett & Budinskaya, 2017).

1.1.1. Tipos de biomateriales

Diversas clasificaciones de los biomateriales se pueden encontrar en la literatura, sin embargo, nos centramos en dos aspectos, que involucran la clasificación por interacciones biológicas y composición química, las cuales se ejemplifican en la Figura 1.

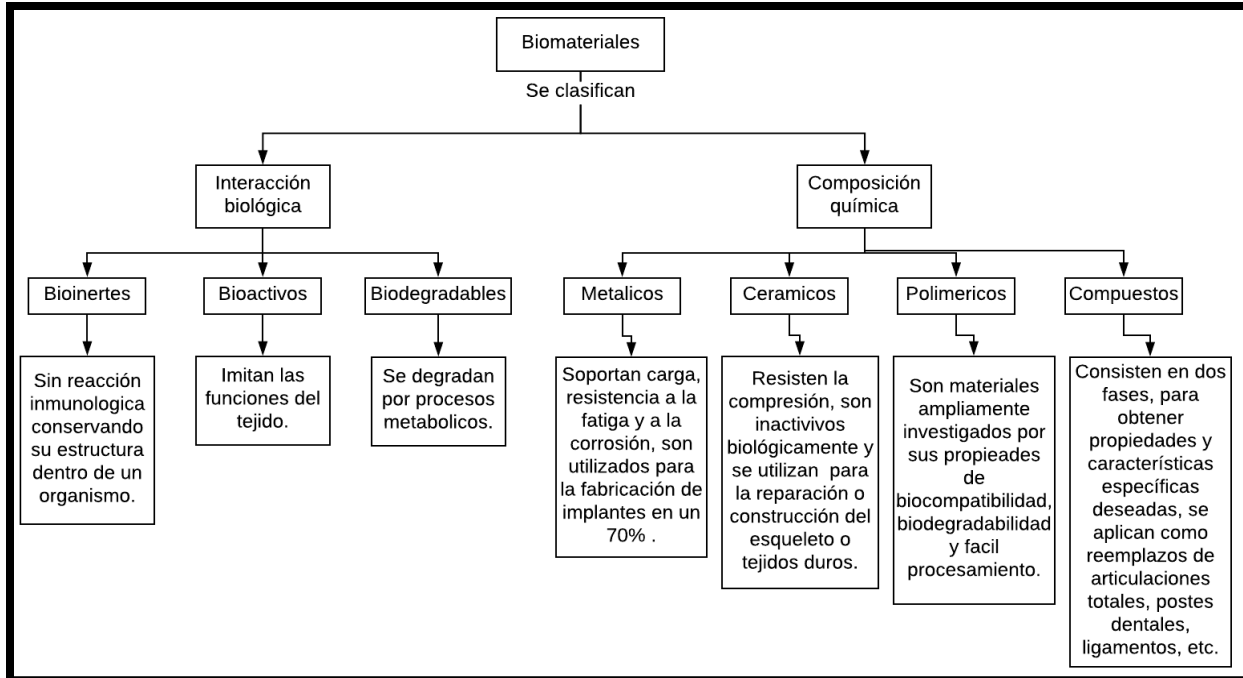


Figura 1. Clasificación de los biomateriales por interacción biológica y composición química (Mahyudin & Hermawan, 2016) (Patitapabana, Ajit, & Subash, 2012) (Rezaie, Bakhtiari, & Öchsner, 2015) (L., G., & L., 2016).

1.1.2. Biomateriales poliméricos

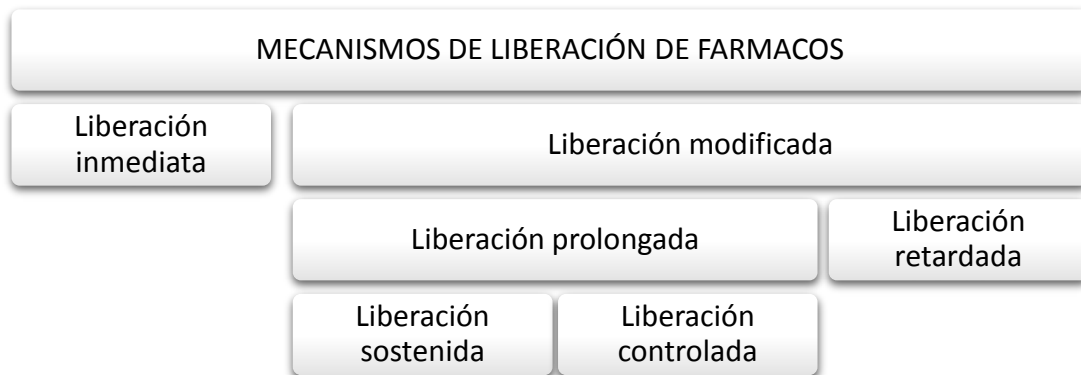
Un polímero es una molécula de cadena larga que consiste en pequeñas unidades llamadas monómeros unidas covalentemente, van desde plásticos sintéticos como el poli (estireno) hasta biopolímeros naturales como el ADN y las proteínas, produce propiedades físicas únicas que pueden transformarlos en materiales inteligentes por la manipulación de sus estructuras con enzimas en las diferentes etapas del ciclo de vida de un organismo, o en respuesta a cambios ambientales (Mahyudin & Hermawan, 2016) (Rezaie, Bakhtiari, & Öchsner, 2015) (Nandini A., Geetha B., & Mahadevappa Y., 2017).

Se aplican ampliamente en tecnologías biomédicas, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, terapia génica, liberación controlada de fármacos y nanotecnología, de manera más específica la aplicación de los materiales poliméricos se encuentra en órganos artificiales, marcapasos, sangre artificial, degeneración macular, regeneración de extremidades y oído artificial (Yamamuro, 2016) (Tian, Tang, Zhuang, Chen, & Jing, 2012).

1.1.3. Polímeros a nivel farmacéutico

Las aplicaciones de polímeros a nivel farmacéutico han sido como: enmascaradores de sabor, aglutinantes, solubilizantes, recubridores de película, así como para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y mecanismos de liberación que en principio se dividen en liberación inmediata y liberación modificada (Tabla 1), también han servido para modificar las características de semivida de transporte o circulación plasmática y producir sistemas de reconocimiento (Srivastava, y otros, 2016) (Perrie & Rades, 2012).

Tabla 1. Los mecanismos de la liberación de fármacos se diferencian en el comportamiento de liberación de los mismos a través del tiempo (Perrie & Rades, 2012)



La liberación de fármacos a partir de polímeros, depende del tipo de sistema de liberación y sus propiedades. Estos sistemas se pueden clasificar en sistemas de difusión, sistemas de hinchamiento, sistemas con respuesta a estímulo (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010) (Ashlee N. Ford Versypta, 2013):

- A. Sistemas de difusión. Son sistemas monolíticos que pueden representarse mediante dispositivos de depósito o de matriz, la liberación se da por medio de la malla del hidrogel.
 - a) Sistemas de depósito incluyen un núcleo que contiene el fármaco, este es revestido con una membrana de hidrogel, permitiendo que la velocidad de liberación sea constante (Caló & Khutoryanskiy, 2015) (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010).
 - b) Sistemas matriciales El fármaco se dispersa o disuelve en toda la estructura tridimensional del hidrogel, la liberación se da a través del poro, y la velocidad de liberación depende de la velocidad de difusión del fármaco, en estos sistemas

encontramos los sistemas de hinchamiento, sistema de erosión y sistema basado en estímulo (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

- B. Sistemas de hinchamiento o activados por disolvente. Este sistema solo se integra por el fármaco y el hidrogel, al entrar en contacto con un entorno acuoso, el hidrogel absorbe agua y se hincha, es decir el disolvente relaja las cadenas y disuelve los depósitos de fármaco dispersados (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010).
- C. Sistemas con respuesta a estímulo. En esta categoría entran los sistemas bioerosionables en los cuales hay una erosión del polímero debido a la disolución de las cadenas de enlace sin provocar ningún cambio en la estructura química de la molécula del polímero (Srivastava, y otros, 2016). Los sistemas biodegradables, son los que sufren una degradación de enlaces por reacciones químicas, los polímeros requieren enlaces hidrolíticamente o proteolíticamente lábiles en su cadena principal o reticulante, en su mayoría poli(etilenglicol), poli(esteres), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(fosfoésteres), poli(fosfacenos), poli(amidas), poli(caprolactonas) y poli(cianoacrilatos). A este tipo de polímeros comúnmente se le denomina polímeros inteligentes ya que son sensibles a estímulos como: temperatura, presión, pH, campo eléctrico, campo magnético, potencial redox, concentración, fuerza de ionización. La respuesta ante los estímulos es un cambio de propiedades tales como: la disolución, precipitación, hinchamiento, conformación y naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, dichas características se pueden emplear en sistemas de liberación de fármacos que bien se pueden categorizar ampliamente como: dendrímeros, liposomas, micropartículas, nanopartículas, micelas, conjugados polímero-fármaco, hidrogeles e implantes (Srivastava, y otros, 2016) (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010) (Davis).

Los polímeros aplicados a sistemas de liberación de fármacos, han mantenido su popularidad desde 1950, año en que parte la primera generación de los sistemas de liberación controlada. En la segunda generación figuran polímeros así como derivados de estos, que son hidrogeles y va de 1980 a 2010 (Park, 2014).

1.1.3.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes de polímeros reticuladas, con afinidad a la absorción y mantenimiento de agua o fluidos biológicos, pueden estar compuestas de homopolímeros y/o copolímeros y son insolubles debido al entrecruzamiento químico o físico, dando lugar a estructuras enredadas, a medida que se introducen enlaces cruzados entre las cadenas poliméricas, las redes obtenidas muestran comportamiento viscoelástico y a veces puramente elástico (Muhammad Faheem & Muhammad, 2015) (Ahmed, 2015).

Los hidrogeles se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios, tales como los mencionados en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de hidrogeles por diferentes criterios (Ahmed, 2015) (Munim & Raza, 2018).

Clasificación	Tipos de hidrogeles	
Composición polimérica	Homopolímeros Copolímeros Multi-polímeros	
Configuración	Amorfo Semicristalino Cristalino	
Reticulación	Físicos	Interacción iónica Puentes de hidrógeno Interacciones hidrofóbicas
	Químicos	Interacciones covalentes Fotopolimerización Polimerización por radicales libres Reacciones enzimáticas
Apariencia física	Matriz Película Micro-esfera	
Carga eléctrica	No iónico Iónico Electrolito anfótero Zwitteriónicos	
Origen	Naturales Sintéticos Semi-sintéticos	

Los hidrogeles simulan estrechamente el tejido vivo natural más que cualquier otro biomaterial sintético, debido al alto contenido de agua, la porosidad y la consistencia blanda que favorece la biocompatibilidad, además de su adaptabilidad mecánica y química que es una característica deseable para varias aplicaciones biomédicas (Caló & Khutoryanskiy, 2015) (Munim & Raza, 2018). Adicionalmente los hidrogeles pueden tener propiedades tales como; toxicidad reducida, mejores perfiles de liberación de fármacos, alta capacidad de encapsular fármacos e inercia ante los fármacos llevándolos directamente como acarreadores que pueden interactuar con el revestimiento de la mucosa en el tracto gastrointestinal, colon, vagina, nariz y otras partes del cuerpo, esto debido a la habilidad para prolongar su tiempo de residencia y liberación local.

En cuanto a este campo de aplicaciones, los hidrogeles tienen una característica importante que es la capacidad de hinchamiento, parámetro que está determinado por la estructura de la red, que a su vez depende de los monómeros empleados, es decir la naturaleza química de estos, así como del reticulante y la cantidad de este mismo, que en principio afecta el tamaño de poro, teniendo la mayor influencia en la velocidad de liberación del fármacos y la degradación del polímero (Srivastava, y otros, 2016) (Kim, Kim, Jeon, Kwon, & Park, 2009).

Los sistemas de liberación modificada de fármacos tienen ventajas como: el mantenimiento de los niveles del fármaco dentro de un intervalo de tiempo deseado, reducción de efectos secundarios y toxicidad, mejora la eficacia, cumplimiento y comodidad del paciente al reducir la frecuencia de administración. Por estas razones es que han atraído la atención de muchos investigadores que trabajan en el campo de la terapia del cáncer donde la mayoría de los fármacos utilizados son hidrófobos e impide la administración de quimio-tratamientos.

Los hidrogeles forman parte de la solución a desafíos que enfrenta la industria farmacéutica en la administración de fármacos hidrófobos, la liberación de fármacos de forma controlada y en un sitio específico, protección de compuestos bioactivos que tienen un tiempo de vida media muy corto y problemas de estabilidad del fármaco (Aghabegi Moghanjoughi, Khoshnevis, & Zarrabi, 2016) (Astrain, Martin, Corcuera, Eceiza, & Gabilondo, 2017) (Gu, O'Connor, G.H. Qiao, & Ladewig, 2016).

Entre los estudios que se han hecho de hidrogeles para encapsulación de fármacos hidrófobos y dirigidos hacia algún tipo de cáncer, citamos la Tabla 3 de Eneko Larrañeta *et al.*, que incluye diferentes sistemas de hidrogeles (Larrañeta, Stewart, Ervine, Al-Kasasbeh, & Donnelly, 2018).

Tabla 3. Ejemplos de hidrogeles empleados para la liberación de fármacos lipófilos (Larrañeta, Stewart, Ervine, Al-Kasasbeh, & Donnelly, 2018).

Sistema De Hidrogel	Fármaco	Tratamiento	Ruta De Administración
PLGA-PEG-PLGA	Docetaxel	Cáncer de pulmón	Subcutánea
PLGA-PEG-PLGA	Paclitaxel	Cáncer de mama	Subcutánea
PCL-PEG-PCL	Doxorubicin	Cáncer de hígado	Subcutánea
Poli(γ -etil-L-glutamato)-PEG- Poli(γ -etil-L-glutamato)	Paclitaxel	Cáncer de hígado	Subcutánea
Péptido-grafeno	Doxorubicin	Cáncer de hígado	Subcutánea
Núcleo base terminal PEG con CD	Doxorubicin	Cáncer cervical	Subcutánea
VitEm-PEG-VitEm	Herceptin	Cáncer de mama	Subcutánea
Vitamina D-PEG-Vitamina D	Avastin	Cáncer de colon	Subcutánea
PCL-PEG-PCL	Docetaxel	Cáncer de mama	Oral

1.2. Cáncer

Cáncer no solo es una enfermedad aislada, es el conjunto de enfermedades con manifestaciones diferentes, involucra innumerables agentes carcinogénicos endógenos y exógenos así como varios mecanismos etiológicos, sin embargo todos estos estados de enfermedad tienen en común ciertas propiedades biológicas de las células, incluido el crecimiento celular no regulado, la diferenciación celular alterada, la invasividad, y el potencial metastásico (Coleman & Tsongalis, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y relaciona el cáncer con factores de riesgo, como: tabaquismo, consumo de alcohol, inactividad física y obesidad, en el 2018 la OMS reporto 9,555,027 muertes en todo el mundo, de todos los canceres, ambos sexos y todas las edades, de las cuales 6.6 % muertes se debieron al cáncer de mama, en México las muertes por cáncer de mama en mujeres

ocupa un 16 % con incidencia del 26 % (OMS, 2019), el Instituto Nacional de Cáncer reporta que en 2019 los casos nuevos estimados de cáncer son 268,600 y las muertes estimadas de 41,760 (Institute, 2019).

1.2.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es un cáncer muy complejo ya que tiene diferentes subtipos basados en receptores, tales como: ER, PR, HER2 y triple negativo (TNBC). Por información de la OMS hay cuatro subtipos principales de los cuales se muestran en la Tabla 4 y se informa el porcentaje de casos según su subtipo (Telli, 2106).

Tabla 4. Subtipos de cáncer de mama, receptores y porcentaje de casos.
 HR es receptor hormonal (ER y PR), HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) (NIH, 2019)

Receptor	Subtipo de cáncer de mama	Porcentaje de casos
HR +/HER2-	Luminal A	67%
HR-/HER2-	Triple negativo	10%
HR+/HER2+	Luminal B	10%
HR -/HER2+	Enriquecido en HER2	4%
Desconocido		8%

El cáncer de mama triple negativo, es el que tiene la ausencia de receptores, ocupa de un 10 % a 20 % de todos los canceres y los pacientes con este tipo de cáncer a menudo sigue un curso más agresivo, con tasas más altas de recurrencia temprana, metástasis visceral y del sistema nervioso central y peor supervivencia de la enfermedad (Telli, 2106).

Debido a la ausencia de receptores, se investiga a nivel celular y molecular para la identificación de biomarcadores tumorales, con la finalidad de diagnóstico, pronóstico, seguimiento y blancos terapéuticos, figurando las alteraciones epigenéticas como tales biomarcadores en el cáncer (Verma & Badve, Epigenetic Mechanism in Breast Cancer, 2016).

Las alteraciones epigenéticas están involucradas en procesos de metilación del ADN, modificaciones de las histonas, expresión del ARN no codificante y remodelación de la cromatina. Estos procesos están comprometidos con funciones normales celulares durante varias etapas de

la vida como embarazo y envejecimiento, así como en procesos anormales como transformación maligna celular y resistencia terapéutica (Verma & Badve, Epigenetic Mechanism in Breast Cancer, 2016) (Ambrosone, Hong, & Goodwin, 2015).

Numerosos procesos biológico así como exposiciones ambientales intervienen y favorecen las alteraciones epigenética, puntualmente se reporta que los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama incluyen, edad avanzada (más de 50 años de edad), edad temprana en la menarquia, edad avanzada en la menopausia, primer parto después de los 35 años, nuliparidad, antecedentes familiares de cáncer de mama, obesidad, factores dietéticos (como una dieta alta en grasas) y exposición a altas dosis de radiación en el tórax antes de los 35 años (Coleman & Tsongalis, 2017) (Ambrosone, Hong, & Goodwin, 2015).

En el cáncer de mama, se ha encontrado que la alteración epigenética que comprende la sobreexpresión de HDACs se asocia con tumorigénesis y agresividad de pronóstico, tales enzimas están presentes en las modificaciones postraduccionales de las histonas como la acetilación de las histonas. Estas enzimas se reportan como modificadoras de la cromatina que participan en la regulación de muchos aspectos de la biología celular, incluida la diferenciación tisular, la autofagia, la apoptosis, la migración, la mitosis y la angiogénesis.

