

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES.  
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES.  
  
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE DOCUMENTOS.

EXPEDIENTE: MX/a/2020/012621  
FOLIO DE RECEPCIÓN: MX/E/2020/080219  
IDENTIFICADOR DE LA SOLICITUD: 50590  
LUGAR, FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD:  
CIUDAD DE MÉXICO 24/11/2020 10:25:10

ACUSE DE RECIBO DE LA SOLICITUD DE:

Patente

SOLICITANTE(S)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

REPRESENTANTE LEGAL:

Dolores Briseida SILVA BADILLO

DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD:

DOCUMENTO	NOMBRE ARCHIVO	TAMAÑO	HOJA(S)
SOLICITUD	Solicitud_000050590_24_11_2020.pdf	429.92 KB	4
COMPROBANTE DE PAGO	Pago.pdf	24.18 KB	1
HOJA DE DESCUENTO	HOJA DE DESCUENTO.pdf	25.24 KB	1
CONSTANCIA RGP	RGP IMPI BRIS.pdf	252.25 KB	1
OTRO	Carta de reconocimiento de derechos Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas.pdf	100.91 KB	1
MEMORIA_TECNICA	Memoria técnica.pdf	275.88 KB	19
DIBUJOS	Figuras.pdf	1629.61 KB	6

TOTAL DE HOJAS: 33 (No se incluyen hoja(s) del acuse)

Los documentos adjuntos están sujetos al estudio correspondiente que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial realice de conformidad con la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial o la Ley de la Propiedad Industrial, según sea el caso, considerando la fecha de recepción de su solicitud; así como de conformidad al Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, aplicable a ambas legislaciones en términos de lo dispuesto por los artículos Transitorios Cuarto y Noveno del Decreto por el que se expide la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, publicado el día 01 de julio de 2020 en el diario oficial de la federación

La presente solicitud se recibe en términos del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; por lo tanto, previo a su presentación, el usuario aceptó lo siguiente:

- I.- Que el trámite se efectúe, desde su inicio hasta su conclusión, a través de medios de comunicación electrónica;
- II.- Bajo protesta de decir verdad, que revisó en la vista previa la información capturada y los anexos a la solicitud y que éstos son correctos; así mismo que, una vez concluido el proceso, no podría editar o variar la información o sus anexos;
- III.- Bajo protesta de decir verdad, indicó que la información capturada es cierta;
- IV.- Consultar su tablero, al menos, los días quince y último de cada mes, o bien, el día hábil siguiente si alguno de éstos fuere inhábil y que, en caso de no hacerlo, la notificación se tendría por hecha el día hábil siguiente a los días quince y último de cada mes, y
- V.- Dar aviso por escrito, a través del correo electrónico [buzon@impi.gob.mx](mailto:buzon@impi.gob.mx), a la Dirección Divisional de Patentes, dentro de los tres días hábiles siguientes a aquel en que se vea imposibilitado, por causas imputables al Instituto, a consultar el tablero o abrir los archivos depositados en el mismo, en los días señalados en la fracción IV anterior.

A efecto de que los documentos presentados a través del Sistema de Patentes en Línea, produzcan los mismos efectos que los documentos firmados autógrafamente y tengan el mismo valor probatorio, manifestó bajo protesta de decir verdad, que los documentos son copia íntegra e inalterada del documento impreso; que se encuentren digitalizados en formato PDF (Portable Document Format), y que los remitió de forma legible.



IMPI  
INSTITUTO MEXICANO  
DE LA PROPIEDAD  
INDUSTRIAL



MX/E/2020/080219

Asimismo, desde su registro en el Portal de Acceso a Servicios Electrónicos, manifestó reconocer como propia la CURP, la cual no podrá ser sustituida con posterioridad; reconoció como propia y válida la dirección de correo electrónico proporcionada y aceptó que en ella se le envíe cualquier comunicación relacionada con la cuenta; aceptó que el uso de la contraseña queda bajo su exclusiva responsabilidad y que deberá notificar oportunamente al Instituto, cualquier situación que pudiera implicar un uso indebido; reconoció como propia, veraz y auténtica la información que envíe a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto, ya sea haciendo uso de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; aceptó que el uso de su CURP y contraseña o, en su caso, e-firma, por persona distinta quedará bajo su exclusiva responsabilidad y acepta como propia la información que ésta envíe o descargue a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto; asumió cualquier tipo de responsabilidad derivada del mal uso que hagan de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; y reconoció que el simple uso de los servicios electrónicos del Instituto constituye la aceptación más amplia de las condiciones señaladas en el artículo 11 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

**Cadena Original**

JAVIER ARIZMENDI SHO|00001000000413547625|Servicio de Administración Tributaria|50590|MX/a/2020/012621|MX/E/2020/080219|24/11/2020 10:25:10|Documento\_Firma\_Electronica.pdf|1|4532.28 KB|PMi4WgSUKqgAd+VpK2Zth9VIZj4=

**Sello Digital**

bjJxajtWm4ltrBggjqJBXCpD1aMh4ZcKW/OPQ2jZiYbt5aloEIXjclpJXIKZsRsLCIL2eDdc6RnX0R4MrjN1yFklz8EbISbufHFriGzIU  
IrvqccVquhkPmFZydWCbhRX/Gw+nqBTANMebwfwzjw9J1KjZu  
+KxZzTcFDTZICqznwqkKSBjvAd9Q/wyTBHRSc2bNI2PZASEbu25sbmT0at4cogjhBTxfoxTbYXXUUSudJ0/KZIWXREOf1YNp7k  
3VO3ke68cn17LLr3cpqKckJNVAXq/rbC/QEm4nKiotpDtUHK8rUSkabtBo4RYTkzZ4fe9EzFsOasb05piQ8hS6zfLw==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código QR que aparece a un costado de la e.firma del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1° fracción I, II y III; 16, 18, 19, 24 B, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. En caso de no contar con lector QR o en su defecto el Código no pueda ser leído por su dispositivo, puede digitar en la página antes referida el siguiente Código: INgGorlaPchag705WWwjNmVXzbo=

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

**REPRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTE ENVIADA A TRAVÉS DEL PORTAL DE ACCESO A SERVICIOS ELECTRÓNICOS (PASE).**

Homoclave del formato	Folio
IMPI-00-009	Folio: MX/E/2020/080219
	Fecha de solicitud del trámite
	24   11   2020

## Datos generales de la solicitud

<div><div><div><input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente</div><div><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad</div><div><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial</div></div><div><div>Especifique cual:</div><div><div><input type="radio"/> Modelo Industrial</div><div><input type="radio"/> Dibujo Industrial</div></div></div></div> <div><div>Normal</div><div>Expediente: MX/a/2020/012621</div><div>ID Solicitud: 50590</div><div>Fecha: 24/11/2020 10:25:10</div></div>	
--	--

Datos del (de los) solicitante(s)

Personas físicas	Personas morales
CURP:	RFC: UAM740101AR1
Nombre(s):	Denominación o razón social:
Primer apellido:	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Segundo apellido:	
Nacionalidad:	Nacionalidad: MÉXICO
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	Teléfono (Lada, Número, Extensión): 5554834000, Ext. 1233
Correo electrónico:	Correo electrónico: pintel@correo.uam.mx
<input type="radio"/> Continúa en anexo	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo

## Domicilio del (de los) solicitante(s)

Código postal: 14380

Calle: PROLONGACIÓN CANAL DE MIRAMONTES

Número exterior: 3855

Número interior:

Colonia: EX-HACIENDA SAN JUAN DE DIOS

Municipio o delegación: TLALPAN

Localidad:

Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO

Entre calles:

País: MÉXICO

Datos del (de los) inventor(es) /diseñador(es)

CURP: BEVN750316SH2

Nombre(s): Nohra Elsy

Primer apellido: BELTRÁN

Segundo apellido: VARGAS

Nacionalidad: MÉXICO

Teléfono (Lada, Número, Extensión):  
5533345252

Correo electrónico: [nbeltran@cua.uam.mx](mailto:nbeltran@cua.uam.mx)

☐ Continúa en anexo

## Domicilio del (de los) inventor(es)/diseñador(es)

Código postal: 03020

Calle: HERIBERTO FRÍAS

Número exterior: 216

Número interior:

Colonia: NARVARTE PONIENTE

Municipio o delegación: BENITO JUÁREZ

Localidad:

Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO

Entre calles:

País: MÉXICO

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

## Datos del (de los) apoderado(s)

CURP: SIBD730430MDFLDL03	RGP:
Nombre(s): Dolores Briseida	Personas autorizadas para oír/recibir notificaciones: Liliana DEL ORBE SAUCEDO, Sara PÉREZ SALAZAR
Primer apellido: SILVA	
Segundo apellido: BADILLO	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 5554834000, Ext. 1233	
Correo electrónico: pindustrial@correo.uam.mx	

☐ Continúa en anexo

Domicilio del (de los) apoderado(s)

Código postal: 14387	
Calle: PROLONGACIÓN CANAL DE MIRAMONTES	
Número exterior: 3855	Número interior:
Colonia: EX-HACIENDA SAN JUAN DE DIOS	
Municipio o delegación: TLALPAN	Localidad:
Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO	Entre calles:
País: MÉXICO	

### Datos de la Solicitud

Denominación o título de la invención: SOPORTE DE HIDROGEL DE ALGINATO Y QUITOSANO PARA CRECIMIENTO DE TEJIDOS
Fecha divulgación previa:

Divisional de la solicitud

Fecha presentación:
Número:
Figura jurídica:

### Prioridad Reclamada

País:	Fecha de Presentación:	Número de Serie:	Codigo DAS

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Observaciones

Bajo protesta de decir verdad, el firmante manifiesta que los datos asentados en esta solicitud son ciertos y que en caso de actuar como mandatario, cuenta con facultades para llevar a cabo el presente trámite.



Cadena Original

DOLORES BRISEIDA SILVA BADILLO|CURP|SIBD730430MDFLDL03|RENAPO|24/11/2020 10:25:06|1015789|33| Documento\_Firma\_Electronica.pdf|4528.53 KB|PMi4WgSUKqgAd+VpK2Zth9VIZj4=|000050590|PATENTE|Normal|SOPORTE DE HIDROGEL DE ALGINATO Y QUITOSANO PARA CRECIMIENTO DE TEJIDOS|UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA|MORAL|Nohra Elsy BELTRÁN VARGAS|Dolores Briseida SILVA BADILLO|SIBD730430MDFLDL03|

Sello Digital

otjmSIUYZpBVGyKz+O7iTXVE312fjvn5bFNKfuynyp8=

Número de Páginas Manifestadas

- Número de Páginas: 27



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Fecha: 30 de Octubre de 2020

**Representante Legal**

**Universidad Autónoma Metropolitana**

Presente

La suscrita Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas trabajadora académica de la Universidad Autónoma Metropolitana, contratada con categoría de Profesor Titular "C", con dedicación de Tiempo Completo en el Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Unidad Cuajimalpa, manifiesto que en cumplimiento de las actividades académicas correspondientes a mi plaza, participé en la invención denominada "Soporte de hidrogel de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos", así mismo, reconozco que los derechos patrimoniales corresponden a la Universidad Autónoma Metropolitana, de conformidad con lo dispuesto en los artículos 163 de la Ley Federal del Trabajo y 14 de la Ley de la Propiedad Industrial.

A t e n t a m e n t e

Firma:

Nombre: Nohra Elsy Beltrán Vargas

Dirección: Heriberto Frías 216. Narvarte Poniente. Benito Juárez. CP 03020.  
Ciudad de México.

Teléfono: 55 33345252

Correo electrónico: nbeltran@cua.uam.mx

## **SOPORTE DE HIDROGEL DE ALGINATO Y QUITOSANO PARA CRECIMIENTO DE TEJIDOS**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con hidrogeles para el crecimiento de tejidos,  
5 más específicamente, un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En el proceso artificial de reparación y regeneración de tejidos, se suele emplear un  
soporte diseñado con materiales biocompatibles que se asemeje a la matriz extracelular para ayudar  
10 en el crecimiento celular. Dichos soportes deben cumplir con ciertas características para que las células  
puedan adherirse a los mismos y crecer de forma segura y favorable para formar tejidos. Para lograr  
esto, se debe prestar especial atención en el material del que esté fabricado el soporte, así como su  
estructura. De forma especial, se requiere que el material cumpla con las siguientes características:  
biocompatibilidad, tener una degradación regulada, no generar subproductos tóxicos y tener  
15 propiedades de superficie y volumen que favorezcan el crecimiento de las células.

Se ha observado que polímeros naturales como el alginato y el quitosano, presentan  
diversas propiedades ideales para la construcción de soportes para el crecimiento celular al ser  
biodegradables, biocompatibles y no tóxicos. Adicionalmente, estos polímeros presentan la  
característica adicional de ser de fácil obtención al estar presentes en la naturaleza de forma  
20 abundante. Se ha analizado que estos polímeros aceleran la curación de heridas en animales. De forma  
adicional, se ha observado que, si dichos polímeros se emplean en conjunto en la elaboración de  
soportes para el crecimiento celular, presentan propiedades tanto mecánicas como biológicas  
mejoradas.

De forma particular, el quitosano es un polímero derivado de la quitina que suele  
25 encontrarse en el exoesqueleto de crustáceos e insectos. El quitosano presenta la ventaja de que al  
ser modificado química y enzimáticamente, puede emplearse como adhesivo. Adicionalmente, el  
mismo puede ser procesado en diferentes formas por lo que puede considerarse biodegradable. Las  
propiedades de este polímero facilitan los factores de crecimiento y adhesión de proteínas en el  
crecimiento artificial de tejidos.

30 Por otro lado, el alginato es un polisacárido que se encuentra principalmente en la  
pared celular de las algas, aportando a las mismas propiedades estructurales como rigidez, elasticidad,  
flexibilidad y la capacidad de absorber agua. El alginato es altamente biocompatible y biodegradable.  
Adicionalmente, presenta propiedades de gelificación, las cuales permiten inmovilizar, encapsular o  
estabilizar las células. También, se sabe que la viscosidad del alginato puede manipularse al aumentar

o reducir su hidratación. Específicamente en el crecimiento de tejidos, el alginato favorece la angiogénesis y ayuda a mantener el fenotipo celular.

Aunque el alginato por si mismo no favorece la adherencia celular de los nuevos tejidos, se ha descubierto que si se combina con el quitosano, el nuevo material presenta una  
5 adherencia y proliferación celular mejorada.

Los soportes para el crecimiento celular a base de alginato, quitosano o combinaciones de ambos, han sido descritos previamente en el estado de la técnica de diversas formas y con varias aplicaciones particulares. Tal es el caso del documento US9480648B2 donde se describe el desarrollo de perlas de alginato y quitosano para favorecer el crecimiento de células cartilaginosas; la solicitud  
10 WO2005087287A1 donde se describe el uso de geles de alginato y cobre para ser empleados como soportes en el crecimiento de tejidos de forma artificial y la solicitud WO2018119274A1, donde se describe el uso de una estructura que puede estar fabricada de materiales como el alginato y el quitosano para tratar tumores.