Diversos estudios sostienen la afirmación de la sobreexpresión de HDACs en cáncer de mama, en 2017 Witt *et al.*, realizo un estudio en líneas celulares BPLER y HMLER, líneas celulares tumorigenicas y demostró que la expresión de HDAC-1 y HDAC-7 participa en la regulación del fenotipo de las células madre del cáncer las cuales representan un desafío clínico significativo por la resistencia a las terapias convencionales además de tener papeles esenciales en la metástasis y la recaída tumoral (Witt, y otros, 2017). En 2016 Chang Lin *et al.*, reporta la sobreexpresión de HDAC-8 en etapas tardías y progresión tumoral en (Chang Lin Hsieh, 2016), y un estudio adicional muestra que HDAC-1, HDAC-6 y HDAC-8 son las responsables de la invasión y sobre expresión celular (Soon YoungPark, 2011).

1.2.1.1. Fármacos para el cáncer de mama.

La terapia del cáncer de mama es tan diversa como lo son los tipos de canceres, sin embargo, se ha tenido una esperanza en los fármacos epigenéticos, tales como los inhibidores de HDAC asocian con la capacidad de inhibir la actividad catalítica de las HDAC's.

Entre los inhibidores que se han estudiado encontramos los mencionados en la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de los inhibidores de histona desacetilasa (Connolly & Stearns, 2012) (Verma & Banerjee, Epigenetic Inhibitors , 2015).

Grupos	Inhibidor	Otros nombres
Ácidos hidroxámicos	Vorinostat	Zolinza, ácido hidroxámico suberoylanilide (SAHA)
	Panobinostat	LBH589
	Belinostat	PXD101
	CHR-3996	
	Tefinostat	CHR-2845
	JNJ-26481585	
Benzamidas	Entinostat	MS-275
	CI-994	Tacedinaline, acetyldinaline
	MGCD-0103	Mocetinostat
Péptidos cíclicos	Romidepsin	Istodax, depsipeptide
	FK228	Depsipeptide
	Entinostat	MS-275
Ácidos grasos	Ácido Valproico Fenilbutirato	

Un grupo de investigación de la ESM-IPN diseño y sintetizo derivados de ácido valproico con la finalidad de mejorar sus limitaciones de eficacia y desventajas farmacocinéticas, de los cuales el “N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida” (*o*-HO-AAVPA), es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales *in vitro* a una concentración mucho menor que la requerida para conseguir el mismo efecto con VPA, sin embargo este mismo compuesto al realizar estudios de farmacocinética se reportó que tenía una baja biodisponibilidad (Correa-Basurto, y otros, 2019) (Prestegui-Martel, y otros, 2016). En general otros quimioterapéuticos, tiene debilidades que limitan su eficacia *in vivo*: eliminación, metabolismo rápido y pobre acumulación específica en el

tumor que conduce a efectos secundarios y debido a tales problemáticas se han creado diversos sistemas como transportadores de fármacos donde se involucran los materiales poliméricos.

Entre algunos ejemplos que se pueden citar como transportadores de fármacos están los sistemas micelares, tal como el reportado por Kutty *et al.*, donde se llevó a cabo una combinación de SAHA y paclitaxel en un sistema micelar basado en DSPE-PEG2000 y D- α -tocoferil polietilenglicol 1000 succinato resultando un disminución del IC₅₀ en 5.91 veces comparado al efecto de ambos compuestos sin micela (Kutty, Tay, Lim, Feng, & Leong, 2015). El fármaco paclitaxel a pesar de que no es un compuesto epigenético, se emplea para cáncer y para mejorar su eficacia, se encapsulo en un sistema micelar basado en PLA-PEG-PLA y PEG-PLA-PEG ambos sistemas tuvieron un comportamiento de liberación retardada, con mayor tiempo en el segundo sistema, atribuido a las propiedades del PEG que tiene características de sigilo, es decir que tiene una protección del activo ante diversos mecanismos de degradación en el interior de una célula o tejido (Mishra, Nayak, & Dey, 2016) (Guosen, Lwin Lwin, Jie, & Subbu, 2007), el paclitaxel también se encapsulo en micropartículas de PLA-PEG-PLA y se observó que hay una alta hidrofiliidad cuando el PEG se une químicamente a un PLA originalmente hidrófobo, proporcionando a las micropartículas cargadas con fármaco, biocompatibilidad y tiempo de circulación prolongado (Ouyang, y otros, 2009). Otra aplicación de este sistema PLA-PEG es en nanogeles para la liberación de Camptotecina fármaco empleado para cáncer de mama entre otros, este sistema, mejora la estabilidad sin agregación y su liberación es por difusión, a velocidad estable y controlable durante al menos 20 días (Wen-Chuan, Yuan-Chung, & I-Ming, 2006).

2. Justificación

Datos reportados en la OMS, indican que, a nivel mundial, los cinco tipos de cánceres más comunes en la mujer por orden de frecuencia, son: cáncer de mama, pulmón, estómago, colon/recto y cuello del útero. Adicionalmente se reporta que el cáncer de mayor impacto en la salud pública es el cáncer de mama y dentro de este el subtipo más agresivo es el cáncer triple negativo. Debido a esto existe una necesidad creciente para el desarrollo de sistemas terapéuticos contra el cáncer que logren una eficiencia, los hidrogeles a base de polímeros biodegradables como el PLA y biocompatibles como el PEG, han sido y siguen siendo utilizados por las ventajas que representan, entre ellas la reducción de la inmunogenicidad y una mayor vida media de los medicamentos en suero, en este sentido, la administración local de quimioterapéuticos por medio de la implantación del hidrogel-fármaco puede ser una vía práctica para reducir la exposición sistémica y alcanzar una concentración efectiva del fármaco en un área específica, así como optimizar los efectos terapéuticos. Por lo tanto, este trabajo tiene el propósito diseñar un hidrogel que permita la liberación modificada del *o*-HO-AAVPA y se evalué en células de cáncer de mama.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Preparar y evaluar un hidrogel de PLA-PEG-PLA para la liberación modificada de *o*-HO-AAVPA en células de cáncer de mama.

3.2. Objetivos particulares

- Sintetizar un copolímero de PLA-PEG-PLA con propiedades de degradabilidad.
- Obtener un hidrogel a partir del copolímero.
- Encapsular el compuesto *o*-HO-AAVPA en el hidrogel.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación *in vitro*.
- Medir la viabilidad de células de cáncer de mama en contacto con el sistema hidrogel-fármaco.

4. Hipótesis

El hidrogel libera el *o*-HO-AAVPA de forma modificada y disminuye la viabilidad de células de cáncer de mama *in vitro*.

5. Materiales y metodologías

5.1. Materiales

Todos los reactivos y disolventes utilizados en el desarrollo de este trabajo se ocuparon sin purificación adicional. Poli(etilenglicol) (PEG, MW 4 kDa)(polioles, Mexico). Lactide (3,6-Dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), Octoato estañoso (Tin(II)-2-etilhexanoato, $-\text{Sn}(\text{Oct})_2$), anhídrido metacrílico y 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959, I2959) de Sigma-Aldrich y diclorometano (DCM), éter dietílico, hexano de Fermont.

5.2. Métodos

5.2.1. Copolímero tribloque ABA

El copolímero tribloque PLA-PEG-PLA se sintetizó (ver figura 2) por apertura de anillo de la lactida en presencia de PEG como un macromonomero, a 150 °C por 3 horas, se usó $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador y en atmósfera inerte (atmósfera de N_2). El copolímero tribloque se solubilizó en diclorometano y se precipitó con un exceso de éter dietílico a -15 °C, el precipitado se filtró y lavo con hexano para finalmente secarlo a vacío hasta tener un peso constante (Du, Lemstra, Nijenhuis, Van Aert, & Bastiaansen, 1995).

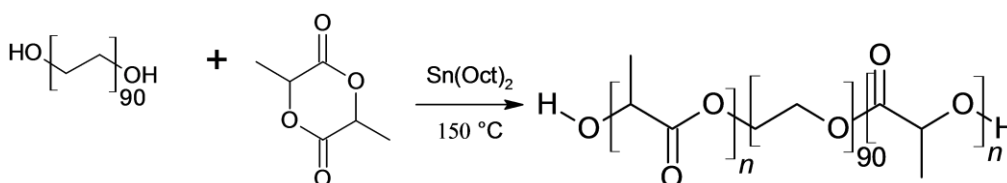


Figura 2. Síntesis del copolímero tribloque PLA-PEG-PLA

5.2.2. Acrilación del copolímero

La acrilación del copolímero (ver figura 3) se llevó a cabo por una reacción de microondas a 1500 watts, en presencia de anhídrido metacrílico, el producto se lavó en diclorometano y precipitó en un exceso de éter dietílico a -15 °C, el precipitado se filtró y lavo con hexano y se almaceno a vacío hasta tener un peso constante o bien hasta su uso (Van Hove, Wilson, & Benoit, 2013).

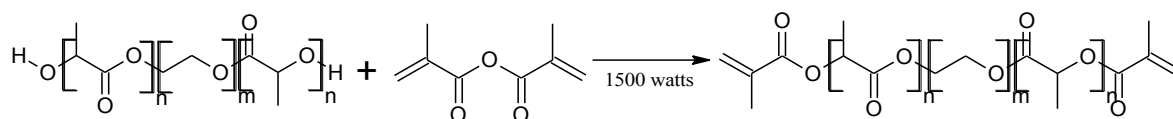


Figura 3. Acrilación del copolímero tribloque PLA-PEG-PLA

5.2.3. Foto polimerización

El producto acrilado se adicionó a una solución de fotoiniciador I2959/PBS pH 7.4, a manera que se obtuvieron dos soluciones, 5% de I2959 (HA) y 10% de I2959 (HB) con respecto al copolímero acrilado. Preparada la mezcla, se colocó en un molde de teflón y placas de vidrio para exponerse a luz UV a una longitud de onda de 365 nm durante tres minutos (ver figura 4).

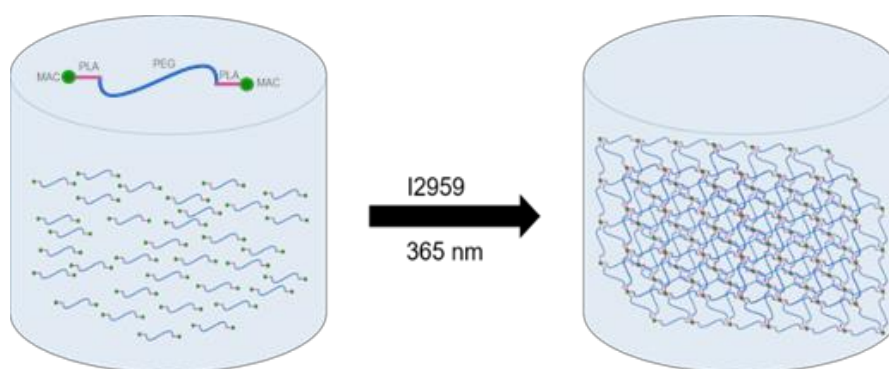


Figura 4. Fotopolimerización del copolímero tribloque metilacrilado

Los geles empleados para pruebas posteriores, se cortaron a manera de cilindro, con dimensiones de 2 mm x 2 mm y con peso de 29 ± 2 mg los HA y 31 ± 1 mg los HB.

5.2.4. Grado de hinchamiento

El grado de hinchamiento depende de factores tales como la densidad de cadenas entrecruzadas, la naturaleza del disolvente y la interacción del disolvente con los polímeros, a través del grado de hinchamiento se conocen el equilibrio de hinchamiento, que es la fracción de volumen del polímero en estado hinchado. Dicho parámetro se midió con tres réplicas del hidrogel, los disolventes fueron PBS pH 7.4, PBS pH 5.5, etanol 96°, medios de cultivo DMEM y RPMI 1640, a temperatura constante de 37 °C y en las medidas de peso se tomaron a diferentes tiempos en un periodo de 9 días.

Esta técnica se siguió de la siguiente manera; una vez preparados los cilindros de hidrogel de 2 x 2 mm y con peso promedio de 29 ± 2 mg los HA y 31 ± 1 mg los HB, cada muestra de gel previamente pesada en estado seco, se colocan en tubos de micro centrifuga de 2 mL con el respectivo medio a hinchar, del cual se empleó un volumen de 500 μ L y se mantuvieron a temperatura constante de 37 °C.

Las mediciones fueron tomadas en tiempos variables durante nueve días, para llevar a cabo esta medición se extraía el gel del fluido y se recibía en papel para tejidos (Kimtech science Brand), con la finalidad de no dañar la integridad física del gel y quitar el fluido superficial, se pesaba sobre un recristalizador y posteriormente se regresaba al tubo que le correspondía, para continuar el contacto con el fluido.

Una vez recolectados los datos se empleó la siguiente ecuación para calcular el grado de hinchamiento (Eq.1)

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{\text{peso humedo del hidrogel} - \text{peso seco del hidrogel}}{\text{peso seco del hidrogel}} \times 100 \dots\dots\dots(\text{Eq.1})$$

5.2.5. Curvas de calibración para la medición del *o*-OH-AAVPA

Se midieron dos curvas de calibración para cuantificación del *o*-OH-AAVPA. La diferencia entre las curvas fue la matriz líquida de disolución del compuesto, en donde una fue de etanol absoluto y la otra fue de etanol 5 % / PBS 7.4.

La razón por la cual se utilizaron diferentes matrices líquidas fue debido a que, en la matriz de etanol absoluto, permite la cuantificación de fármaco encapsulado en el hidrogel, mientras que en la matriz de etanol 5 % / PBS pH 7.4, fue para medir la liberación.

5.2.6. Encapsulamiento del *o*-HO-AAVPA

La encapsulación, se define como el recubrimiento o atrapamiento del principio activo dentro de una matriz (Drioli & Giorno, 2016). Se evalúa a través de la eficiencia de encapsulamiento (% EE), que se define como la concentración del activo incorporado y se detecta en la formulación sobre la concentración inicial, apegándose a la siguiente ecuación.

$$\%EE = \frac{W_t}{W_i} \times 100 \dots\dots\dots (Eq. 2)$$

Donde W_t es el valor total y W_i es el valor inicial, los cuales se pueden determinar usando un método espectroscópico o cromatográfico.

La manera en que se determinó en este trabajo, fue a través de espectroscopia UV, por la siguiente metodología:

Se colocaron muestras por triplicado de HA y HB, en tubos de microcentrifuga de 2 mL con etanol absoluto y con etanol absoluto / *o*-OH-AAVPA

Se dejaron en incubación a 37 °C durante 4 horas, tiempo en el cual alcanzan su equilibrio de hinchamiento, dato obtenido al realizar la cinética de hinchamiento, posteriormente se extrajo cada gel de la solución y se midió la absorbancia de cada solución, dando un total de 12 mediciones, de la señal obtenida se resta la señal del blanco.

El resultado se interpola en la Eq 3., reportada en la parte de resultados, obtenida de la curva de calibración que se llevó a cabo en la matriz líquida de etanol absoluto (ver Figura 15) y el resultado de la interpolación, se resta a la concentración empleada para cada muestra (W_i), con ello obtenemos el valor de W_t . y se sustituyen los valores en la Eq 2.

5.2.7. Liberación *in vitro*

La liberación *in vitro* del compuesto encapsulado en HA y HB, se llevó a cabo por triplicado a una temperatura constante de 37 °C y en modo dinámico (300 rpm), donde cada hidrogel con el compuesto *o*-HO-AAVPA encapsulado, se colocó dentro de tubos de diálisis de membrana de celulosa (Sigma -Aldrich), los cuales se sumergieron en tubos de microcentrifuga en 1.5 mL de solución PBS pH 7.4. Se tomaron alícuotas de 15 µL, reponiendo el volumen extraído, durante cuatro días, en intervalos de tiempo variables. Cada muestra tomada se leyó en el espectrofotómetro (Implent Nanophotometer) a una longitud de onda de 284 nm, y de las lecturas obtenidas en absorbancia se interpolaron en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración (Eq 4).

Los resultados gráficamente se muestran como porcentaje de la concentración acumulada liberada del *o*-HO-AAVPA contra tiempo en horas.

5.2.8. Evaluación biológica

5.2.8.1. Líneas celulares

Los cultivos celulares empleados fueron de líneas celulares tumorales y fibroblastos que cubrieron la función de control. Las células tumorales entre las que se encuentran las MCF-7, MDA-MB 231 y HCC 1937 fueron obtenidas del Laboratorio de Alta Especialidad En Hemato - Oncología del Hospital para el niño IMIEM, se mantuvieron en medio de cultivo RPMI (Medium 1640, Gibco® Thermo Fisher Scientific TM; USA) con el 10% de Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum, Certified, US Origin, Gibco® Thermo Fisher Scientific TM, USA) y 1% de penicilina-estreptomicina, para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 el medio de cultivo se enriqueció con piruvato 2 mM y para la línea HCC-1937 con glutamina 2 mM.

La línea celular de fibroblastos 3T3-swiss, se obtuvieron del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y se mantuvo en medio de cultivo DMEM (Biowest) con 10% de suero fetal bovino (Biowest) y 1% de penicilina-estreptomicina.

5.2.8.2. Determinación de la IC₅₀ del *o*-OH-AAVPA

Los cultivos celulares empleados para la determinación de la IC₅₀ partieron con 5000 células en 247.5 µL, y se usaron placas para cultivo de 96 pozos (p60). Se dejaron en incubación por 48 horas a 37 °C y atmosfera de 5% CO₂, y posteriormente se adicionaron los estímulos del *o*-HO-AAVPA en concentraciones mostradas en la tabla 5, utilizando como vehículo 0.5% de etanol 96° (1.25 µL).

Tabla 6. Estímulos empleados para la determinación de la IC₅₀ en las diferentes líneas celulares.

MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937	3T3 swiss
384.8 µM (stock)	200 µM (stock)
192.4 µM	20 µM
96.2 µM	2 µM
48.1 µM	0.2 µM
24.5 µM	0.02 µM
	0.002 µM

Finalmente se dejaron incubar por 48 horas a 37°C y 5% CO₂ y se cuantifico por la técnica de cristal violeta

5.2.8.3. Viabilidad celular de los hidrogeles con *o*-HO-AAVPA

Este ensayo tiene como objetivo el evaluar la liberación del *o*-HO-AAVPA a partir del hidrogel, y el efecto sobre la viabilidad celular que se cuantifico a través de la técnica de cristal violeta. Para cumplir el objetivo se emplearon cuatro líneas celulares distintas y seis estímulos, como se muestra en la siguiente tabla 6.

Tabla 7. Líneas celulares y estímulos empleados para las pruebas de liberación modificada del *o*-HO-AAVPA, en la columna de estímulos.