Aunque el uso de la combinación de alginato y quitosano para soportes de crecimiento  
15 celular ha sido tan ampliamente empleada en diversas invenciones, dicha combinación suele emplearse para el crecimiento de tejido óseo, sin embargo, no se ha descrito su empleo para desarrollar tejidos más delicados como el tejido cardiaco.

La combinación de alginato y quitosano se han utilizado en soportes de cartílago articular, en donde se han probado diferentes composiciones. En el trabajo de Reed et al (Reed, S., &  
20 Wu, B. M. (2017). Biological and mechanical characterization of chitosan-alginate scaffolds for growth factor delivery and chondrogenesis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105(2), 272-282. doi:10.1002/jbm.b.33544) se utilizó una composición de 2%-2% p/v alginato y quitosano, en la que el soporte hidratado tiene poros de tamaño de 20 a 200  $\mu\text{m}$  y 83.1 $\pm$ 14.6 kPa de elasticidad. Las características de estos materiales en conjunto son mejores que por separado, donde el quitosano al  
25 1.5% p/v tiene 1.5 kPa de elasticidad y alginato al 1% p/v tiene 1 kPa. También se observó que la combinación recupera hasta el 95% de su forma original si es sometido a esfuerzos de compresión. Con base en estos resultados, si se tiene un soporte de alginato y quitosano entre 1% y 2% p/v se tendrán de 30 a 80 kPa de elasticidad.

Por otro lado, también se ha descubierto que a los soportes para crecimiento artificial  
30 de tejidos, se les pueden añadir otros materiales como nanopartículas de diversos tipos para mejorar sus propiedades. Tal es el caso del documento ES2659004T3, donde se describe el desarrollo de un soporte polimérico para la regeneración de tejido cardiaco, donde el soporte está funcionalizado con nanopartículas de SDF-1 $\alpha$  y adenosina. Sin embargo, no se ha registrado el desarrollo de soportes de alginato y quitosano que sean compatibles biológicamente con nanopartículas de otro material.

Como se describe, el desarrollo de soportes para el crecimiento artificial de tejidos celulares es algo conocido en el estado de la técnica, sin embargo, ninguno de éstos emplea alginato y quitosano en una composición adecuada para el crecimiento de células cardíacas. Adicionalmente, se ha observado que la permeabilidad de nutrientes al centro de la estructura de los soportes es un inconveniente para este tipo de soportes, ya que no absorben suficiente agua. También, se ha observado que una de las principales dificultades para favorecer el crecimiento de células cardíacas es la conductividad eléctrica y oxigenación, la cual no se ve favorecida en los desarrollos detectados en el estado de la técnica.

Para resolver todos estos problemas, se ha buscado desarrollar un soporte a base de alginato y quitosano para el crecimiento artificial de tejidos que sea capaz de favorecer el crecimiento de células cardíacas, que tenga una adecuada permeabilidad de nutrientes, una adecuada absorción de agua, permita la conductividad eléctrica y no requiera oxígeno suplementario para favorecer el crecimiento de dichos tejidos.

#### **OBJETOS DE LA INVENCION**

Considerando los problemas y desventajas del estado de la técnica que se mencionó previamente, es un objeto de la presente invención proporcionar un soporte a base de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos, incluyendo células cardíacas, que comprenda una estructura porosa, biodegradable y con propiedades mejoradas de permeabilidad y conductividad.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para obtener un soporte de alginato y quitosano para el crecimiento de tejidos celulares, incluyendo células cardíacas, donde el método favorezca la permeabilidad y conductividad del soporte para el crecimiento de tejidos.

#### **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

Por lo anterior, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos que comprende alginato y quitosano con una elasticidad de entre 30 y 80 kPa, poros de un tamaño entre 50 y 200  $\mu\text{m}$ , y una porosidad de entre 70 y 95%.

Otro aspecto de la presente invención comprende un método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para el crecimiento de tejidos que comprende: mezclar alginato y quitosano en una solución acuosa ácida y agitar; llevar a cabo una primera congelación; realizar una primera liofilización; agregar un agente entrecruzante; separar el agente entrecruzante y retirar el exceso de agua; llevar a cabo una segunda congelación; y realizar una segunda liofilización.

#### **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin embargo, las características y ventajas de la misma se comprenderán mejor en los ejemplos, cuando se lean en relación con las figuras anexas, en donde:

5 La figura 1 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 2 muestra los porcentajes de hinchamiento de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 3 muestra el grado de permeabilidad de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 4 muestra los porcentajes de hinchamiento de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 5 muestra el grado de permeabilidad de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 6 muestra el porcentaje de viabilidad celular de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 7 muestra el porcentaje de viabilidad celular de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 8 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

La figura 9 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de diferentes modalidades específicas del soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

30

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos que comprende alginato y quitosano en una proporción tal que aportan una elasticidad al soporte de hidrogel de entre 30 y 80 kPa así como una estructura porosa, biodegradable

y con propiedades mejoradas de permeabilidad y conductividad, el cual no requiere oxígeno suplementario para su uso en el crecimiento de tejidos.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos que comprende alginato y quitosano con una elasticidad de entre 30 y 80 kPa, poros de un tamaño entre 50 y 200  $\mu\text{m}$ , y una porosidad de entre 70 y 95%.

En una modalidad preferida de la presente invención, la concentración de alginato en el soporte de hidrogel puede ser de 0.1 a 99% p/v, preferiblemente, entre 0.1 y 2% p/v, y más preferiblemente 0.75% p/v.

En una modalidad preferida de la presente invención, la concentración de quitosano en el soporte de hidrogel puede ser de 1 a 99% p/v, preferiblemente, entre 1 y 2% p/v, y más preferiblemente, 1.25% p/v.

En una modalidad opcional de la presente invención, el soporte de hidrogel de alginato y quitosano además comprende nanopartículas metálicas, preferiblemente en una concentración de  $1 \times 10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-9}$  mg/ml en el soporte. Más preferiblemente, dichas nanopartículas son de oro. Además, se prefiere que el tamaño promedio de las nanopartículas metálicas es de entre 65 y 95 nm, determinado preferiblemente utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Opcionalmente, las nanopartículas metálicas pueden estar recubiertas de alginato, quitosano o albúmina para favorecer la adhesión, diferenciación, señalización y el crecimiento celular.

Por otro lado, se ha desarrollado una técnica de entrecruzamiento por medio de liofilización por tiempos específicos que hace que se puedan obtener soportes de hidrogel de alginato y quitosano con propiedades mejoradas de porosidad, porcentaje de hinchamiento y permeabilidad que lo reportado previamente. Estas propiedades favorecen el crecimiento de tejidos, incluyendo células cardíacas, al permitir una excelente hidratación y permeabilidad de nutrientes. Adicionalmente, la adición de nanopartículas metálicas a dichos soportes favorece la adhesión celular, mejora las propiedades mecánicas del soporte y aumenta la conductividad eléctrica, lo que hace que dichos soportes sean aún más apropiados para el crecimiento de los tejidos cardíacos.

Por lo anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para el crecimiento de tejidos que comprende: mezclar alginato y quitosano en una solución acuosa ácida y agitar; llevar a cabo una primera congelación; realizar una primera liofilización; agregar un agente entrecruzante; separar el agente entrecruzante y retirar el exceso de agua; llevar a cabo una segunda congelación; y realizar una segunda liofilización.

En una modalidad preferida de la presente invención la solución acuosa ácida tiene un pH de entre 5 y 7. Preferiblemente, el pH de la solución acuosa ácida es de entre 5 y 6. El ácido empleado para la solución acuosa ácida puede ser cualquier ácido débil, preferiblemente ácido acético.

La mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida puede contener de 0.1 a 99% p/v de alginato, preferiblemente entre 0.1 y 2% p/v, y más preferiblemente 0.75% p/v. Además, la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida puede contener de 0.1 a 99% p/v de quitosano, preferiblemente entre 1 y 2% p/v, y más preferiblemente, 1.25% p/v.

5 En una modalidad preferida de la presente invención la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se mantiene en agitación por un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 2 horas. Preferiblemente, el tiempo de agitación es de 1 hora. Opcionalmente, la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se somete a una etapa adicional de sonicación después de mantenerse en agitación.

10 Existen diferentes agentes entrecruzantes o reticulantes. La elección de uno u otro depende del tipo de materiales que se quiere hacer interactuar o reaccionar. En una modalidad preferida de la presente invención, el agente entrecruzante se selecciona entre: gluconato de calcio, cloruro de calcio, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), poli(2-hidroxietil metacrilato (pHEMA), metilenbisacrilamida, o mezclas de los mismos. Más preferiblemente, el agente entrecruzante se  
15 selecciona de gluconato de calcio, ya que se ha demostrado que dicho compuesto mejora la supervivencia de microorganismos, inhibe apoptosis y mejora la viabilidad celular.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente entrecruzante que se agrega se encuentra en solución en una concentración de entre 0.5 y 1.5% (p/v), más preferiblemente en una concentración de 1% (p/v). Además, el agente entrecruzante se deja reaccionar durante un  
20 tiempo entre 15 y 45 minutos.

La separación del agente entrecruzante y retirar el exceso de agua se puede llevar a cabo por cualquier técnica de separación de sólidos y líquidos. Preferiblemente el agente entrecruzante y el agua en exceso se retiran con una pipeta.

En una modalidad preferida de la presente invención, previo a llevar la primera  
25 congelación, la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se puede colocar en moldes para darle al soporte la forma deseada, la cual preferiblemente es cilíndrica.

En una modalidad preferida de la presente invención, la primera y segunda congelación se llevan a cabo a una temperatura de entre -10 °C y -30 °C, preferiblemente a una temperatura de -20 °C. El tiempo de congelación para la primera y segunda congelación  
30 preferiblemente es de entre 10 y 15 horas, más preferiblemente el tiempo de congelación es de 12 horas.

En una modalidad preferida de la presente invención, la primera y la segunda liofilización se llevan a cabo por un tiempo entre 5 y 10 horas, más preferiblemente 8 horas. La temperatura de liofilización en la primera y la segunda liofilización es de entre -40 °C y -60°C, más

preferiblemente entre -45 °C y -50 °C. Además, preferiblemente la presión de liofilización en la primera y la segunda liofilización es de entre 0.1 y 1 mBar.

En una modalidad adicional de la presente invención, el método comprende una etapa adicional de adición de nanopartículas metálicas para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano que comprenda nanopartículas metálicas. Las nanopartículas metálicas pueden adicionarse a la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida previo a la segunda congelación o después de la segunda liofilización.

Preferiblemente, las nanopartículas metálicas son de oro. Las nanopartículas metálicas se adicionan en una concentración de  $1 \times 10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-9}$  mg/ml en la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida. Además, se prefiere que el tamaño promedio de las nanopartículas metálicas sea de entre 65 y 95 nm. Opcionalmente, las nanopartículas metálicas pueden estar recubiertas de alginato, quitosano o albúmina para favorecer la adhesión, diferenciación, señalización y el crecimiento celular.

La presente invención será mejor entendida a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se presentan únicamente con fines ilustrativos para permitir la comprensión cabal de las modalidades preferidas de la presente invención, sin que ello implique que no existen otras modalidades no ilustradas que puedan llevarse a la práctica con base en la descripción detallada arriba realizada.

## 20 EJEMPLO 1

Se realizó un ensayo para obtener nanopartículas de oro para utilizarse en la elaboración de soportes de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con los principios de la presente invención. Cualquier tipo de nanopartícula metálica puede utilizarse, pero en este ejemplo se describen una modalidad específica preferida por el solicitante.

La primera etapa fue la síntesis de núcleos de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). Para esto, se preparó una solución de PGLA en acetona (10% p/v) y se adicionó a una solución acuosa de F-127 (1% p/v) en proporción 1:20. Se mantuvo en agitación a temperatura constante de 10°C. La solución resultante se sometió a sonicación (20kHz, 10 minutos) y posteriormente se dejó en agitación durante 4 horas. Los núcleos de PGLA se purificaron a través de tres ciclos de lavado mediante centrifugación (9,000 rpm, 30 minutos, 18 °C). La solución de núcleos de PGLA se resuspendió en agua desionizada al volumen inicial.

La segunda etapa fue la preparación de nanosemillas de oro. Para esto se preparó una solución de  $\text{HauCl}_4$  (0.01 M) y 0.125 mL de esa solución se mezcló con 10 mL de una solución de citrato trisódico (0.0256 mM) y 0.3 mL de una solución de  $\text{NaBH}_4$  (0.1 M) hasta la formación de las nanosemillas. La solución resultante se dejó en agitación (24 horas) evitando la luz.

La tercera etapa fue el ensamblado de las nanosemillas de oro con los núcleos de PGLA. Para esto las nanosemillas y los núcleos de PGLA se mezclaron en una proporción 2:1. La mezcla resultante se dejó en agitación (24 horas) evitando la luz. Los ensamblados de nanosemillas de oro y núcleos de PGLA se purificaron a través de centrifugación (7,000 rpm, 18°C, 20 minutos).

5 La cuarta y última etapa fue propiamente la síntesis de nanopartículas de oro. Para esto se mezcló una solución de  $K_2CO_3$  (3.69 mM) con una de  $HauCl_4 \cdot 3H_2O$  (0.025 M) en una proporción 1:50. Los núcleos de PGLA y las nanosemillas se mezclaron con la solución anterior para la formación de las nanopartículas de oro. Finalmente se adicionaron 225  $\mu L$  de ácido ascórbico (0.5 M) para la reducción de sal de oro.

10 Los núcleos de PGLA pueden recubrirse con alginato, para lo cual se mezcla la solución de núcleos de PGLA con una solución de alginato a 1% p/v, en una proporción de 1:20. Se agita de 2 a 4 hrs. Posteriormente se resuspenden los núcleos recubiertos con alginato en agua desionizada, recuperando su volumen inicial.

15 Utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se midieron los tamaños de partícula (diámetro hidrodinámico). La técnica se basa en el movimiento browniano de las partículas que se encuentren en una solución, de manera que estas difieren en su velocidad de desplazamiento. Las partículas de mayor tamaño se desplazan a una menor velocidad que las partículas de menor tamaño.

20 En la Tabla 1 se resumen los valores de tamaño de partícula y potencial Z de las nanopartículas elaboradas en cada etapa.

**Tabla 1**

<b>Nanomaterial</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>	<b>Tamaño de partícula (nm)</b>
Núcleos de PGLA	-35 a -36	170 a 280
Nanosemillas de oro	-33.1	15 a 100
Mezcla núcleos de PLGA- Nanosemillas de oro	-4.46 a -18.3	84 a 200
Nanopartículas de oro	-34.7	65 a 85
Núcleos de PGLA con Alginato	-24 a -22	220 a 320
Mezcla núcleos de PLGA con Alginato-Nanosemillas de oro	-14 a -10	78 a 250

**EJEMPLO 2**

25 Se realizó un ensayo para observar el efecto de los tiempos de entrecruzamiento y agitación en la porosidad del soporte de la presente invención.