Líneas celulares	Estímulos
MDA MB 231	Etanol
MCF 7	Etanol : <i>o</i> -HO-AAVPA
HCC 1937	HA
3T3 Swiss	HB
	HA: <i>o</i> -OH-AAVPA
	HB: <i>o</i> -HO-AAVPA

Previa colocación de los estímulos, se mantuvieron las condiciones establecidas para la determinación de la IC₅₀, con modificación en el tiempo de exposición al estímulo ya que el artefacto empleado como soporte del hidrogel, podía favorecer las condiciones para que los cultivos celulares pudieran contaminarse.

5.2.8.4. Tinción cristal violeta

La tinción de cristal violeta es una técnica de cuantificación indirecta útil para conocer la población de células que mueren tras aplicarle algún tipo de estímulo y comparadas contra un control, ya que tras la muerte celular hay una reducción en la población y por consecuencia disminuye la cantidad de la tinción. A continuación, se ilustra a grandes rasgos como se llevó a cabo la tinción, Figura 5.

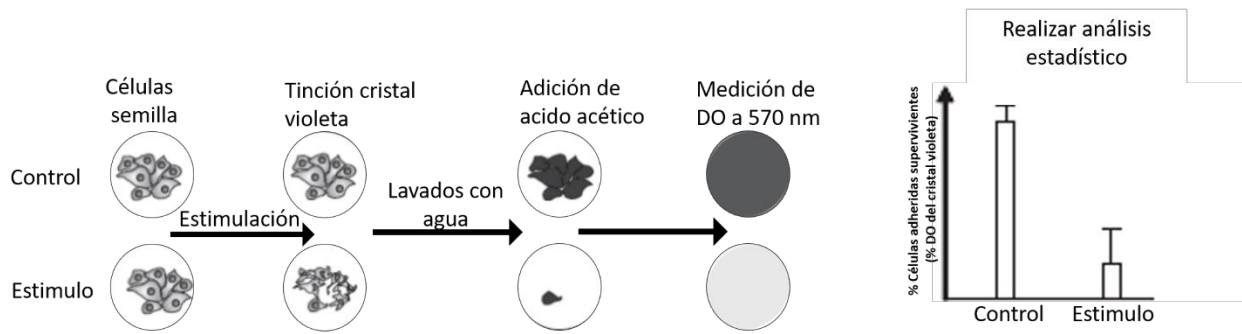


Figura 5. Esquema del ensayo de cristal violeta (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016).

De manera detallada, al término del tiempo del estímulo (48 h para IC₅₀ y 24 h empleando el hidrogel) se fijaron las células con formaldehído al 4 % durante 15 minutos, se lavó la placa con PBS pH 7.4 y las células fijadas se tiñeron con cristal violeta durante 15 minutos, se lavó la placa con agua y se adicionó a cada pozo ácido acético al 10 %.

Los resultados expresados en absorbancia, se tomaron por medio de un fotómetro de microplacas de cultivo Thermo Scientific Multiskan FC donde los resultados se expresan en términos de absorbancia que se midió a una longitud de onda de 570 nm. Finalmente, de estos datos, se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular por cada concentración empleada, y con estos resultados se construyó la curva dosis contra respuesta en el programa IC₅₀ Calculator|AAT Bioquest, para obtener la IC₅₀ del *o*-OH-AAVPA.

6. Resultados y discusión

6.1. FT-IR

Como primera técnica de caracterización del material obtenido, se empleó la espectroscopia infrarroja (FT-IR), técnica que pone de manifiesto los diferentes grupos funcionales como (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C-C, C=C, C≡C, C≡N) los cuales se encuentran definidos en pequeños intervalos de absorción característicos en el espectro. Para los productos de síntesis que se obtuvieron (copolímero, copolímero acrilado e hidrogel), las muestras, antes de ser analizadas se secaron a vacío, se utilizó el espectrómetro Perkin Elmer de Reflectancia Total Atenuada con 32 barridos y un intervalo de longitud de onda de 560 cm^{-1} a $4,000\text{ cm}^{-1}$ con resolución de 8.0 cm^{-1} , dando como resultado los datos presentados en la Tabla 8 y espectros de la Figura 6, que revelan las bandas de absorción características para los productos obtenidos.

Tabla 8. Números de onda observadas en el espectro IR para los diferentes productos de síntesis (copolímero PLA-PEG-PLA, copolímero acrilado e hidrogel)

Grupo Funcional	Copolímero PLA-PEG-PLA	Copolímero acrilado	Hidrogel
(O-H) ν	3,441	---	3,441
(C-H, CH ₂ , CH ₃) ν	2,882	2,882	2,882
(C=O) ν	1,748	1,751	1,748
(C=C) ν	---	1,636	---
(CH ₂) δ	1,466	1,466	1,466
(CH) δ	1,342	1,342	1,342
(C-O) δ	1,103	1,103	1,103

Apreciamos en la Tabla 8, el número de onda al cual absorbieron las diferentes muestras, donde se observa que las tres muestras absorben a las mismas longitudes de onda en algunas regiones del espectro, dejando notar que el grupo hidroxilo no está presente en el copolímero acrilado, el grupo carbonilo está desplazado a la izquierda comparado con el copolímero e hidrogel, en cuanto a los grupos vinilo, solo están presentes en el copolímero acrilado y el hidrogel, sin embargo estos no son los mismos, ya que para el copolímero acrilado se atribuyen estos grupos por la acrilación del compuesto y en el hidrogel como parte del fotoiniciador (I2959). En la Figura

6 la representación del espectro se observa de un número de onda de izquierda a derecha de $4,000\text{ cm}^{-1}$ a 560 cm^{-1} , comenzando con del lado izquierdo, se observan bandas características del grupo (O-H) ν en un número de onda de $3,441\text{ cm}^{-1}$, dichas bandas se manifiestan en el espectro correspondiente al copolímero (banda roja) e hidrogel (banda azul), que bien, este resultado es equiparable con el obtenido por Asadi H. *et al.*, donde hace mención que las bandas a $3,421\text{ cm}^{-1}$ se asocian al grupo hidroxilo, banda que no se observa para el copolímero acrilado, ya que no tiene este grupo funcional, sin embargo para el copolímero e hidrogel se observa unas bandas que corresponden a la presencia del grupo carbonilo ($1,748\text{ cm}^{-1}$) ν y lo podemos sustentar con Asadi H. *et al.*, que menciona que las bandas a $1,757\text{ cm}^{-1}$ corresponden al carbonilo (Asadi, Rostamizadeh, Salari, & Hamidi, 2011), y Hassanvand J. *et al.* indica que a $1,758\text{ cm}^{-1}$ confirma la presencia de carbonilos de ésteres, los tres productos obtenidos tienen la presencia de dichos grupos funcionales, todos en diferente proporción y con una característica particular para el espectro del copolímero acrilado ($(1,751\text{ cm}^{-1})\nu$, banda verde), ya que además de tener una banda mayor respecto a los otros dos productos, vemos que hay un ligero desplazamiento alrededor de $1,720\text{ cm}^{-1}$, característica que se atribuye a los C=C vecinos de los carbonilos en los extremos del copolímero acrilado y para este grupo vinilo vemos la banda a $(1,636\text{ cm}^{-1})\nu$, la cual confirma la formación del producto acrilado, y que es comparable con la obtenida por Asadi H. *et al.*, a $1,638\text{ cm}^{-1}$ (Asadi, Rostamizadeh, Salari, & Hamidi, 2011), sin embargo en el caso del hidrogel también presenta bandas en la región correspondiente a C=C, $1,670\text{ cm}^{-1}$ y se atribuye al fotoiniciador empleado I2959, ya que tiene C=C aromáticos, como parte de su estructura. La banda que confirma en primera instancia que si se formó el copolímero PLA-PEG-PLA, corresponde a los éteres (C-O) formados en la unión de PEG con PLA y esta banda la encontramos a $(1,100\text{ cm}^{-1})\delta$ comparable a la de Asadi H. *et al.* a $1,102\text{ cm}^{-1}$ y con Danafar H. *et al.*, a $1,103\text{ cm}^{-1}$. Otras bandas presentes las encontramos en el intervalo de $3,000\text{ cm}^{-1}$ a $2,800\text{ cm}^{-1}$, donde se aprecian bandas de estiramiento características de los grupos CH, CH₂ y CH₃, y que se sustentan con las obtenidas por Hassanvand *et al.* donde indica que bandas a $2,899\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones de estiramiento C-H de los grupos CH₃ del PEG y nuestro resultado fue a $(2,900\text{ cm}^{-1})\nu$ en los tres espectros con mayor intensidad para el copolímero, se observan bandas de

deformación a $1,456\text{ cm}^{-1}$ se atribuyen a enlaces C-H de grupos metilo y nuestro resultado de ($1,457\text{ cm}^{-1}$) δ , frecuencias para $-\text{CH}_3$ simétrico a $1,356\text{ cm}^{-1}$ nuestro resultado de ($1,343\text{ cm}^{-1}$) δ , bandas de flexión C-C-O del PEG a 952 cm^{-1} y 838 cm^{-1} comparado con nuestro resultado de (959 cm^{-1}) δ y (844 cm^{-1}) δ (Hassanvand Jamadi, Asadi, Yaghoubi, & Goudarzi, 2018). En el trabajo de Danafar *et al.* también se pueden observar bandas a números de onda de $2,844\text{ cm}^{-1}$, $1,466\text{ cm}^{-1}$, $1,343\text{ cm}^{-1}$, $1,283\text{ cm}^{-1}$, 959 cm^{-1} y 842 cm^{-1} , bandas que coinciden tanto con nuestros resultados así como los referenciados con los resultados del FT-IR que se obtuvieron (Danafar, Rostamizadeh, & Hamidi, 2017)

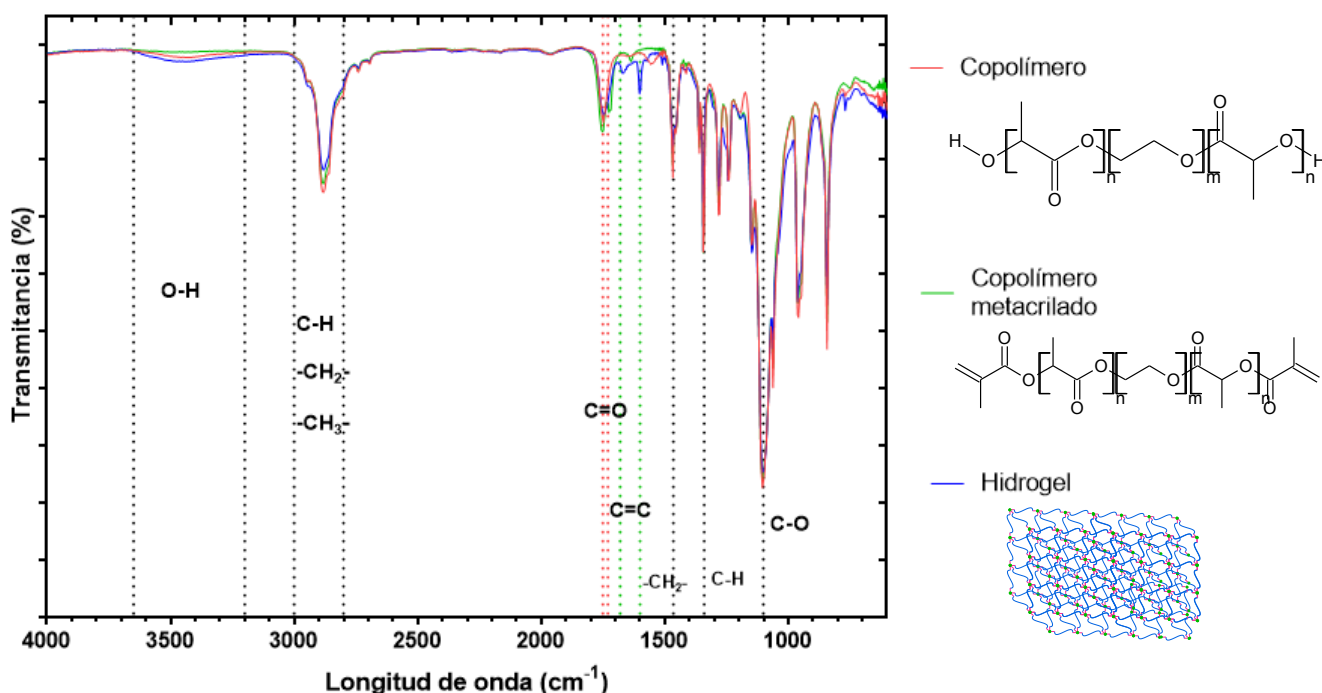


Figura 6. FT-IR y estructuras químicas del copolímero, copolímero acrilado e hidrogel.

6.2. Espectrometría de masas

La segunda técnica empleada como caracterización, fue la espectrometría de masas de tiempo de vuelo TOF/Q-TOF (time-of-flight) / (hybrid quadrupole-TOF), (Fig. 7, 8 y 9) con un intervalo mínimo (m/z) 100 y un máximo de 3200, los espectros presentan forma de una campana gaussiana clásica de polímeros, entre 700 y 730 m/z en donde se observan los picos característicos de los fragmentos con carga múltiple, con diferencias en la abundancia debido a

que las moléculas tienen variaciones en cuanto a su estructura, lo cual modifica la manera en que estas mismas se fragmentan, en la Figura 7 se observa la fragmentación del copolímero, la figura 8 corresponde a la fragmentación del copolímero acrilado y la Figura 9 pertenece al hidrogel, habiendo unidades de masa del monómero del PEG que es óxido de etileno (OE) con masa molecular de 44.03 g/mol y unidades del monómero de ácido poli láctico, lactida (La) con masa molecular de 72.06 g/mol.

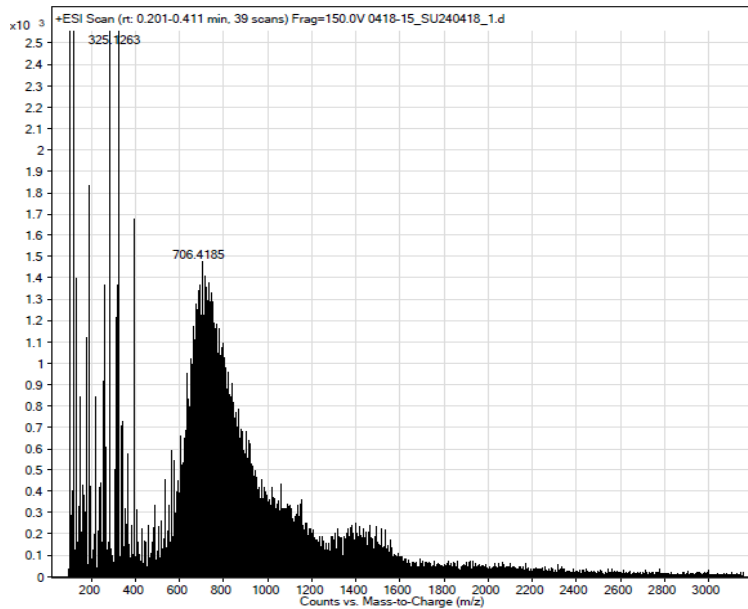


Figura 7. Espectro de masas obtenidos por TOF/Q-TOF del copolímero PLA-PEG-PLA

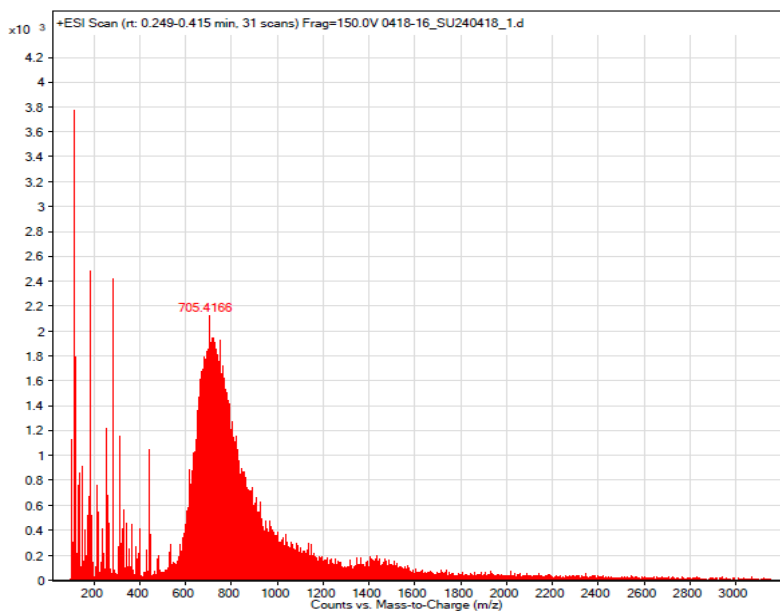


Figura 8. Espectro de masas obtenido por TOF/Q-TOF del copolímero acrilado

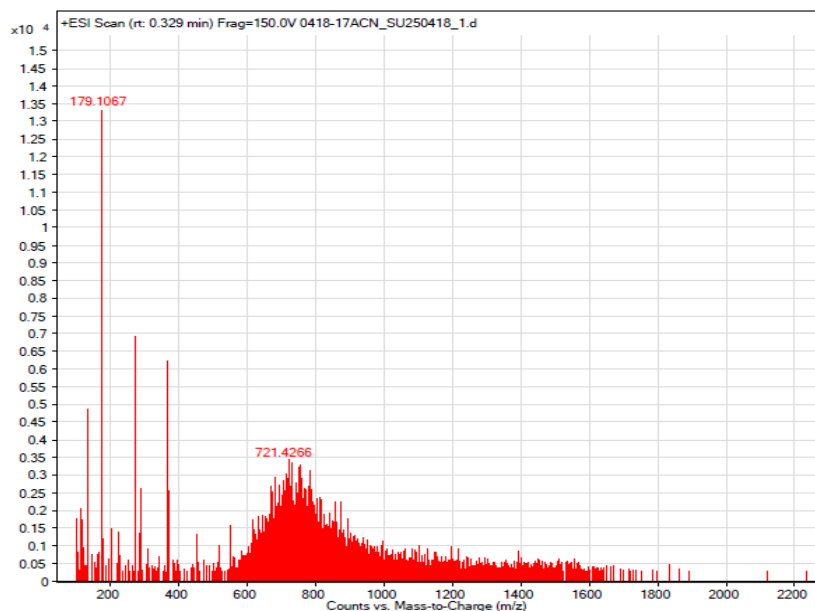


Figura 9. Espectro de masas obtenido por TOF/Q-TOF del hidrogel

6.3. Espectroscopia de RMN ¹H y ¹³C

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C, nos da de manera más certera la estructura de las muestras analizadas.