Para este ensayo, se elaboraron soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con una modalidad específica del método de conformidad con los principios de la presente invención. Se pesaron 0.75 g de alginato y 1.25 g de quitosano y se colocaron en un vaso de precipitado. Se añadió 100 ml de agua MiliQ y ácido acético buscando que el pH de la solución se mantuviera en un intervalo de 5 a 6. La solución se dejó en agitación (agitación magnética o pulsos de agitación, ver tabla 2) durante 1 hora y luego se sonicó. La solución se colocó en moldes cilíndricos y se llevó a cabo una primera congelación a -20 °C por 12 horas. Se realizó una liofilización durante 8 horas a una temperatura promedio de -49 °C y una presión de 0.100 mBar. Se agregó gluconato de calcio 1% (p/v) para el entrecruzamiento. El tiempo del entrecruzamiento fue de 15 o 30 minutos. Se retiró la solución de gluconato de calcio y se realizaron varios lavados con agua MiliQ. Se dejó en agua MiliQ durante una noche. Se retiró el exceso de agua y se llevó a cabo una segunda congelación a -20 °C por 12 horas. Se realizó una segunda liofilización (-49 °C, 0.100 mBar). Después de 8 horas se obtuvo el soporte de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención.

En la Tabla 2 se muestran las diferentes formas de agitación y tiempos de entrecruzamiento utilizados para obtener cuatro soportes.

**Tabla 2**

<b>Soporte</b>	<b>Agitación</b>	<b>Entrecruzamiento</b>
1	Agitación magnética	15 minutos
2	Pulsos de agitación	15 minutos
3	Agitación magnética	30 minutos
4	Pulsos de agitación	30 minutos

Para observar el efecto de las diferentes formas de agitación y tiempos de entrecruzamiento en la obtención de los soportes, se realizó una microscopía electrónica de barrido de cada uno de los cuatro soportes obtenidos. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la Figura 1, donde se puede observar una imagen de microscopía electrónica de barrido de cada uno de los soportes (Soporte 1 en (A), Soporte 2 en (B), Soporte 3 en (C) y Soporte 4 en (D)). Los soportes tienen poros de diferentes tamaños (50 a 200  $\mu\text{m}$ ) así como una porosidad que varía del 70 al 95%. Dicha porosidad favorece el crecimiento de diferentes células como son las células cardíacas, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, osteocitos, tenocitos, tenoblastos, queratinocitos, entre otros.

**EJEMPLO 3**

Se llevó a cabo un ensayo para observar el efecto de diferentes medios de crecimiento en el porcentaje de hinchamiento de soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención. Para este estudio, se realizaron pruebas de los cuatro soportes celulares elaborados en el ejemplo 2 en diferentes medios como agua ultra pura (miliQ), un buffer de fosfatos salinos (PBS) y en PBS con las nanopartículas de oro obtenidas en el ejemplo 1.

Los porcentajes de hinchamiento fueron medidos de acuerdo con la diferencia del volumen de cada soporte seco y después de someterse a los diferentes medios. Los porcentajes de hinchamiento medidos de cada uno de los soportes se pueden observar en la Figura 2, donde se muestra que el porcentaje de hinchamiento de cada una de las pruebas es superior a 2000%, lo que indica que los soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención tienen una absorción de nutrientes adecuada para llevar a cabo el crecimiento de diferentes tejidos celulares.

#### EJEMPLO 4

Se llevó a cabo una prueba para medir la permeabilidad de los diferentes soportes de hidrogel de alginato y quitosano elaborados en el ejemplo 2 de acuerdo con los principios de la presente invención. Para esta prueba, se sometieron dichos soportes a procesos de hidratación y absorción con agua ultra pura (MiliQ) así como con PBS, midiendo el tiempo de absorción así como el grado de permeabilidad de los diferentes soportes.

El coeficiente de permeabilidad intrínseca ( $k$ ) de una estructura porosa abierta es una medida de la capacidad de un medio fluido para fluir a través de él y se puede determinar midiendo la cantidad de fluido (o gas) que fluye a través del material poroso en un momento dado bajo una presión externa aplicada, como lo captura la ley de Darcy que se muestra a continuación:

$$k = K \frac{\mu}{\rho g}$$

$$K = \frac{a L}{A t} \ln \frac{H_1}{H_2}$$

donde  $\mu$  es la viscosidad del medio,  $\rho$  es la densidad del medio,  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $a$  es el área del tubo,  $A$  es el área transversal al flujo de la muestra,  $L$  es el grosor de la muestra en este caso del andamio y  $H_1$  y  $H_2$  son la altura inicial y final del tubo por el cual pasa el medio.

La permeabilidad de los soportes de hidrogel de alginato y quitosano se determinó mediante un dispositivo diseñado específicamente para este propósito, el cual cuenta con un tubo sujetado con una pinza de dos dedos en un soporte universal. Este tubo tiene dos marcas  $H_1$  y  $H_2$ , entre ambas marcas hay una diferencia de 1.8 cm. En la parte inferior del tubo se colocó el soporte.

Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Figura 3, donde se observa claramente que la permeabilidad varía de 0.5 a  $2 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ , lo cual indica que los poros de los soportes tienen una interconectividad tal que permite el correcto flujo de nutrientes dentro del soporte. En este sentido, la permeabilidad de los soportes de hidrogel de alginato y quitosano está directamente relacionada con el grado de interconectividad de los poros, y es uno de los factores que influyen en la capacidad de regeneración del soporte. La permeabilidad controla el flujo de nutrientes a través del soporte hacia las células que migran en su interior. En estudios realizados se ha encontrado que el crecimiento celular dentro del soporte depende de que los nutrientes puedan permear al interior de la estructura porosa durante el cultivo celular.

### EJEMPLO 5

Se llevó a cabo un estudio para analizar el porcentaje de hinchamiento y el grado de permeabilidad de un soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención que contiene nanopartículas metálicas. Para este estudio, se elaboró un soporte de hidrogel de alginato y quitosano sin nanopartículas metálicas, un soporte de hidrogel de alginato y quitosano con nanopartículas de oro y un soporte de hidrogel de alginato y quitosano con nanopartículas de oro recubiertas de alginato, variando la forma de agitación y el tiempo de entrecruzamiento para cada uno de los anteriores como se muestra en la Tabla 3, y se analizó el porcentaje de hinchamiento y la permeabilidad de cada una de las muestras como en los ejemplos anteriores.

Los soportes de hidrogel de alginato y quitosano se elaboraron como se describe en el ejemplo 2. Posteriormente unos soportes se colocaron en agua MiliQ (sin Nanos), otros fueron colocados en una solución de PBS con nanopartículas de oro (Con NpAu) y otros fueron colocados en una solución de PBS con nanopartículas de oro recubiertas con alginato (con NpAu+Alg), con una concentración de  $3 \times 10^{-12} \text{ mg/ml}$  en el soporte.

**Tabla 3**

Soporte	Agitación	Entrecruzamiento	Nanopartículas
1	Agitación magnética	15 minutos	Sin nanopartículas de oro (Sin Nanos)
2	Agitación magnética	15 minutos	Con nanopartículas de oro (Con NpAu)
3	Agitación magnética	15 minutos	Con nanopartículas de oro recubiertas de alginato (Con NpAu+Alg)
4	Pulsos de agitación	15 minutos	Sin nanopartículas de oro (Sin Nanos)
5	Pulsos de agitación	15 minutos	Con nanopartículas de oro (Con NpAu)

6	Pulsos de agitación	15 minutos	Con nanopartículas de oro recubiertas de alginato (Con NpAu+Alg)
7	Agitación magnética	30 minutos	Sin nanopartículas de oro (Sin Nanos)
8	Agitación magnética	30 minutos	Con nanopartículas de oro (Con NpAu)
9	Agitación magnética	30 minutos	Con nanopartículas de oro recubiertas de alginato (Con NpAu+Alg)
10	Pulsos de agitación	30 minutos	Sin nanopartículas de oro (Sin Nanos)
11	Pulsos de agitación	30 minutos	Con nanopartículas de oro (Con NpAu)
12	Pulsos de agitación	30 minutos	Con nanopartículas de oro recubiertas de alginato (Con NpAu+Alg)

Los resultados de este ensayo se pueden observar en las Figuras 4 y 5, donde se percibe que las muestras elaboradas con agitación magnética y entrecruzamiento de 15 o de 30 minutos, cuentan con un porcentaje de hinchamiento superior a 3000%. Por otro lado, se observa en la Figura 5, que, los soportes con mayor permeabilidad son aquellos que se agitaron con pulsos y tuvieron un tiempo de entrecruzamiento de 15 minutos.

### EJEMPLO 6

Se llevó a cabo un ensayo para analizar la porosidad de los soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención. Para este ensayo la porosidad se determinó mediante un método de desplazamiento de líquido, se utilizó etanol como medio penetrante, ya que no induce a la contracción o hinchamiento, además no es un solvente de los polímeros.

Para obtener los valores de porosidad del soporte de hidrogel de alginato y quitosano se colocó en un cilindro con un volumen conocido del líquido de desplazamiento (etanol) y se dejó durante 48 h. Finalmente se utilizó la siguiente ecuación:

$$Porosidad (\%) = \frac{(w_1 - w_0)}{\rho V} * 100\%$$

Donde:  
W<sub>1</sub>=Peso del andamio saturado  
W<sub>0</sub>=Peso inicial del andamio  
ρ=Densidad del etanol  
V=Volumen de líquido desplazado

Los resultados de este ensayo se pueden observar en la Tabla 4, donde se muestra que los soportes elaborados con agitación magnética o pulsos de agitación y entrecruzamiento de 30 minutos tienen los mayores porcentajes de porosidad.

5

**Tabla 4**

Soporte	Agitación	Entrecruzamiento	Porosidad
1	Agitación magnética	15 minutos	92.73%
2	Pulsos de agitación	15 minutos	87.78%
3	Agitación magnética	30 minutos	93.26%
4	Pulsos de agitación	30 minutos	93.68%

**EJEMPLO 7**

Se llevó a cabo un ensayo para analizar la viabilidad celular en soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención. Para este ensayo, se realizaron cultivos de células cardíacas y se analizó la viabilidad celular en los soportes de la tabla 3. Se realizó un ensayo de citotoxicidad para células en monocapa cultivadas con el medio de cultivo que previamente estuvo en contacto con los soportes de hidrogel de alginato y quitosano a evaluar para medir la viabilidad celular de manera indirecta. Se sembraron 20,000 células en monocapa. Los soportes de hidrogel de alginato y quitosano estuvieron en contacto con 1ml de medio de cultivo celular durante 24h en condiciones normales de incubación (37 °C y una atmósfera húmeda con 5% de CO2) posteriormente este medio de cultivo fue retirado del soporte de hidrogel de alginato y quitosano y se adicionaron 100 µL de este sobrenadante a cada pozo con células sembradas en monocapa. Este proceso se repitió durante 7 veces, que corresponde a un cambio de medio de cultivo por cada 24 h, para posteriormente realizar el ensayo de MTT y determinar cuales son los soportes de hidrogel de alginato y quitosano que presentaron una menor citotoxicidad. Este tipo de ensayo permite detectar si el material libera moléculas citotóxicas al medio, ya sean fragmentos de este tras degradarse o residuos de su síntesis. La viabilidad celular fue evaluada usando el ensayo de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]. Las células vivas convierten el MTT soluble a formazán insoluble en agua. Posteriormente, el formazán fue solubilizado en dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma) para dar un color púrpura y su concentración se determinó mediante densidad óptica a 540 nm en un lector de ELISA.

Los resultados de este ensayo se pueden observar en las figuras 6 y 7, donde se muestra claramente que, en todos los soportes analizados, la viabilidad celular es superior al 70%.

En la figura 7, se muestra cómo los porcentajes de viabilidad celular se mantienen o incluso aumentan cuando el soporte contiene nanopartículas metálicas.

30

Por otro lado, en las figuras 8 y 9, se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de los soportes analizados. Se puede observar que, en los soportes obtenidos con agitación magnética y entrecruzamiento de 30 minutos adicionales con nanopartículas metálicas recubiertas de alginato, se forman esferoides mayores que en los otros soportes observados.

5

De conformidad con lo anteriormente descrito, se podrá observar que los soportes de hidrogel de alginato y quitosano de acuerdo con los principios de la presente invención han sido ideados para el crecimiento de tejidos de forma eficiente, pues tiene una estructura porosa, biodegradable y con propiedades mejoradas de permeabilidad y conductividad, el cual no requiere oxígeno suplementario para su uso, y será evidente para cualquier experto en la materia que las modalidades de la invención según se describió anteriormente e ilustró en los dibujos que se acompañan, son únicamente ilustrativas más no limitativas de la presente invención, ya que son posibles numerosos cambios de consideración en sus detalles sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, es posible variar la forma de agitación, el tiempo de agitación o reposo en las etapas de su fabricación, entre otras condiciones secundarias de su preparación.

10  
15

Por lo tanto, la presente invención no deberá considerarse como restringida excepto por lo que exija la técnica anterior y por el alcance de las reivindicaciones anexas.

## **REIVINDICACIONES**

### **NOVEDAD DE LA INVENCION**

5                   1. Un soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos caracterizado porque comprende alginato y quitosano, tiene una elasticidad de entre 30 y 80 kPa, poros de un tamaño entre 50 y 200  $\mu\text{m}$ , y una porosidad de entre 70 y 95%.

                  2. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la concentración de alginato en el soporte de hidrogel es de 0.1 a 99% p/v.

10                  3. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque la concentración de alginato en el soporte de hidrogel es de 0.1 y 2% p/v.

                  4. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la concentración de alginato en el soporte de hidrogel es de 0.75% p/v.

15                  5. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la concentración de quitosano en el soporte de hidrogel es de 1 a 99% p/v.

                  6. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque la concentración de quitosano en el soporte de hidrogel es de 1 y 2% p/v.

                  7. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque la concentración de quitosano en el soporte de hidrogel es de 1.25% p/v.

25                  8. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende nanopartículas metálicas.

                  9. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas se encuentran en una concentración de  $1 \times 10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-9}$  mg/ml en el soporte.

30                  10. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas son nanopartículas de oro.

                  11. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas tienen un tamaño promedio entre 65 y 95 nm.

12. El soporte de hidrogel para el crecimiento de tejidos de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas están recubiertas de alginato, quitosano o albúmina para favorecer la adhesión, diferenciación, señalización y el crecimiento celular.

5                   13. Un método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para el crecimiento de tejidos caracterizado porque comprende: mezclar alginato y quitosano en una solución acuosa ácida y agitar; llevar a cabo una primera congelación; realizar una primera liofilización; realizar un entrecruzamiento con un agente entrecruzante; separar el agente entrecruzante y retirar el exceso de agua; llevar a cabo una segunda congelación; y realizar una segunda liofilización.

10                   14. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la solución acuosa ácida tiene un pH de entre 5 y 7.

15                   15. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque la solución acuosa ácida tiene un pH de entre 5 y 6.

16. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la solución acuosa ácida contiene ácido acético.

20                   17. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 0.1 a 99% p/v de alginato.

18. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 0.1 y 2% p/v de alginato.

25                   19. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 0.75% p/v de alginato.

30                   20. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 0.1 a 99% p/v de quitosano.

21. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 1 y 2% p/v de quitosano.

22. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida contiene de 1.25% p/v de quitosano.

5 23. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se mantiene en agitación por un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 2 horas.