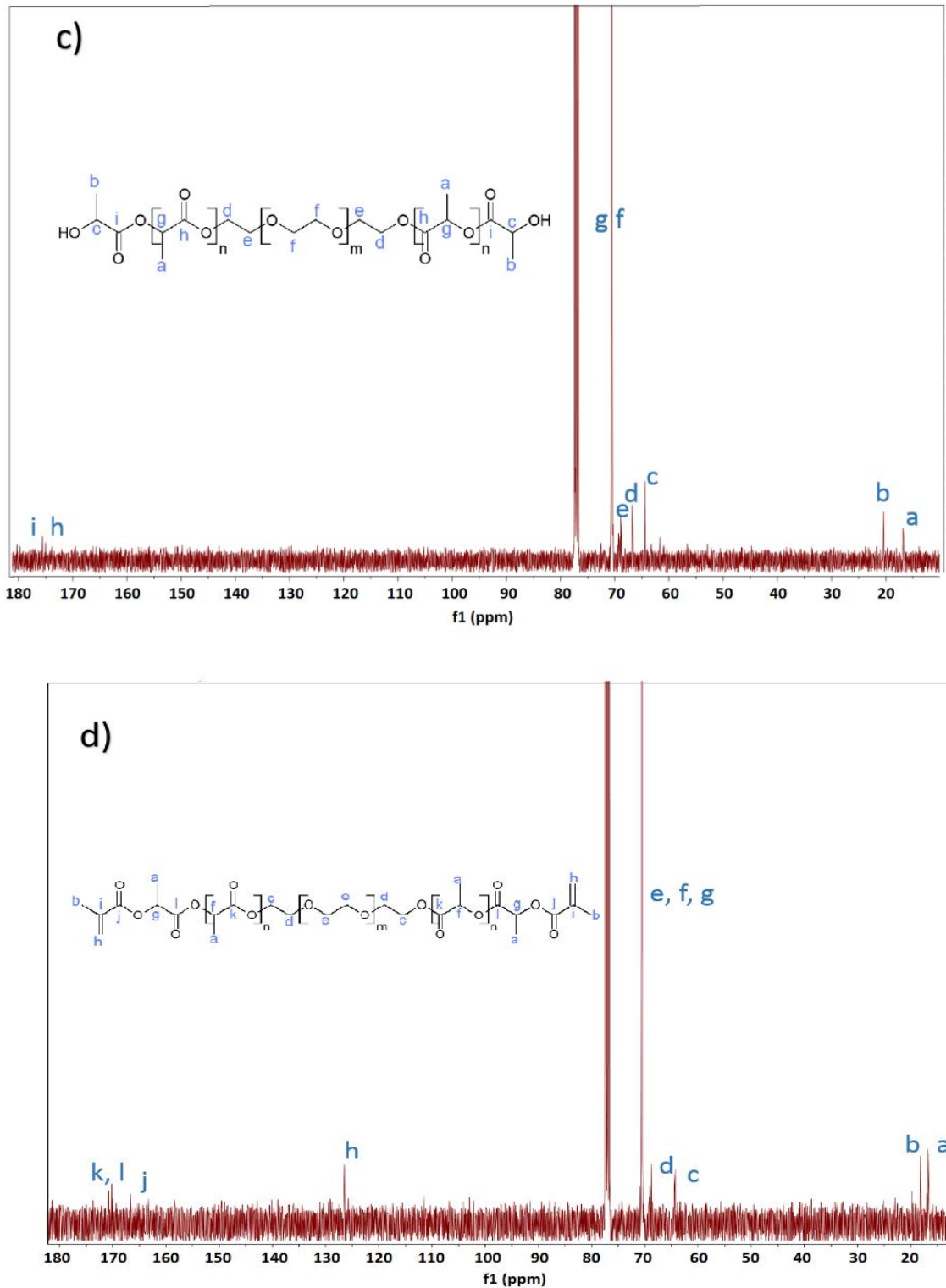


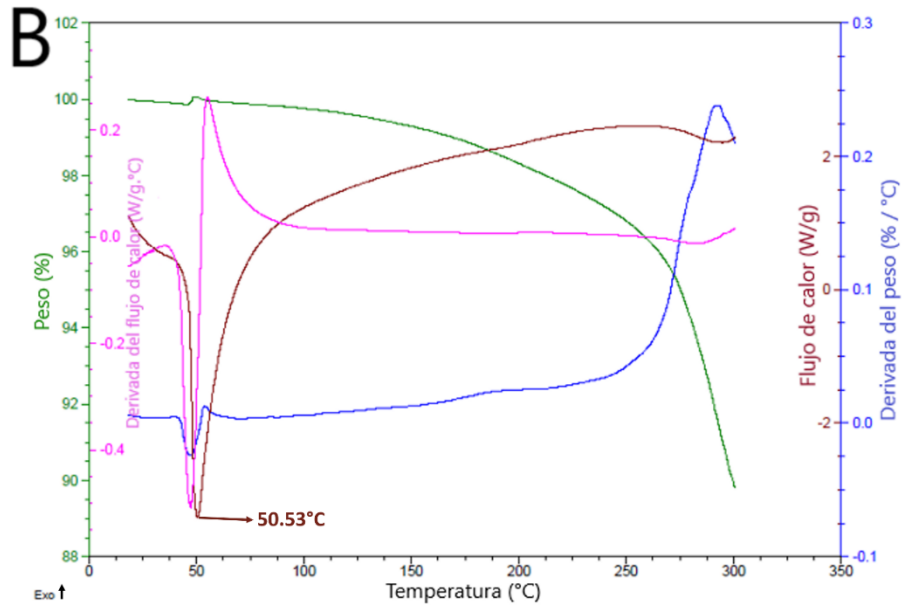
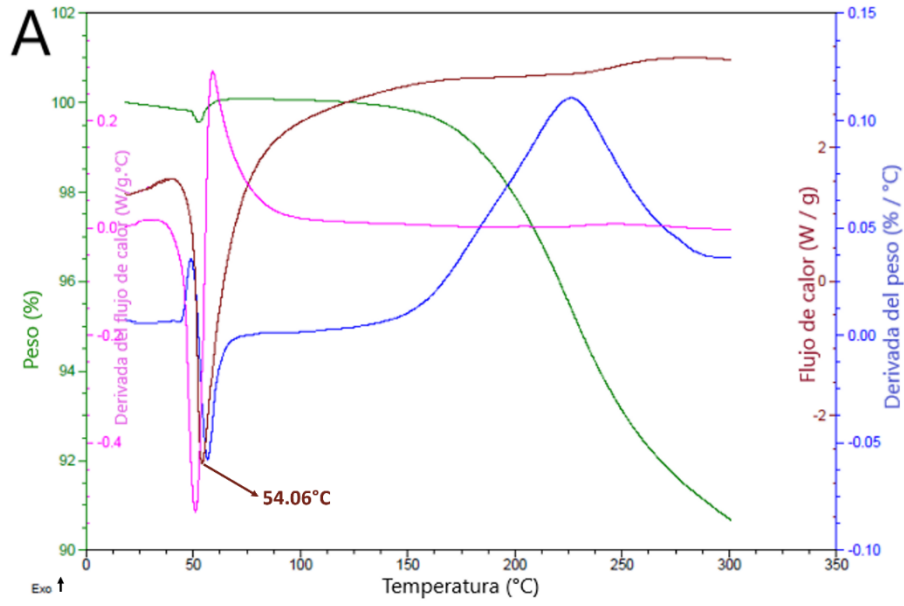
Figura 10. Espectros de RMN ^1H , A. copolímero y B. copolímero acrilado y espectros de RMN ^{13}C , C. copolímero y D. copolímero acrilado.

En los espectros se puede observar las señales como a continuación se describen: Figura 10 a y b para el PLA los picos correspondientes están en frecuencias de 1.4 ppm y 1.6 ppm (-CH₃), por influencia de elementos electronegativos que quitan densidad electrónica y por tanto desprotegen a los hidrógenos directamente unidos, las señales tienden a presentarse a campos más bajos tal como se ven a 3.5 ppm (-OH), y 3.8 ppm (-CH), 4.3 ppm (-CH), 4.4 ppm (-CH₂) y 5.2 ppm (-CH). Las señales para el PEG se presentan principalmente a 3.6 ppm (-CH₂-) y si bien, es de notar, es el pico principal debido a que es el polímero de mayor peso molecular, en la figura 10b se observan nuevas señales que corresponden a los extremos acrilados, a 2 ppm se encuentra el (-CH₃) y los picos entre 6.1 ppm y 6.3 ppm corresponden al (=CH₂), dichas señales coinciden con las reportadas en un artículo de Yue Ding *et al.*, donde se caracteriza el tribloque por RMN ¹H y reporta que las señales de 3.5 a 3.8 ppm son asignadas a los protones de metileno del PEG y las señales de los protones correspondientes al segmento de PLA aparecen de 4.8 a 5.2 ppm y de 1.3 a 1.6 ppm (Ding, y otros, 2018).

En la figura 10 C y D que corresponden a los espectros de RMN ¹³C, para el PLA pertenecen las señales en 16 ppm, 20 ppm, 65 ppm, 67 ppm, 68 ppm, 175 ppm y 176 ppm, las señales de carbono para el PEG se observan en 70 ppm, y de misma manera que en los espectros de hidrógeno, se observa el pico más alto, debido a la frecuencia en el polímero, en la figura 10D se observa que aparecen picos alrededor de 170 ppm (C=O) y a 125 ppm que corresponde a los extremos acrilados.

6.4. DSC y TGA

Las propiedades térmicas se analizaron a través de DSC y TGA en un SDT Q600 V20.9 Build 20 a una velocidad de calentamiento de 10.00 °C/min a 305.00 °C (ver figura 11A, B, C y D)



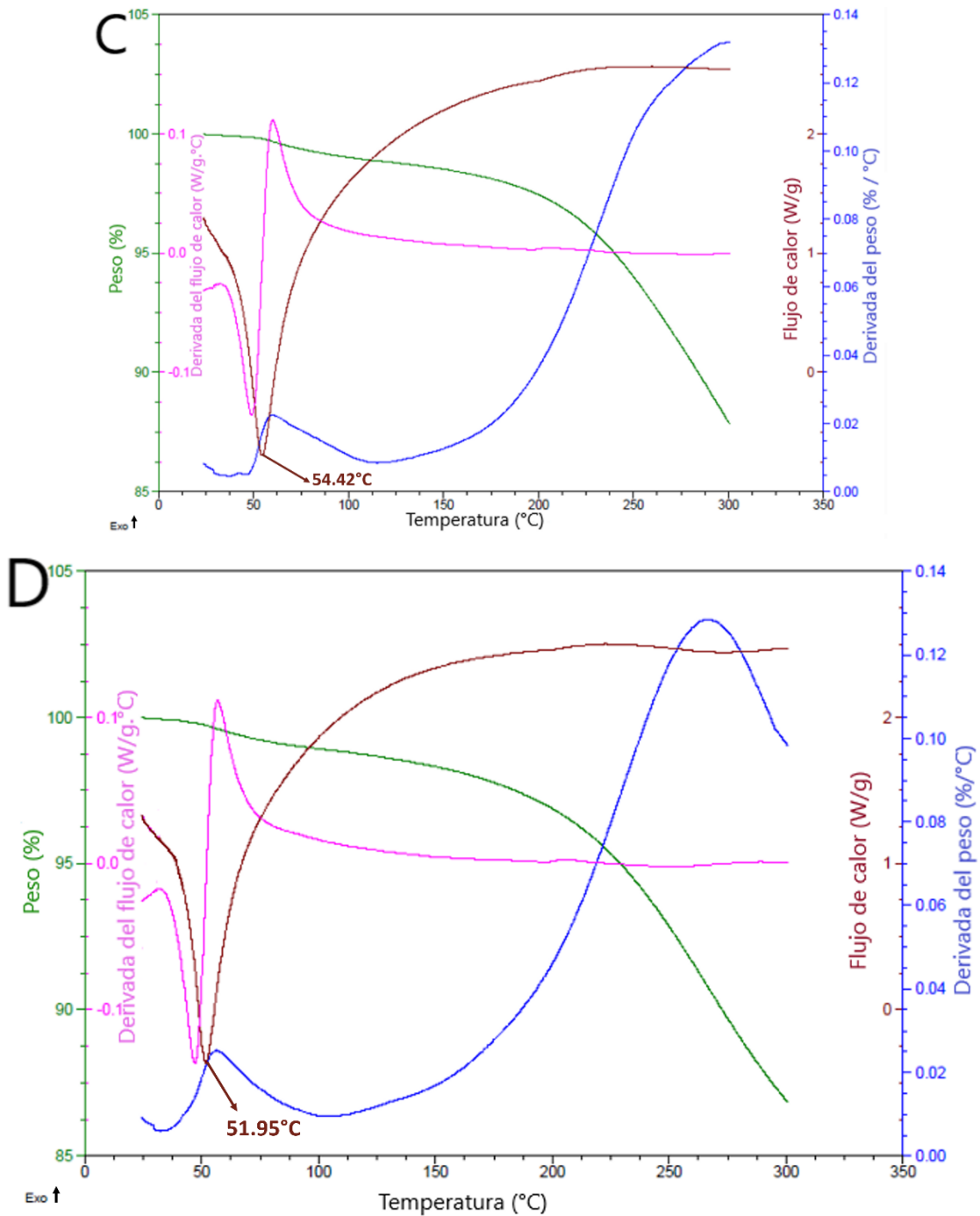


Figura 11. Termogramas de DSC-TGA de los productos A. copolímero, B. copolímero acrilado, C.HA y D. HB.

Las curvas de DSC que se encuentran identificadas en color guinda y la derivada de esta en color rosa, en general presentan un pico alrededor de una temperatura de 50°C, específicamente para

el copolímero se reportó una temperatura de 54.06 °C, el copolímero acrilado de 50.53°C, el HA 54.42°C y el HB 51.95°C (ver figura 11A, B, C y D), la variación en la temperatura de fusión de los compuestos es debido al impedimento de la cristalización del PEG por la presencia tanto del PLA, así como las modificaciones acriladas y el fotoiniciador I2959, estos resultados los podemos comparar con los resultados de Zhang Yang *et al.*, quien también sintetizó un hidrogel de PLA-PEG-PLA como sistema de liberación y que como parte de la caracterización del tribloque empleó DSC teniendo resultados de punto de fusión en un intervalo de 47.4 a 58.4°C, parámetro dentro del cual también quedaron nuestros resultados (Zhang, y otros, 2010), las variaciones en las temperaturas que obtuvimos se pueden relacionar con los datos de Yue Ding *et al.*, donde reporta que la disminución del punto de fusión de 58.86 °C a 39.1 °C es por las cadenas de diferente tamaño del PLA que impiden la cristalización del PEG (Ding, y otros, 2018) . Después de observar dicha transición, la línea va hacia un punto más alto de la línea base que indica, la muestra empieza a descomponerse, sin embargo, para cada muestra hay una temperatura diferente de descomposición exotérmica que corresponde a la misma temperatura de inicio extrapolada por TGA, en la figura 11A esta temperatura está alrededor de 120 °C y 125 °C, para la figura 11B dicha temperatura está en 187.5°C mientras que para las figuras 11C y D están entre 90 y 110 °C. Estos desplazamientos de temperaturas se deben a la modificación del compuesto de partida que es el copolímero, en el caso del copolímero reportamos que se da su degradación total a 225°C y en el caso del copolímero acrilado, por la presencia del grupo terminal acrilado que se insertó en el copolímero, se deja notar que es estable a mayor temperatura, y la degradación total es a 287.°C, sin embargo cuando se da la formación del gel, su estabilidad nuevamente se modifica ya que ahora la estabilidad térmica disminuye, y se supone también esta dependerá de la cantidad del fotoiniciador I2959, para cuando se tiene una cantidad mayor de este fotoiniciador, la estabilidad disminuye como se ilustra en la figura 11C donde la degradación inicia a 112 °C y termina a 250 °C y figura 11D inicia la degradación a 97.5 °C y termina alrededor de 238 °C, dichas temperaturas se comparan con las reportadas por Yan Kou *et al.*, en un estudio del análisis térmico del PEG, donde documenta que la descomposición térmica del PEG inicia en 249 °C y finaliza a 449 °C (Kou, y otros, 2019), debido a los datos térmicos obtenidos de estabilidad

térmica, se puede tomar en cuenta que las muestras de hidrogeles pueden esterilizarse por autoclave sin que se altere su estructura.

6.5. Microscopia electrónica de barrido.

La morfología y estructura porosa del hidrogel se analizó por microscopia electrónica de barrido (SEM) en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5800LV: alto y bajo vacío, los aumentos a los cuales se permite una vista completa de los hidrogeles fueron a 50x (figura 12A) para el HA y 65 x (figura 12E) para el HB, los aumentos en común fueron de 200x, 1000x y 2500x.