10 24. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se mantiene en agitación por un periodo de tiempo de 1 hora.

25. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se somete a una etapa de sonicación después de mantenerse en agitación.

15 26. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque el agente entrecruzante se selecciona entre: gluconato de calcio, cloruro de calcio, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), poli(2-hydroxietil methacrilato (pHEMA), metilenbisacrilamida, o mezclas de los mismos.

20 27. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque el agente entrecruzante se selecciona de gluconato de calcio.

28. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque el agente entrecruzante que se agrega se encuentra en solución en una concentración de entre 0.5 y 1.5% (p/v) y se deja reaccionar por un tiempo entre 15 y 45 minutos.

25 29. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque el agente entrecruzante que se agrega se encuentra en solución en una concentración de 1% (p/v) y se deja reaccionar por un tiempo entre 15 y 45 minutos.

30 30. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque el agente entrecruzante y el agua en exceso se retiran con una pipeta.

35 31. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque previo a llevar la primera congelación, la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida se coloca en moldes para darle al soporte la forma deseada.

32. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la primera y segunda congelación se llevan a cabo a una temperatura de entre -10 °C y -30 °C y en un tiempo de entre 10 y 15 horas.

5 33. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque la primera y segunda congelación se llevan a cabo a una temperatura de -20 °C y en un tiempo de 12 horas.

10 34. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque la primera y segunda liofilización se llevan a cabo por un tiempo entre 5 y 10 horas, a una temperatura entre -40 °C y -60°C, y a una presión entre 0.1 y 1 mBar.

35. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque la primera y segunda liofilización se llevan a cabo por un tiempo de 8 horas, a una temperatura entre -45 °C y -50°C, y a una presión entre 0.1 y 1 mBar.

15 36. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque comprende una etapa de adición de nanopartículas metálicas.

20 37. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas se adicionan a la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida previo a la segunda congelación o después de la segunda liofilización.

38. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas son nanopartículas de oro.

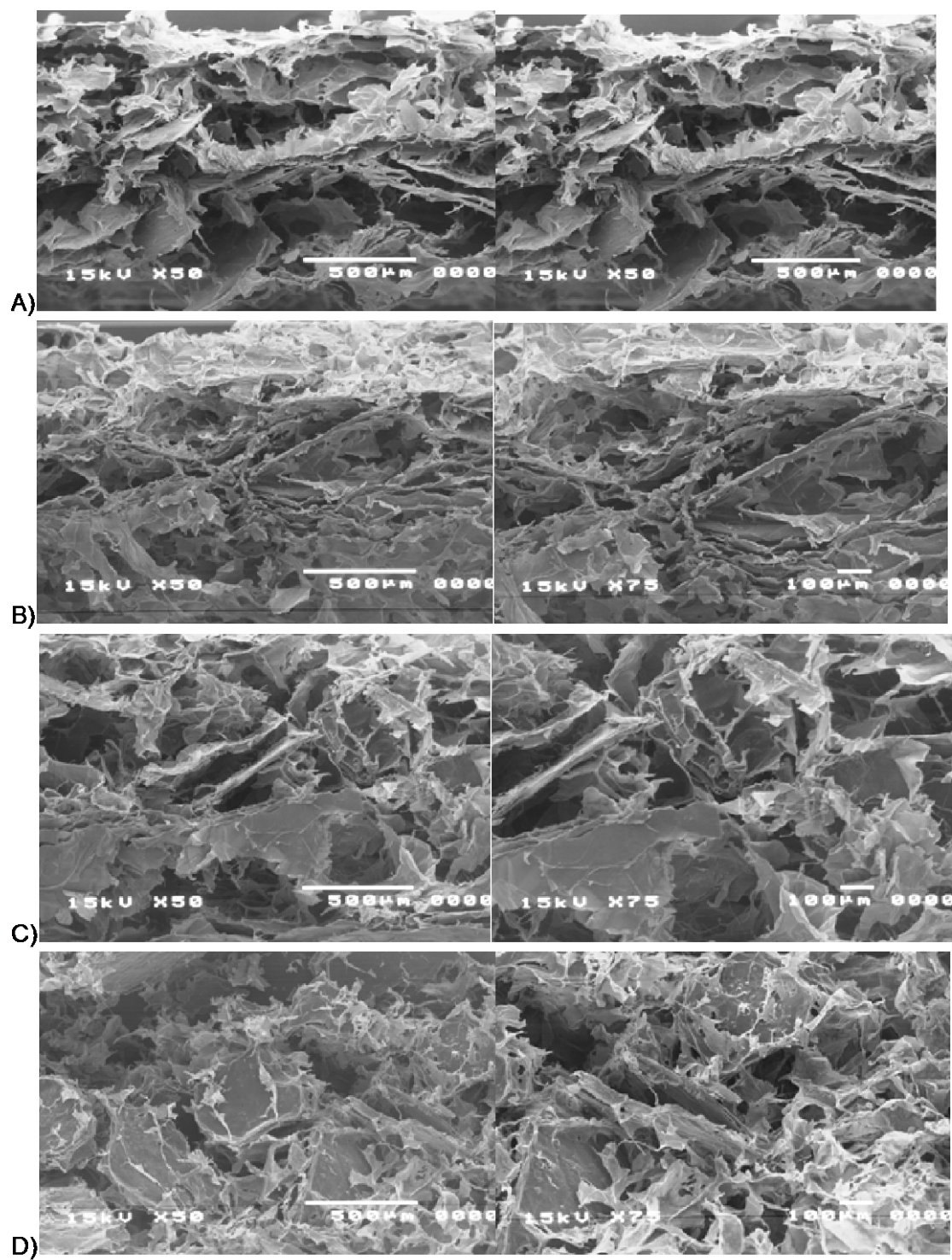
25 39. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas se adicionan en una concentración de  $1 \times 10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-9}$  mg/ml en la mezcla de alginato y quitosano en la solución acuosa ácida.

30 40. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el tamaño promedio de las nanopartículas metálicas es de entre 65 y 95 nm.

35 41. El método para obtener un soporte de hidrogel de alginato y quitosano de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque las nanopartículas metálicas están recubiertas de alginato, quitosano o albúmina para favorecer la adhesión, diferenciación, señalización y el crecimiento celular.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención describe un soporte de hidrogel de alginato y quitosano para crecimiento de tejidos, así como un método para obtener dicho soporte, el cual es adecuado para crecimiento de tejidos, incluyendo células cardiacas, pues comprende una estructura porosa, biodegradable y con propiedades mejoradas de permeabilidad y conductividad; el método para obtener dicho comprende una etapa de liofilización que favorece la permeabilidad y conductividad para el crecimiento de tejidos, especialmente células cardiacas.