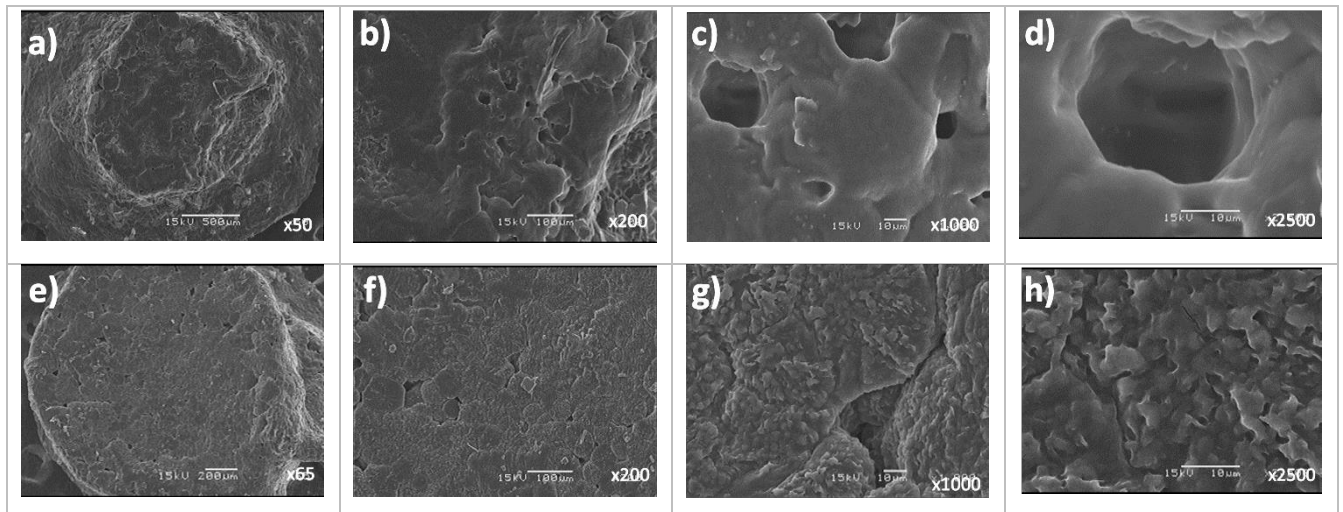
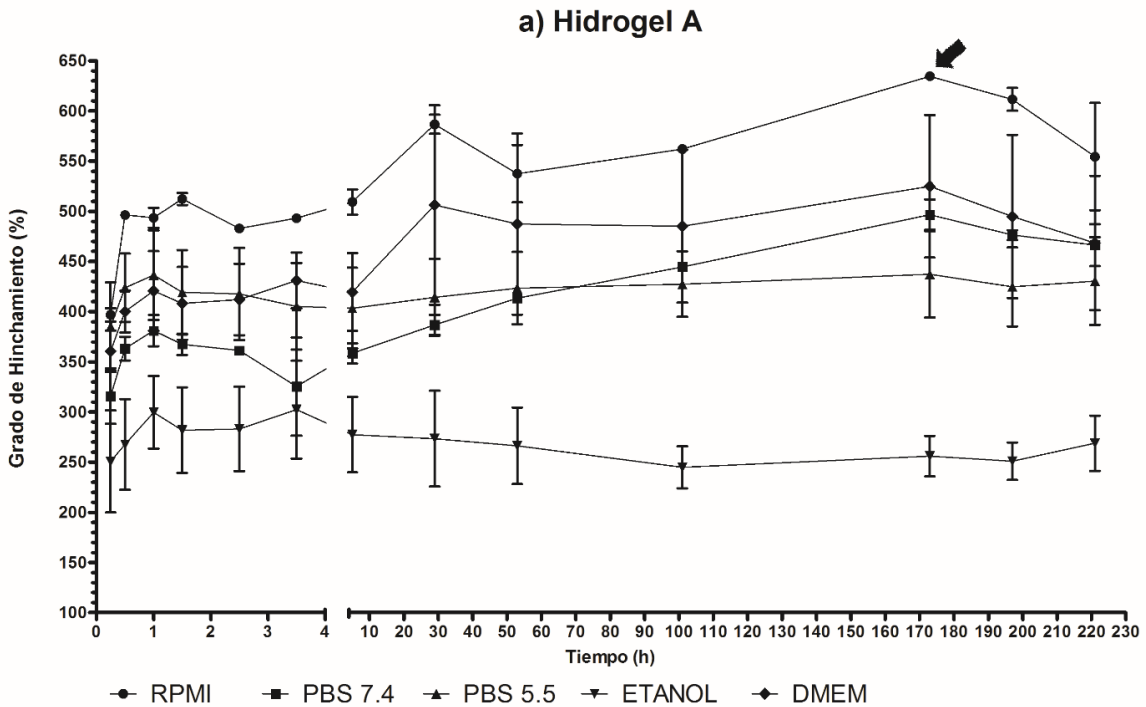


Figura 12. Micrografías por SEM de HA a), b), c) y HB e), f), g) y h).

En las imágenes presentadas en la figura 12., se puede ver la diferencia morfológica al emplearse un mayor porcentaje de reticulador I2959, cuando se emplea 5% de I2959 se obtiene un gel con poros más grandes y con superficies lisas, sin embargo, se observa que cuando la cantidad de I2959 aumenta, la superficie del gel cambia y podemos observar superficies rugosas con pliegues, y los poros formados en estos geles, que se aprecia son de menor diámetro. Estas características afectaron en primera instancia el grado de hinchamiento, el cual se evaluó en diferentes medios (RPMI 1640, DMEM, PBS pH 7.4 y pH 5.5, etanol) a través del tiempo (ver figura 13). Sin embargo si tal morfología se proyectara con aplicaciones de un material implantable ya que es la perspectiva a largo plazo, entonces basándonos en una revisión hecha por M. Bradley Calobrace *et al.*, sobre la seguridad a largo plazo de implantes de pecho texturizados y lisos, se puede decir que HA al tener características lisas favorecería la contracción o rigidez del implante, además el

tamaño de poro que visualmente es más grande que los poros de HB, es menos favorable la adherencia del tejido comparada con la adherencia que se esperaría con los hidrogeles de superficie rugosa que son los del 10%, a su vez estos hidrogeles tendrían una mayor resistencia al movimiento y a la rotación (Calobrace, y otros, 2017).

6.6. Grado de hinchamiento



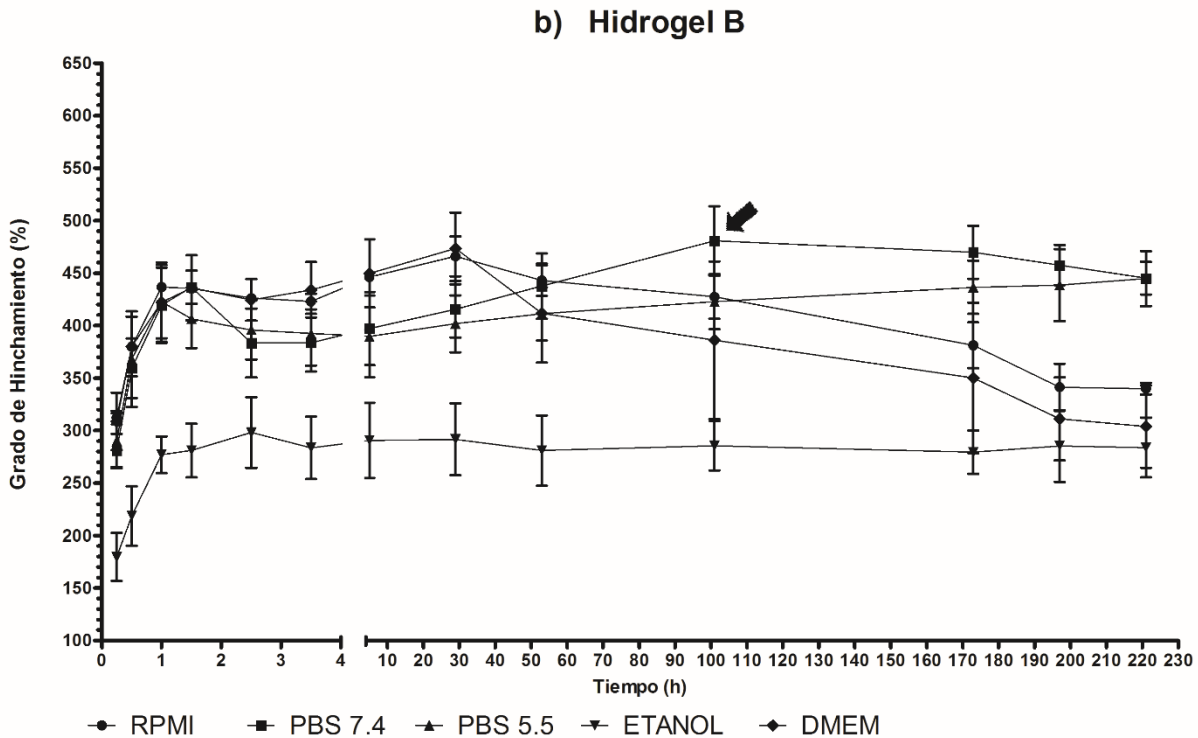


Figura 13. Cinética de hinchamiento de HA (a) y HB (b), utilizando como medios de hinchamiento PBS a pH 7.4 y pH 5.5, etanol 96°, medios de cultivo RPMI y DMEM, se distinguen por colores, con n=3 durante 221 horas.

En la Figura 13., se observa el comportamiento de hinchamiento de HA y HB, en los diferentes medios y se puede apreciar indicando con una flecha el máximo grado de hinchamiento para ambos geles, de los dos hidrogeles probados HA es el que más se hincho con un porcentaje de grado de hinchamiento de 634.5926% y DE. 2.3914 en el medio de cultivo RPMI, en cuanto al HB, su máximo grado de hinchamiento fue de 480.7204% y DE. 33 en PBS pH 7.4.

Se realizó un ANOVA por tres vías donde los factores fueron el tiempo, % de fotoiniciador (% I2959) y medio de hinchamiento, este procedimiento se llevó a cabo en (SigmaStat) y los resultados indican que la interacción entre los factores es estadísticamente significativa con $P < 0.001$, de manera gráfica esto se observa en la figura 13A y B así mismo se presenta la tabla 8 con los resultados de dicha prueba.

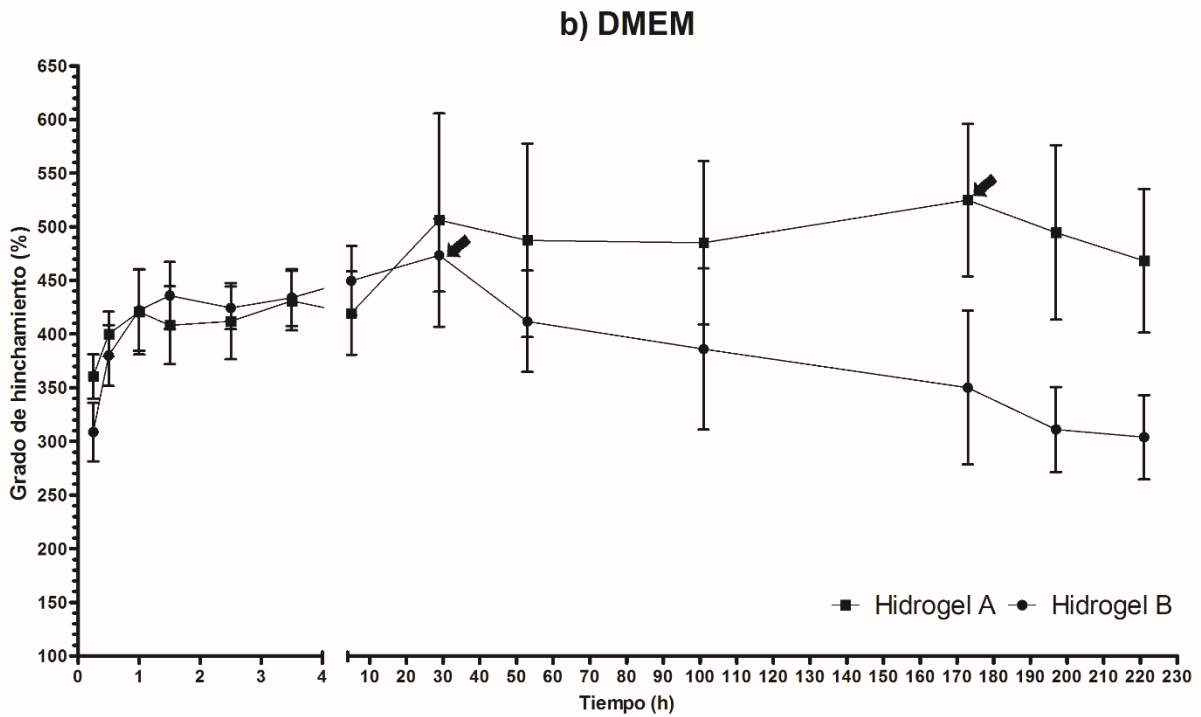
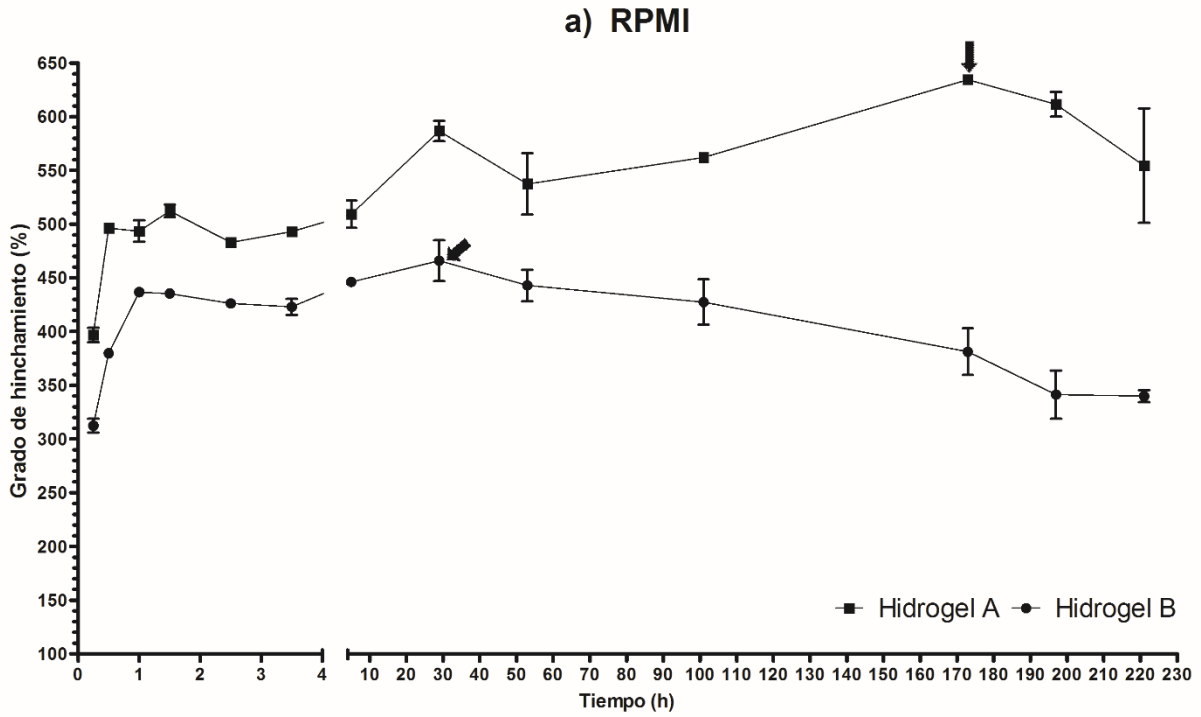
Tabla 9. Tabla de ANOVA, considerando tres factores (tiempo, medio y % I2959) y como respuesta el grado de hinchamiento.

<i>Fuente de variación</i>	<i>DF</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>TIEMPO</i>	12	336847.956	28070.663	23.521	<0.001
<i>MEDIO</i>	4	1662041.973	415510.493	348.171	<0.001
<i>% I2959</i>	1	126641.536	126641.536	106.118	<0.001
<i>TIEMPO x MEDIO</i>	48	173258.816	3609.559	3.025	<0.001
<i>TIEMPO x % I2959</i>	12	96363.216	8030.268	6.729	<0.001
<i>MEDIO x % I2959</i>	4	245368.137	61342.034	51.401	<0.001
<i>TIEMPO x MEDIO x % I2959</i>	48	166896.197	3477.004	2.914	<0.001
<i>Residual</i>	260	310286.206	1193.408		
<i>Total</i>	389	3117704.038	8014.663		

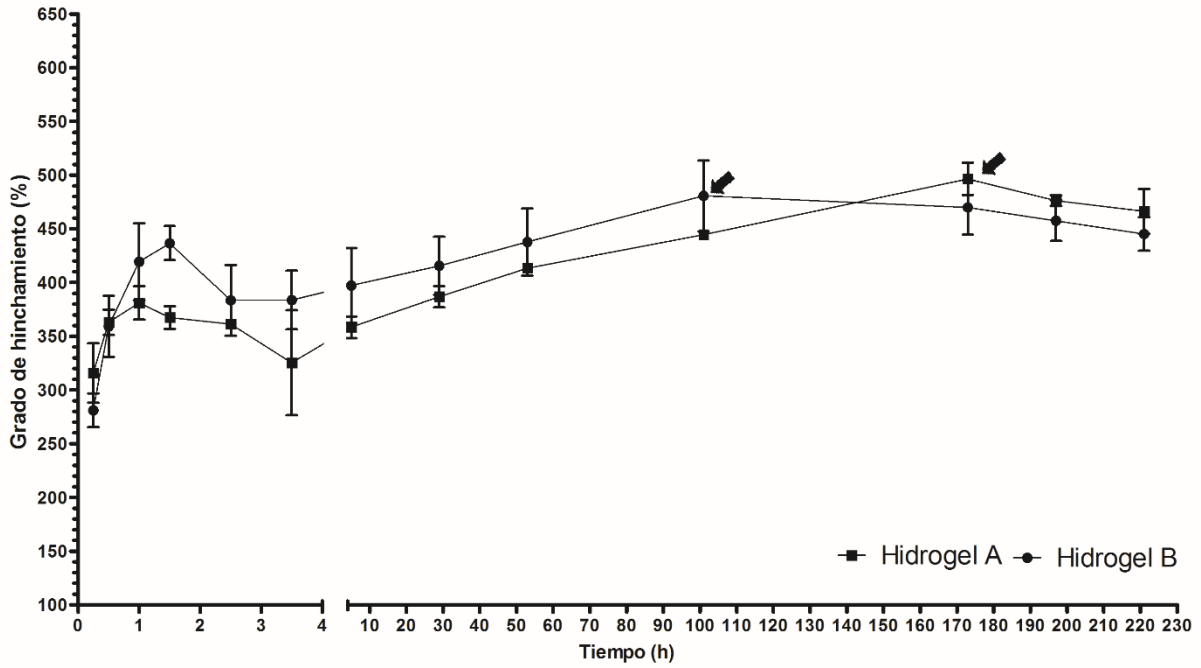
La Tabla 8, muestra de manera general los resultados en cuanto a las comparaciones de los factores tiempo, medio y % I2959 así como la interacción de estos y el resultado para todos es que si hay diferencias estadísticamente significativas.

Al revisarse de manera puntual la comparación del factor MEDIO, podemos ver que hay ciertas comparaciones entre los medios que no son estadísticamente significativas, tal es el caso en los medios siguientes: DMEM vs PBS pH 7.4, DMEM vs PBS pH 5.5 y PBS pH 5.5 vs PBS pH 7.4.,

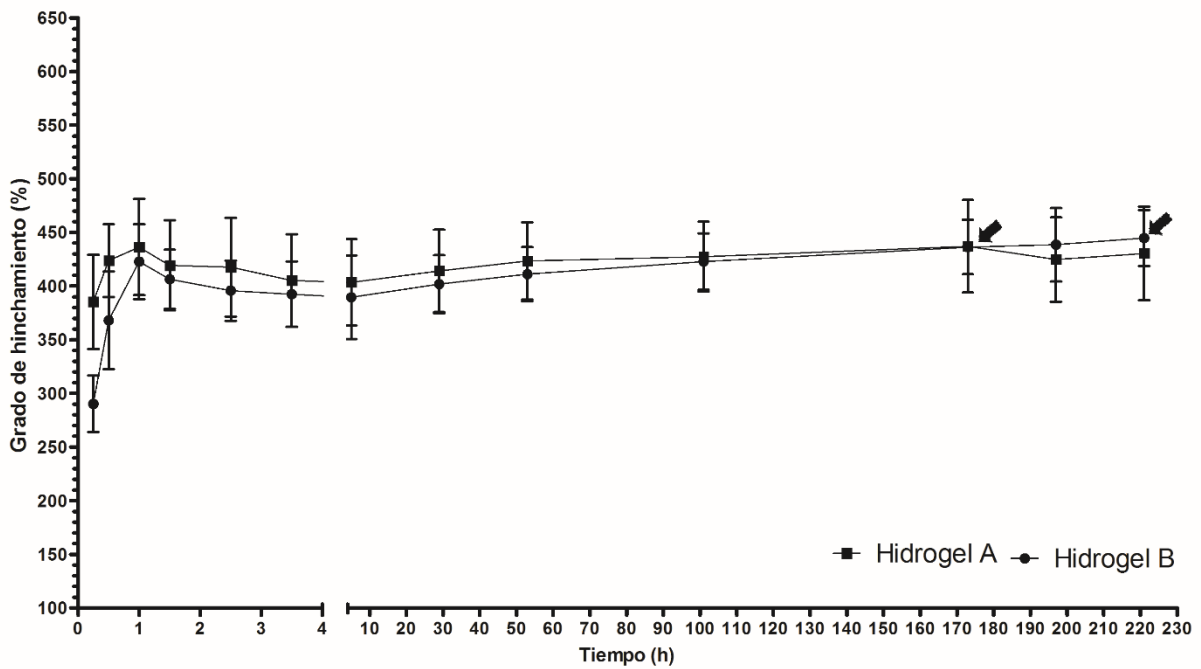
En la figura 14., se observa que HA tiene un mayor grado de hinchamiento en el primer punto de tiempo medido, correspondiente a los 15 minutos, también se puede notar que el HA tardan más en alcanzar su equilibrio de hinchamiento comparado con el HB.



c) PBS pH 7.4



d) PBS pH 5.5



e) Etanol

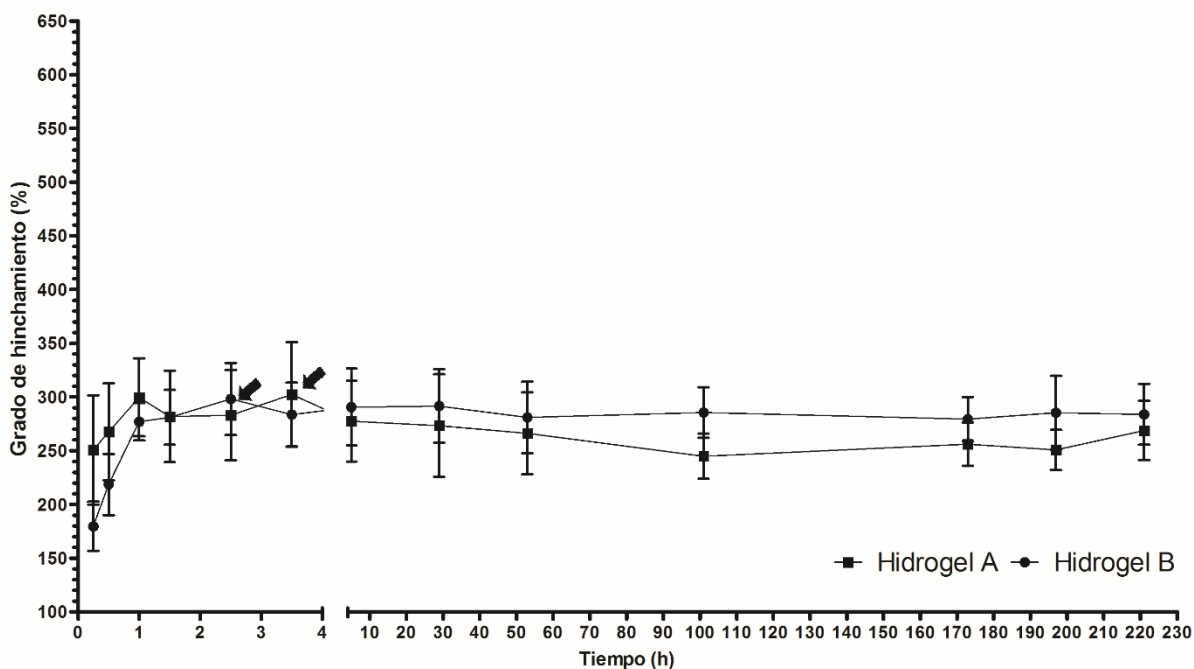
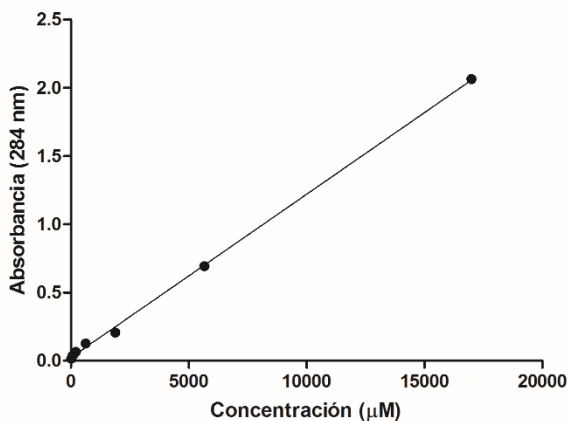


Figura 14. Comparación de las cinéticas de hinchamiento de HA y HB teniendo en común el mismo medio de hinchamiento, a. RPMI, b. DMEM, c. PBS pH 7.4, d. PBS pH 5.5 y e. etanol, con $n=3$, durante 221 h y marcando con la flecha el punto de equilibrio de hinchamiento.

Al realizarse un ANOVA considerando solo a los factores medio de hinchamiento y % I2959, se observa que la interacción de ambos factores no para todos los medios hay diferencias estadísticamente significativas, tales casos se observan en los medios: PBS pH 7.4, PBS pH 5.5 y etanol que corresponden a las figura 14C, D y E.

6.7. Eficiencia de encapsulamiento

Se llevó a cabo una curva de calibración a 284 nm, para medir la concentración de *o*-OH-AAVPA encapsulado, para ello se midieron ocho concentraciones del *o*-OH-AAVPA en EtOH partiendo de la concentración stock de 6000 $\mu\text{g/mL}$ (16998.13 μM) y diluciones 1:3, el resultado es la figura 15., que muestra el comportamiento de las concentraciones (5666.04 μM , 1888.68 μM , 629.56 μM , 209.85 μM , 87.91 μM , 69.95 μM y 23.32 μM) así como la Eq 3 que se emplea para la determinación de las concentraciones del *o*-OH-AAVPA encapsulado en los gels.



$$y = 0.0001197x + 0.02313$$

$$R^2 = 0.9991$$

Eq.3

Figura 15. Curva de calibración para del *o*-OH-AAVPA empleando EtOH como disolvente, y midiendo las siguientes concentraciones (16998.13 μM, 5666.04 μM, 1888.68 μM, 629.56 μM, 209.85 μM, 87.91 μM, 69.95 μM y 23.32 μM).

Al obtener la Eq. 3 y con ayuda de la Eq. 2 que se encuentra en la sección de metodología, se puede conocer la eficiencia de encapsulamiento (% EE) del *o*-OH-AAVPA en los hidrogeles empleados.

Los resultados de la eficiencia del encapsulamiento se obtuvieron utilizando los datos presentes en la tabla 9, en las filas se encuentra cual es el dato numérico encontrado y en las columnas los datos correspondientes por triplicado a los dos diferentes hidrogeles.

Como primer punto se obtuvieron las absorbancias a 284 nm de las aguas madre donde se colocaron los hidrogeles para que se encapsulara el *o*-OH-AAVPA, en la fila donde dice Blanco, es el resultado de sumergir el hidrogel en etanol sin *o*-OH-AAVPA y en la siguiente fila es considerando el compuesto, la diferencia entre ambos resultados se interpola en la Eq 3 y se considera como la concentración que hay de remanente en las aguas madre. Ahora para determinar la concentración de compuesto *o*-OH-AAVPA en el hidrogel, se considera la concentración de *o*-OH-AAVPA que se empleó para el encapsulamiento que fue de 3 0573 μM y se resta la concentración obtenida de las aguas madre, dichos resultados los encontramos en la fila de diferencia en concentraciones (μM) y finalmente se calcula la eficiencia de

encapsulamiento que es a través de la Eq. 2 donde W_i es 3 0573 μM y W_T la diferencia en concentraciones (μM), estos datos se ven representados en la tabla 9.

En la figura 16., se observa una diferencia significativa en la eficiencia de encapsulamiento entre los HA y los HB, quien resulta con mayor porcentaje de encapsulamiento es el HA, con un %EE promedio de 98.17% y DE. 0.9952, mientras que el HB tiene un %EE promedio de 95.59% y DE. 0.4537. Se puede atribuir una mayor eficiencia de encapsulamiento en HA debido a la cantidad de fotoiniciador empleado, ya que el número de reticulaciones es menor y por tanto menos impedido que el hidrogel donde su empleo una mayor cantidad de fotoiniciador (HB), sin embargo en la tabla 9 podemos ver que la desviación estándar para HA es mayor, es decir tendría mayores variaciones para pruebas posteriores tal como la liberación.

Tabla 10. Determinación de la eficiencia de encapsulamiento.

Hidrogel	HB			HA		
Blanco	2.241	2.198	2.230	2.265	2.297	2.306
<i>o</i> -OH-AAVPA	2.408	2.398	2.417	2.391	2.350	2.397
Diferencia de absorbancias	0.167	0.200	0.187	0.126	0.053	0.091
$Y = 0.0001197 * X + 0.02313$	1201.921	1477.61 1	1369.00 6	859.398	249.541	567.001
Diferencia en concentraciones (μM)	29371.079	29095.3 89	29203.9 94	29713.6 02	30323.4 59	30005.9 99
% EE	96.069	95.167	95.522	97.189	99.184	98.145
Promedio	95.59			98.17		
Desviación estándar	0.4537			0.9952		

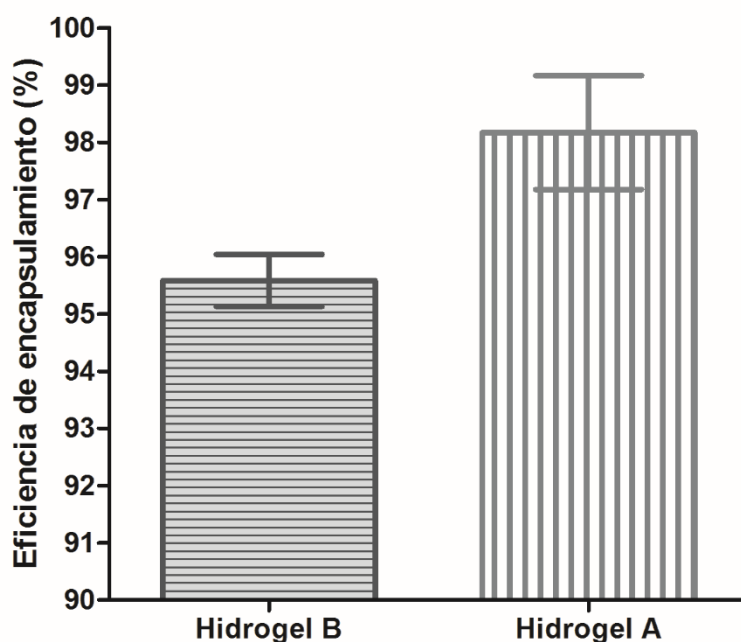


Figura 16. Eficiencia de encapsulamiento del *o*-OH-AAVPA en HA y HB, con n=3

Conocidos los resultados de encapsulamiento de ambos hidrogeles (HA y HB), se procedió a evaluar de qué manera era la liberación del *o*-OH-AAVPA en ambos hidrogeles (HA y HB), se consideró la medición de otra curva de calibración con una matriz de PBS pH 7.4: etanol absoluto (5%), a 284 nm, para ello se midieron ocho concentraciones del *o*-OH-AAVPA en PBS pH 7.4: etanol absoluto (5%) partiendo de la concentración stock de 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2550 μM) y diluciones 1:2, para un ajuste de la gráfica se eliminan dos resultados, quedando de manera gráfica las siguientes concentraciones (2550 μM , 319 μM , 159 μM , 79 μM , 40 μM y 20 μM) el resultado es la Gráfica 3, que muestra el comportamiento de las concentraciones así como la Eq. 4, que se emplea para la determinación de las concentraciones del *o*-OH-AAVPA liberado de los geles.

6.8. Liberación del *o*-OH-AAVPA

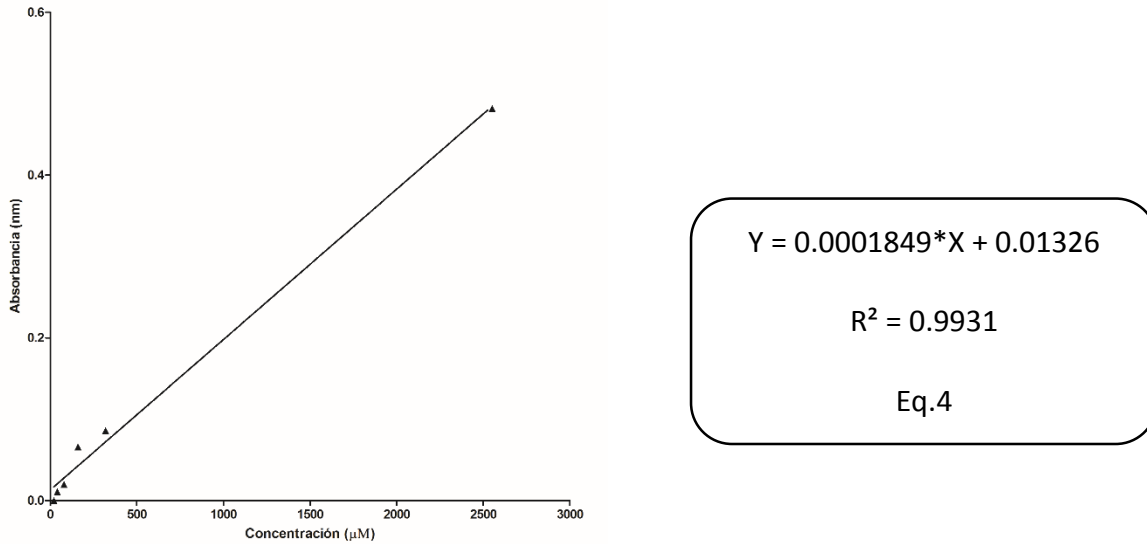


Figura 17. Curva de calibración para el *o*-OH-AAVPA diluido en PBS pH 7.4: etanol absoluto (5%), midiendo las siguientes concentraciones (2550 μM, 319 μM, 159 μM, 79 μM, 40 μM y 20 μM).

La liberación del compuesto en ambos hidrogeles HA y HB, medido en 96 horas la podemos ver representada en la figura 18, donde la concentración de la que se partió fue de 2 550 μM, se observa una mayor liberación por parte del HA.

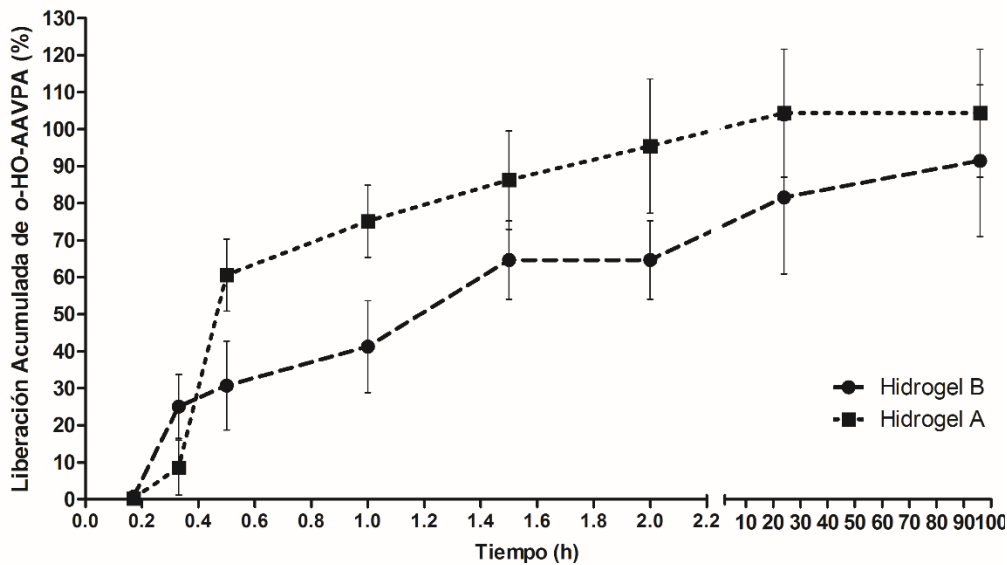


Figura 18. Cinética de liberación del *o*-OH-AAVPA, n=3, 37 °C, 300 RPM y en volumen de 1500 μL.