**Fig. 1**

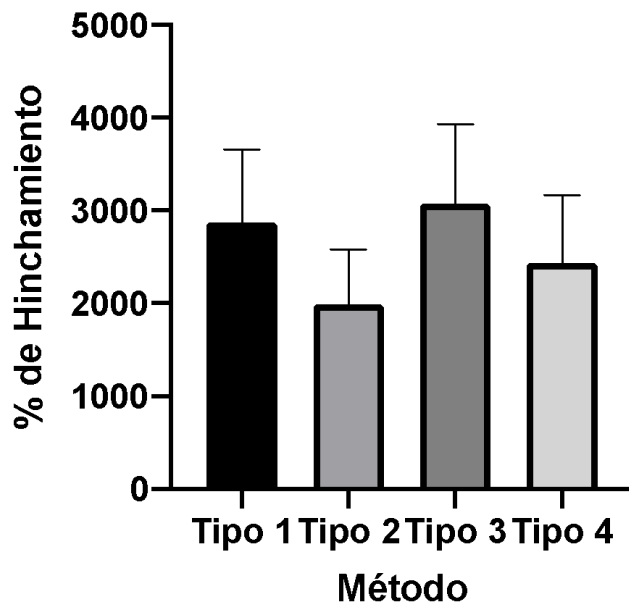


Fig. 2

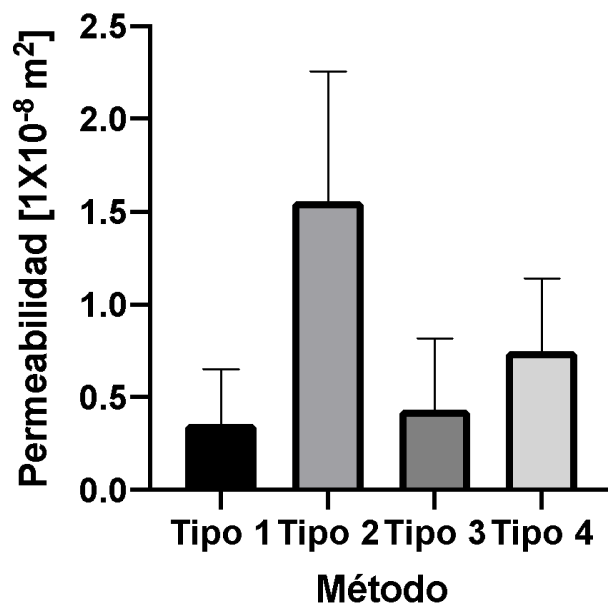


Fig. 3

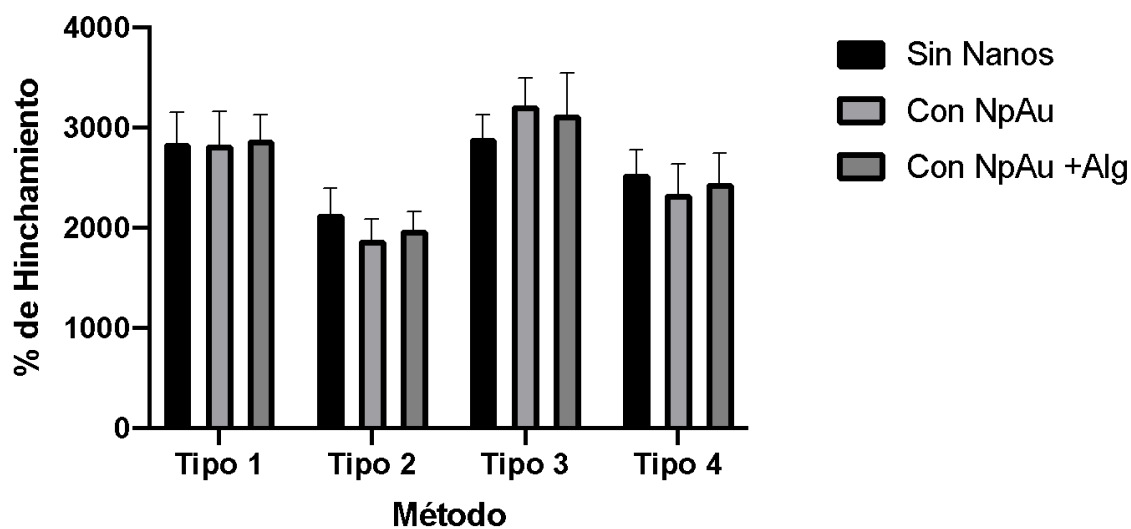


Fig. 4

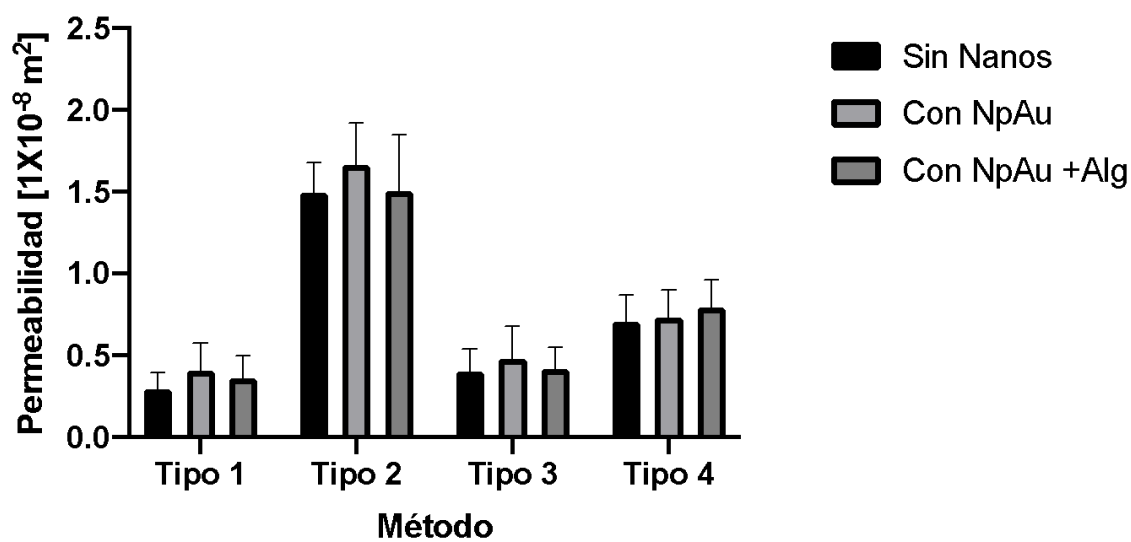
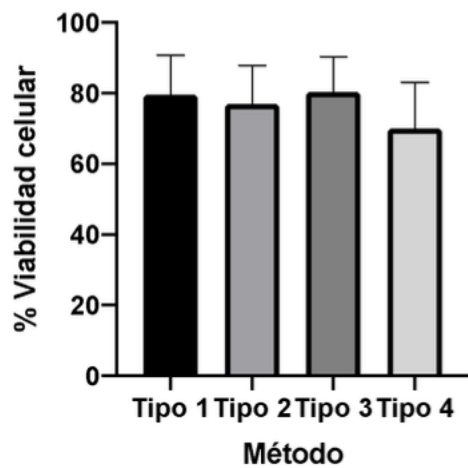
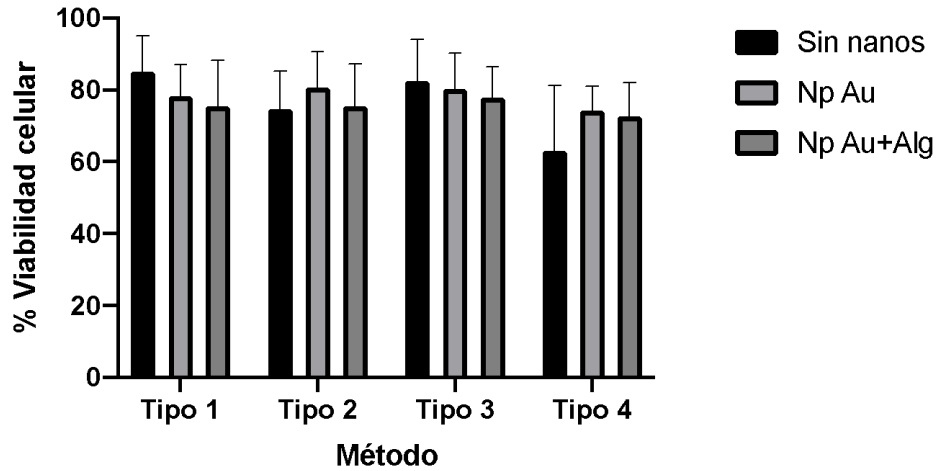