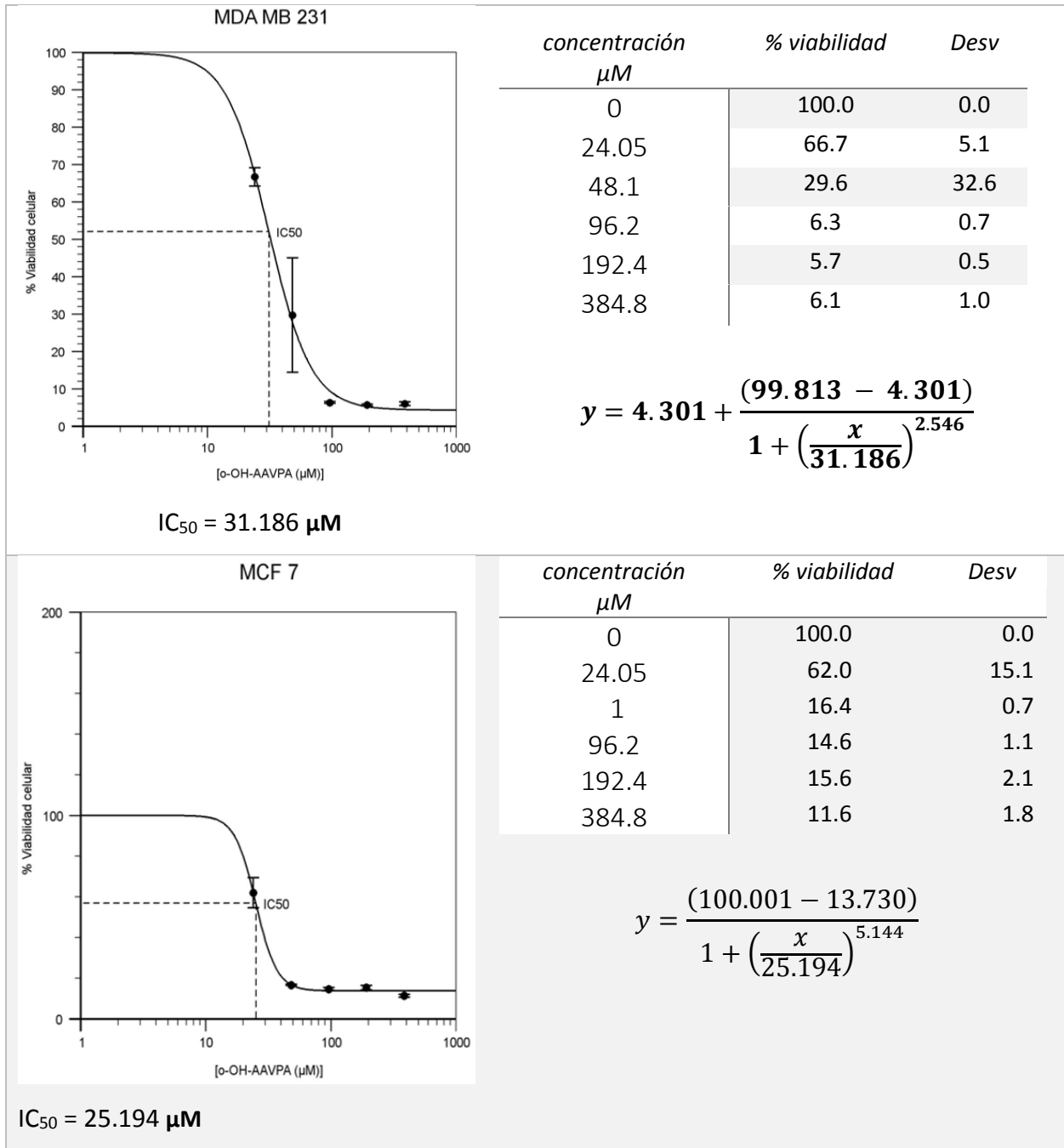
Se realizó una ANOVA de dos factores, considerando como factor al tiempo y I2959, los resultados se muestran en la tabla 10, donde indica que la comparación en el factor tiempo es significativamente diferente, al igual que la comparación en el factor % I 2959, mientras que para la interacción de ambos factores, el efecto de diferentes niveles de tiempo depende de qué nivel de % I2959 esté presente.

Tabla 11. Tabla de ANOVA, considerando dos factores (tiempo y % I2959) y como respuesta el % de liberación acumulado.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>DF</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>TIEMPO</i>	7	34184862.7	4883551.81	42.887	<0.001
<i>% I2959</i>	1	2206890.44	2206890.44	19.381	<0.001
<i>TIEMPO x % I2959</i>	7	2085463.3	297923.328	2.616	0.03
<i>Residual</i>	32	3643879.65	113871.239		
<i>Total</i>	47	42121096.1	896193.534		

6.9. Determinación de la IC₅₀

Los resultados obtenidos al aplicar las concentraciones (Tabla 5) del *o*-HO-AAVPA empleadas como estímulo, en las diferentes líneas celulares, se obtuvieron en términos de absorbancia para posteriormente realizar la transformación a porcentaje de crecimiento celular y mediante una curva dosis respuesta se determinó la IC₅₀ para cada línea celular, a través del programa IC₅₀ Calculator|AAT Bioquest, los resultados obtenidos se encuentran en la figura 19, donde se representan las gráficas, tablas, IC₅₀ y ecuación, obtenidas para cada línea celular.



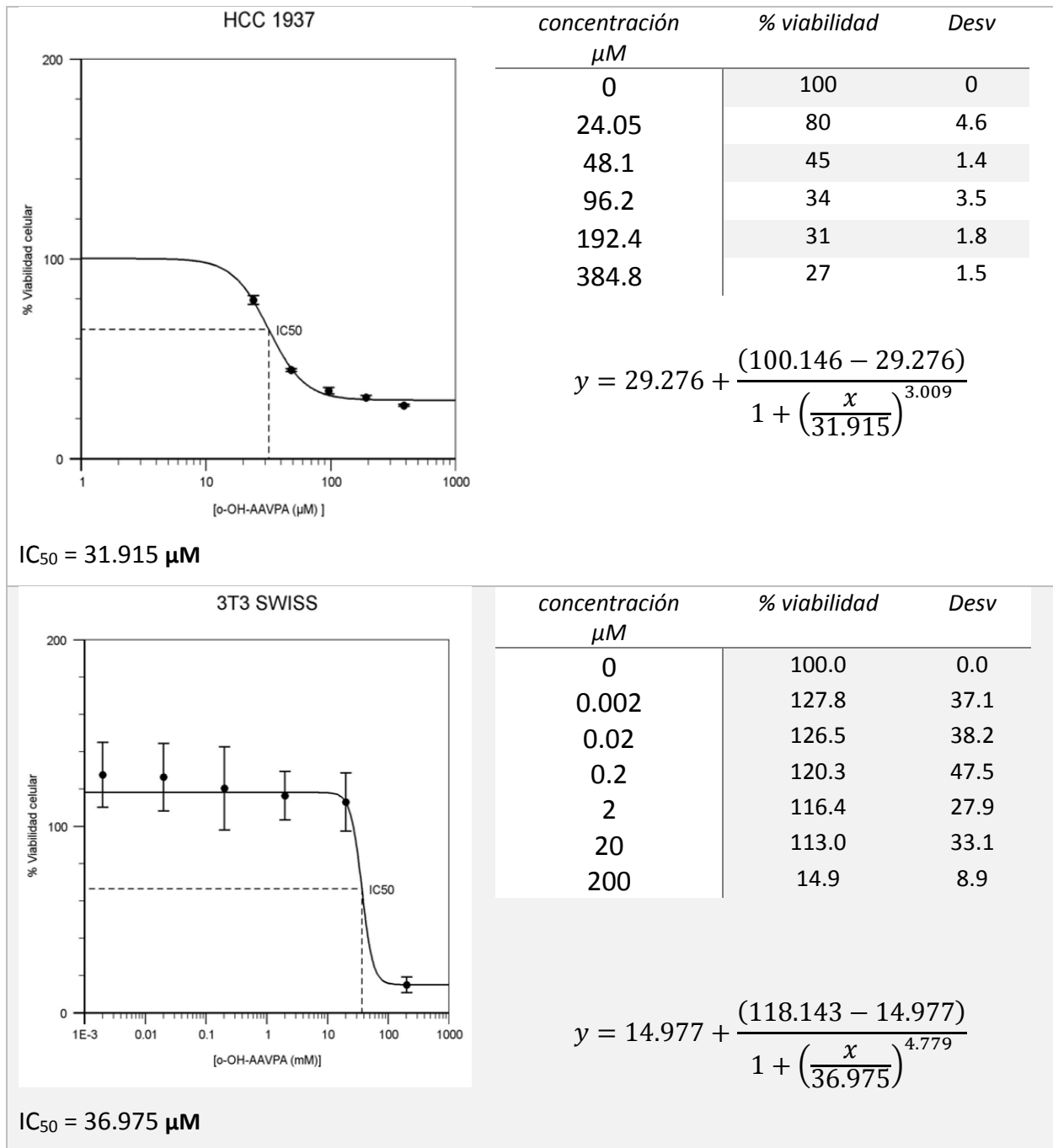


Figura 19. Representación gráfica de la IC₅₀ en las diferentes líneas celulares, calculadas en el programa IC₅₀ Calculator | AAT Bioquest.

Es importante mencionar que la línea celular que requiere una mayor concentración del *o*-HO-AAVPA es la 3T3 swiss (36.975 µM), que son fibroblastos de ratón y que bien fungen como control porque no son células de cáncer de mama y por lo tanto menos susceptibles al *o*-HO-AAVPA, las

tres líneas celulares restantes MDA MB 231, HCC 1937 y MCF 7 son células de cáncer y estas células requieren menores concentración del compuesto (31.186 μM , 31.915 μM y 25.194 μM).

6.10. Evaluación de la viabilidad celular

Los resultados de la evaluación de viabilidad celular tras exponerse las líneas celulares a estímulos de: etanol, etanol: *o*-OH-AAVPA, hidrogeles (HA y HB) e hidrogeles conteniendo *o*-OH-AAVPA (HA *o*-OH y HB *o*-OH), se obtuvieron por la técnica de cristal violeta y la coloración resultante se midió a través del análisis de una imagen de la placa de cultivo programa ImageJ. Los resultados se expresan en función de porcentaje y se representan en la Figura 20, que enseguida se muestra.

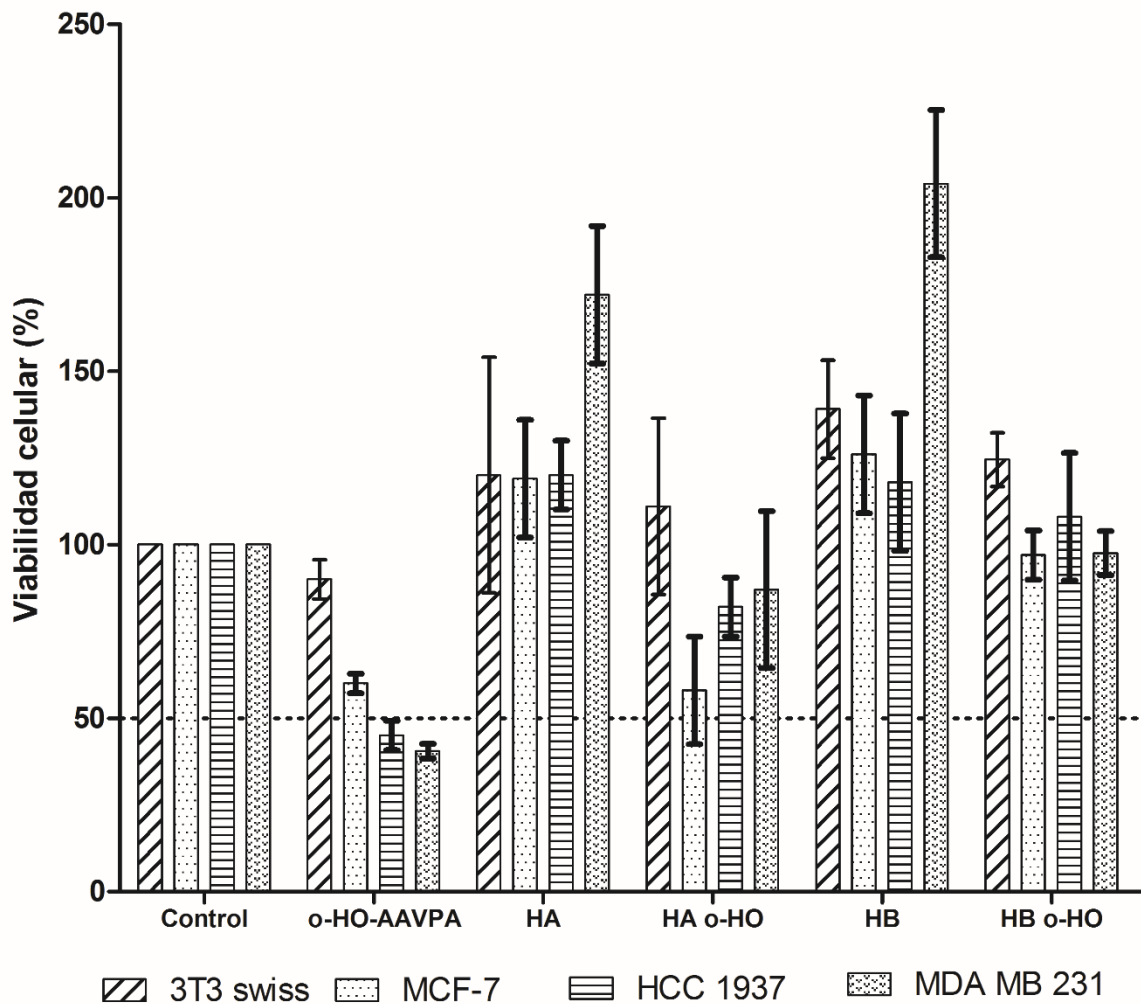


Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular las células a etanol (control), *o*-HO-AAVPA con etanol (*o*-HO-AAVPA), hidrogeles sin *o*-HO-AAVPA (HA y HB) e hidrogeles cargados con *o*-HO-AAVPA (HA *o*-OH y HB *o*-OH)

Este ensayo celular se realizó con la finalidad de demostrar que existe una liberación modificada del *o*-HO-AAVPA, para ello se utilizó una concentración del *o*-HO-AAVPA de 184.13 μ M, como se puede observar en la Figura 20, el grupo de control es considerado como el 100% de viabilidad celular.

El grupo con etiqueta de *o*-HO-AAVPA son los resultados al aplicar en las células el compuesto, utilizando etanol como vehículo o medio de disolución, en este grupo es apreciable que las

células MDA MB 231, son las que presentan menor porcentaje de viabilidad celular (40.5%) seguida de HCC 1931 (45 %), MCF 7 (60 %) y 3T3 swiss (90 %).

En este grupo (*o*-HO-AAVPA), el efecto que se observa en el porcentaje de viabilidad celular en las diferentes líneas, es atribuido a una sobre expresión de HDAC 4 en MDA MB 231 comparado con MCF 7, dato respaldado por Joung Park *et al.* 2011., en un estudio en líneas celulares MCF 7 y MDA MB 231, donde encontró la sobreexpresión de HDAC 4 y se atribuyó una mayor progresión tumoral por la presencia de esta proteína (Joung Park, y otros, 2011), en cuanto a la línea celular HCC 1937 Zhang Baoyuan *et al.* 2019, deja notar la presencia de HDAC de clase I y plantea que la inhibición de estas HDAC podría inducir estrés oxidativo celular, lo que daría como resultado daños importantes en el ADN que son perjudiciales para las células de cáncer de mama deficientes en BRCA1 (Zhang, y otros, 2019), sin embargo el efecto del compuesto en la línea celular 3T3 Swiss, línea celular que se observó menos afectada cumpliendo con reportes anteriores que indican que los inhibidores de HDAC ejercen una citotoxicidad mucho más baja en las células normales que en las células cancerosas (Garmpis, y otros, 2017)

En los grupos de control de los dos tipos de hidrogeles (HA y HB) se observa que hay una viabilidad celular mayor al 100 %, esto debido a que el etanol no entra en contacto directo con las células, por lo tanto los hidrogeles fungen como protectores para la exposición directa de este disolvente que se emplea para solubilizar el *o*-HO-AAVPA, al hacer la comparación entre HA y HB, se observa que el HB favorece la viabilidad celular en las líneas celulares 3T3 swiss, MCF 7 y MDA MB 231, mientras que para HCC 1937 no se observa tal efecto, debido a que como anteriormente se reportó, HA alcanza u mayor grado de hinchamiento tanto en RPMI como en DMEM a las 29 horas y debido a que cuando se hincho con etanol no alcanza su máximo grado de hinchamiento, al estar en contacto con el medio de cultivo continua su proceso de hinchamiento, por lo tanto se libera de manera más rápida el etanol contenido y observamos el efecto reportado, de lo cual también podemos decir que las células MDA MB 231 resultan menos sensibles al etanol.

Al comparar la viabilidad entre los hidrogeles control contra los hidrogeles con el compuesto (o-HO-AAVPA) de manera general se observa que el hidrogel cumple con la función de modificar la liberación del compuesto (o-HO-AAVPA).

Cuando se compara la viabilidad celular de los hidrogeles cargados (HA o-HO y HB o-HO), en todas las líneas celulares se observa un menor porcentaje de viabilidad celular cuando el compuesto está cargado en él HA, este efecto se atribuye a la naturaleza del hidrogel donde se considera la densidad de cadenas entrecruzadas mayor para HB lo cual resulta en una liberación del compuesto con mayor impedimento que la obtenida en HA, sin embargo los efectos significativos se observan en MCF 7 y HCC 1937, para 3T3 swiss y MDA MB 231.

7. Conclusión

Se prepararon y evaluaron hidrogeles a través de tres etapas de síntesis, donde los productos obtenidos fueron: un copolímero tribloque compuesto de PLA y PEG, ambos polímeros aprobados por la FDA. El PLA es un polímero con alta hidrofobicidad lo cual restringe su aplicación, sin embargo, sus características se pueden modificar con polímeros hidrofílicos como el PEG, que a su vez favorece el aumento de la degradación. El segundo compuesto fue un copolímero tribloque acrilado y finalmente el hidrogel obtenido por fotopolimerización.

Se caracterizaron por FT-IR los tres compuestos obtenidos, dando señales de absorbancia a números de onda en común a $(2,882 \text{ cm}^{-1})\nu$ (C-H, C-H₂ y C-H₃), $(1,748 \text{ cm}^{-1})\nu$ (C=O), $(1,466 \text{ cm}^{-1})\delta$ (CH₂), $(1,342 \text{ cm}^{-1})\delta$ (CH) y $(1,103 \text{ cm}^{-1})\delta$ (C-O), solo el copolímero y el hidrogel presentaron señal a $(3,441 \text{ cm}^{-1})\nu$ (O-H) y en $(1,636 \text{ cm}^{-1})\nu$ (C=C) presentó señal el copolímero acrilado.

La espectrometría de masas pone en evidencia semejantes patrones de fragmentación para los tres compuestos obtenidos, con un comportamiento como campana de gauss, característica de polímeros, el copolímero y copolímero acrilado presentan dicho comportamiento alrededor de 706 m/z y el hidrogel a 721 m/z.

Por RMN se obtiene la identificación de ¹H y ¹³C, solo para el copolímero y copolímero acrilado, en el RMN ¹H, se identifican señales a 1.4 ppm y 1.6 ppm (-CH₃), 3.5 ppm (-OH), 3.8 ppm (-CH), 4.3 ppm (-CH), 4.4 ppm (-CH₂) y 5.2 ppm (-CH), atribuidas al PLA y para el PEG 3.6 ppm (-CH₂-), a 2 ppm se encuentra el (-CH₃) y los picos entre 6.1 ppm y 6.3 ppm corresponden al (=CH₂) señales correspondientes a la acrilación. En el RMN ¹³C, las señales a 16 ppm, 20 ppm, 65 ppm, 67 ppm, 68 ppm, 175 ppm y 176 ppm corresponden al PLA y 70 ppm corresponde al PEG, alrededor de 170 ppm (C=O) y a 125 ppm (CH₂=CH₂), aparecen las señales correspondientes a los extremos acrilados.

Las curvas de DSC presentan un pico alrededor de una temperatura de 50°C, para el copolímero 54.06 °C, el copolímero acrilado de 50.53°C, el HA 54.42°C y el HB 51.95°C, la temperatura de descomposición exotérmica para el copolímero y copolímero acrilado está alrededor de 120 °C y 125 °C y para los hidrogeles esta entre 90 y 110 °C., la temperatura de degradación total para el

copolímero está a 225 °C, copolímero metacilado a 287 °C, en el caso de los hidrogeles, el HB inicia su degradación a 112 y termina en 250, y para él HA inicia a 97.5 °C y termina a 238 °C.

En las imágenes obtenidas por microscopia diferencial de barrido (SEM), es apreciable que el HA es un gel con poros grandes y con superficies lisas. El HB presenta superficies rugosas con pliegues y poros de menor diámetro.

Los HA son los que alcanzan un mayor grado de hinchamiento 634.5926 % y DE. 2.3914 en el medio de cultivo RPMI, en cuanto al HB, su máximo grado de hinchamiento fue de 480.7204 % y DE. 33 en PBS pH 7.4., la comparación estadística entre el % I2959 vs medio de hinchamiento no hay diferencia significativa para PBS pH 7.4, PBS pH 5.5 y etanol.

El HA tiene una eficiencia de encapsulamiento mayor (98.17 %) que el HB (95.54%) sin embargo el HB tiene una desviación estándar menor (0.4537) comparada con la del HA (0.9952).

El HA libero en total 2 660 μM y DE. 442.96, el HB libero 2 333 μM y DE. 524 μM .

Las IC_{50} para cada línea celular son las siguientes; 3T3 swiss (36.975 μM), MDA MB 231 (31.186 μM), HCC 1937 (31.915 μM) y MCF 7 (25.194 μM).

Cuando se aplica el estímulo directo de *o*-HO-AAVPA (184.13 μM), las células que tienen el mayor porcentaje de viabilidad celular son 3T3 Swiss, seguida de MCF 7, HCC 197 y MDA MB 231. Los compuestos encapsulados en el hidrogel tienen un efecto sobre la viabilidad celular pero no iguala en porcentaje a los resultados obtenidos cuando se aplica el estímulo directo. En los ensayos donde se usó HA *o*-HO las células más afectadas fueron MDA MB 231, seguida por MCF 7, HCC 1937 y 3T3 swiss. En el caso del HB *o*-HO, las células con menor viabilidad fueron MDA MB 231, seguida por MCF 7, 3T3 swiss y HCC 1937.

En general se concluye que el HB es el hidrogel propuesto para continuar con estudios adicionales, ya que, pese a que no tiene la misma capacidad de hinchamiento, encapsulación y liberación, así como morfología, tiene menor variabilidad, con lo cual se puede prever una menor viabilidad celular de las células cancerosas tratadas con el hidrogel cargado con *o*-HO-AAVPA.

Bibliografía

- Migonney, V. (2014). *Biomaterials*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, .
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. En D. F. Gilbert, & O. Friedrich, *Cell Viability Assays* (págs. 1-15). [S.l.]: Springer New York.
- Aghabegi Moghanjoughi, A., Khoshnevis, D., & Zarrabi, A. (2016). A concise review on smart polymers for controlled drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 6(3).
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 105–121.
- Ambrosone, C., Hong, C.-C., & Goodwin, P. (2015). Host Factors and Risk of Breast Cancer Recurrence: Genetic, Epigenetic and Biologic Factors and Breast Cancer Outcomes. En P. A. Ganz, *Improving Outcomes for Breast Cancer Survivors* (págs. 143-150). Cham: Springer International Publishing.
- Asadi, H., Rostamizadeh, K., Salari, D., & Hamidi, M. (2011). Preparation and characterization of tri-block poly(lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(lactide) nanogels for controlled release of naltrexone. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1).
- Ashlee N. Ford Versypta, D. W. (2013). Mathematical Modeling of Drug Delivery from Autocatalytically Degradable PLGA Microspheres—A Review*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 29-37.
- Astrain, C. G., Martin, L., Corcuera, M., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2017). *Industrial applications of renewable biomass products*. (S. N. Goyanes, & N. B. D'Accorso, Edits.) Cham: Springer.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 252–267.
- Calobrace, M., Schwartz, M., Zeidler, K., Pittman, T., Cohen, R., & Stevens, W. (2017). Long-Term Safety of Textured and Smooth Breast Implants. *Aesthetic Surgery Journal*, 38.

- Chang Lin Hsieh, H. P. (2016). Alterations in histone deacetylase 8 lead to cell migration and poor prognosis in breast cancer. *Life Sciences*, 7-14.
- Coleman, W., & Tsongalis, G. (2017). Cancer Epidemiology: Incidence and Etiology of Human Neoplasms . En W. B. Coleman, & G. J. Tsongalis, *The Molecular Basis of Human Cancer* (págs. 1-21). New York, NY: Springer New York.
- Connolly, R., & Stearns, V. (2012). Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 191-204.
- Correa-Basurto, A., Romero-Castro, A., Correa-Basurto, J., Hernández-Rodríguez, M., Soriano-Ursúa, M., García-Machorro, J., . . . Mendieta-Wejebe, J. (2019). Pharmacokinetics and tissue distribution of N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide in Wistar Rats and its binding properties to human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168, 130-139. doi:10.1016/j.jpba.2018.09.010
- Danafar, H., Rostamizadeh, K., & Hamidi, M. (2017). Polylactide/poly(ethylene glycol)/polylactide triblock copolymer micelles as carrier for delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs: a comparison study. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43(3).
- Davis, N. (s.f.). *POLYMERIC DRUG DELIVERY TECHNIQUES*. Recuperado el 27 de March de 2018, de Sigma- Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Method/1/polymeric-drug-delivery-techniques-web.pdf>
- Ding, Y., Feng, W., Lu, B., Wang, P., Wang , G., & Ji, J. (May de 2018). PLA-PEG-PLA tri-block copolymers: Effective compatibilizers for promotion of the interfacial structure and mechanical properties of PLA/PBAT blends. *Polymer*, 146.
- Drioli, E., & Giorno, L. (Edits.). (2016). *Encyclopedia of Membranes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Du, Y., Lemstra, P., Nijenhuis, A., Van Aert, H., & Bastiaansen, C. (1995). ABA Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies. *Macromolecules*, 28(7).

- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*(4).
- Garmpis, N., Christos, D., Garmpi, A., Kalampokas, E., Kalampokas, T., Spartalis, E., . . . Dimitroulis, D. (2017). Histone Deacetylases as New Therapeutic Targets in Triple-negative Breast Cancer: Progress and Promises. *Cancer Genomics & Proteomics*, 14. doi:10.21873/cgp.20041
- Gu, D., O'Connor, A., G.H. Qiao, G., & Ladewig, K. (2016). Hydrogels with smart systems for delivery of hydrophobic drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(7).
- Guosen, H., Lwin Lwin, M., Jie, P., & Subbu, V. (2007). ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: A comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 48–55.
- Hassanvand Jamadi, R., Asadi, A., Yaghoubi, H., & Goudarzi, F. (2018). Investigation into the Anticancer Activity and Apoptosis Induction of Brevinin-2R and Brevinin-2R-Conjugated PLA-PEG-PLA Nanoparticles and Strong Cell Cycle Arrest in AGS, HepG2 and KYSE-30 Cell Lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.
- Institute, N. C. (06 de 11 de 2019). *National Cancer Institute*. Recuperado el 19 de September de 2017, de National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
- Joung Park, S., Ae Jun, J., Jin Jeong, K., Jeong Heo, H., Sihm Sohn, J., Young Lee, H., . . . Ka ng, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, 25, 1677-1681. doi:10.3892/or.2011.1236
- Kim, S., Kim, J.-H., Jeon, O., Kwon, I., & Park, K. (2009). Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3).
- Kou, Y., Wang, S., Luo, J., Sun, K., Zhang, J., Tan, Z., & Shi, Q. (2019). Thermal analysis and heat capacity study of polyethylene glycol (PEG) phase change materials for thermal energy storage applications. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 128.

- Kutty, R., Tay, C., Lim, C., Feng, S.-S., & Leong, D. (2015). Anti-migratory and increased cytotoxic effects of novel dual drug-loaded complex hybrid micelles in triple negative breast cancer cells. *Nano Research*, 2533-2547.
- L., A., G., C., & L., N. (2016). *Handbook of Biomaterial Properties*. (2° ed.). (W. L. Murphy, J. Black, & G. W. Hastings, Edits.) Nueva York: Springer Science+Business Media.
- Larrañeta, E., Stewart, S., Ervine, M., Al-Kasasbeh, R., & Donnelly, R. (2018). Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1).
- Liechty, W., Kryscio, D., Slaughter, B., & Peppas, N. (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1).
- Mahyudin, F., & Hermawan, H. (2016). *Biomaterials and Medical Devices*. (S. G. Sukaryo, A. Purnam, & H. Hermawan, Edits.) Cham: Springer International Publishing.
- Marjanović-Balaban, Ž., & Jelić, D. (2018). *Biomaterials in Clinical Practice*. (F. Zivic, S. Affatato, M. Trajanovic, M. Schnabelrauch, N. Grujovic, & K. L. Choy, Edits.) Cham: Springer International Publishing.
- Martin Göttlicher, S. M. (2002). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, 6969-6978.
- Melanie R. Hassler, G. E. (2012). Epigenomics of cancer - emerging new concepts. *Biochimie*, 2219-2230.
- Mishra, P., Nayak, B., & Dey, R. (2016). PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3).
- Muhammad Faheem, A., & Muhammad, H. N. (2015). Methods of synthesis of hydrogels . . . A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 554–559.
- Munim, S., & Raza, Z. (2018). Poly(lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications. *Journal of Porous Materials*, 26.

Muñoz, A. (1997). *Cancer. Genes y nuevas terapias*. España: Helice.

Nandini A., P., Geetha B., H., & Mahadevappa Y., K. (2017). Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. *Procedia Manufacturing*, 12.

NIH. (06 de 11 de 2019). *National Cancer Institute*. Obtenido de <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>

OMS. (06 de 11 de 2019). *World Health Organization*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2017, de World Health Organization: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group

Ouyang, P., Kang, Y.-q., Yin, G.-f., Huang, Z.-b., Yao, Y.-d., & Liao, X.-m. (2009). Fabrication of hydrophilic paclitaxel-loaded PLA-PEG-PLA microparticles via SEDS process. *Frontiers of Materials Science in China*, 15-24.

P M Lombardi, K. E. (2011). Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 735-743.

Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190.

Patitapabana, P., Ajit, B., & Subash, C. M. (September de 2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3).

Pavlovic, M. (2015). *Bioengineering*. Cham: Springer International Publishing.

Perrie, Y., & Rades, T. (2012). Pharmaceuticals - Drug Delivery and Targeting. En Y. Perrie, & T. Rades, *Controlling drug delivery* (págs. 1- 20).

Prestegui-Martel, B., Bermúdez-Lugo, J., Chávez-Blanco, A., Dueñas-González, A., García-Sánchez, J., Pérez-González, O., . . . Correa-Basurto, J. (2016). N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide, a valproic acid aryl derivative designed in silico with improved anti-

- proliferative activity in HeLa, rhabdomyosarcoma and breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 140-149.
- Ranjha, N., Mudassir, J., & Akhtar, N. (2008). Methyl methacrylate-co-itaconic acid (MMA-co-IA) hydrogels for controlled drug delivery. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 47(1).
- Rezaie, H. R., Bakhtiari, L., & Öchsner, A. (2015). *Biomaterials and their applications*. Cham: Springer.
- Santiago Roperó, M. E. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, 19-25.
- Soon Young Park, J. I. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, 1677-1681.
- Srivastava, A., Yadav, T., Sharma, S., Nayak, A., Akanksha Kumari, A., & Mishra, N. (2016). Polymers in Drug Delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4(1).
- Sulistioso Giat, S., Agung, P., & Hendra, H. (2016). *Biomaterials and Medical Devices*. (F. M. Hendra Hermawan, Ed.) Quebec: Springer International Publishing Switzerland.
- Telli, M. (2106). Triple-Negative Breast Cancer. En S. Badve, & Y. Gökmen-Polar, *Molecular pathology of breast cancer* (págs. 71- 78). Cham, Switzerland: Springer.
- Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., & Jing, X. (2012). Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and. *Progress in Polymer Science*, 237-280.
- Triplett, R. G., & Budinskaya, O. (2017). New Frontiers in Biomaterials. *Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 105-115.
- Van Hove, A., Wilson, B., & Benoit, D. (2013). Microwave-assisted Functionalization of Poly(ethylene glycol) and On-resin Peptides for Use in Chain Polymerizations and Hydrogel Formation. *Journal of Visualized Experiments*(80).
- Verma, M., & Banerjee, H. (2015). Epigenetic Inhibitors . En M. Verma, *Cancer epigenetics* (págs. 469-503). New York: Humana Press.

- Verma, M., & Badve, S. (2016). Epigenetic Mechanism in Breast Cancer. En S. Badve, & Y. Gökmen-Polar, *Molecular pathology of breast cancer* (pág. 329.349). Cham, Switzerland: Springer.
- Wen-Chuan, L., Yuan-Chung, L., & I-Ming, C. (2006). Amphiphilic Poly(D,L-lactic acid)/Poly(ethylene glycol)/Poly(D,L-lactic acid) Nanogels for Controlled Release of Hydrophobic Drugs. *Macromolecular Bioscience*, 6(10), 846-854.
- Witt, A., Lee, C.-W., Lee, T., Azzam, D., Wang, B., Caslini, C., . . . Ince, T. (2017). Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer. *Oncogene*, 1707-1720.
- Yamamuro, T. (2016). *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics* (2° ed.). (D. G. Poitout, Ed.) Londres: Springer.
- Yamuna Devi Siraparapu, S. B. (2013). A Review on Recent Applications of Biomaterials. *International Journal of Science and Research*, 70-75.
- Zhang, B., Lyu, J., Yang, E., Liu, Y., Wu, C., Pardeshi, L., . . . Shim, J. (2019). Class I histone deacetylase inhibition is synthetic lethal with BRCA1 deficiency in breast cancer cells. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. doi:10.1016/j.apsb.2019.08.008
- Zhang, Y., Wu, X., Han, Y., Mo, F., Duan, Y., & Li, S. (2010). Novel thymopentin release systems prepared from bioresorbable PLA-PEG-PLA hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 386, 15-22.
- Zhao Tong Wang, Z. J. (2016). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 506-515.

Anexo

Artículo Enviado

Preview (JBA-20-0010)

From: jba@ucl.ac.uk

To: rousy.rm@gmail.com, mv.flores.merino@gmail.com, mvfloresm@uaemex.mx, jcorreab@ipn.mx, mjfragosov@hotmail.com, sandoval.mx@gmail.com, jonnathangsb@yahoo.com.mx, jfest1@gmail.com

CC:

Subject: Journal of Biomaterials Applications JBA-20-0010

Body: 07-Jan-2020

Dear Dr. Flores-Merino:

Your manuscript entitled "Use of hydrogel of PLA-PEG-PLA to carry out o-HO-AAVPA to be tested into breast cancer cells" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Biomaterials Applications.

Your manuscript ID is JBA-20-0010.

You have listed the following individuals as authors of this manuscript:

MORALES CERINO, ROSARIO; Flores-Merino, Miriam; Correa Basurto, Jose ; Fragoso Vazquez, Manuel ; Sandoval Cabrera, Antonio ; Santillán Benítez, Jonnathan; Flores Estrada, Jaime

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jba> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jba>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID IDs during the peer review process. If you have not already logged in to your account on this journal's ScholarOne Manuscripts submission site in order to update your account information and provide your ORCID identifier, we recommend that you do so at this time by logging in and editing your account information. In the event that your manuscript is accepted, only ORCID IDs validated within your account prior to acceptance will be considered for publication alongside your name in the published paper as we cannot add ORCID IDs during the Production steps. If you do not already have an ORCID ID you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Biomaterials Applications.

Sincerely,
Professor Jonathan Knowles, UCL Eastman Dental Institute
Journal of Biomaterials Applications
jba@ucl.ac.uk

Date Sent: 07-Jan-2020

Journal of Biomaterials Applications

Use of hydrogel of PLA-PEG-PLA to carry out o-HO-AAVPA to be tested into breast cancer cells

Journal:	<i>Journal of Biomaterials Applications</i>
Manuscript ID	JBA-20-0010
Manuscript Type:	Original Manuscript
Keywords:	Hydrogels, PLA-PEG-PLA, o-OH-AAVPA, Drug delivery systems, Breast cancer.
Abstract:	<p>Hydrogels are polymeric biomaterials with biomedical applications, attractive for their capacity to modify half-life or circulation transport of active principles. Hydrogels have served as carriers of anticancer drugs, since a large number of these have limited solubility, such it is the case of o-OH-AAVPA. For this reason, we suggest the use of a hydrogel system of PLA-PEG-PLA. PLA linked to PEG, form systems with stealth characteristics giving protection against various degradation mechanisms inside a cell providing biocompatibility and prolonged circulation time. In this work the synthesis of the PLA-PEG-PLA triblock was carried out and then crosslinked with different percentages of I2959 (5 % and 10 %). Then a hydrogel of PLA-PEG-PLA, as an o-OH-AAVPA carrier was tested in the MDA MB 231, HCC 1937, MCF 7 and 3T3 SWISS cell lines. We found that the hydrogel A has the greatest swelling capacity (634.59 % \pm 2.39) in RPMI culture medium, the encapsulation efficiency was 98.47 % \pm 0.9952 with a total release of o-HO-AAVPA at 24 h. The hydrogel B has the swelling capacity of 480.7204 % \pm 33 in PBS solution (pH 7.4), an encapsulation efficiency of 95.59 % \pm 0.4537, and total release of o-HO-AAVPA at 96 h. Effects on cell viability were lower than the hydrogel with 5 % of I2959.</p> <p>In conclusion, HB was the proposed hydrogel to continue with additional studies, since it has lower variability, which allows for lower cell viability of cancer cells treated with the hydrogel loaded with o-HO-AAVPA</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts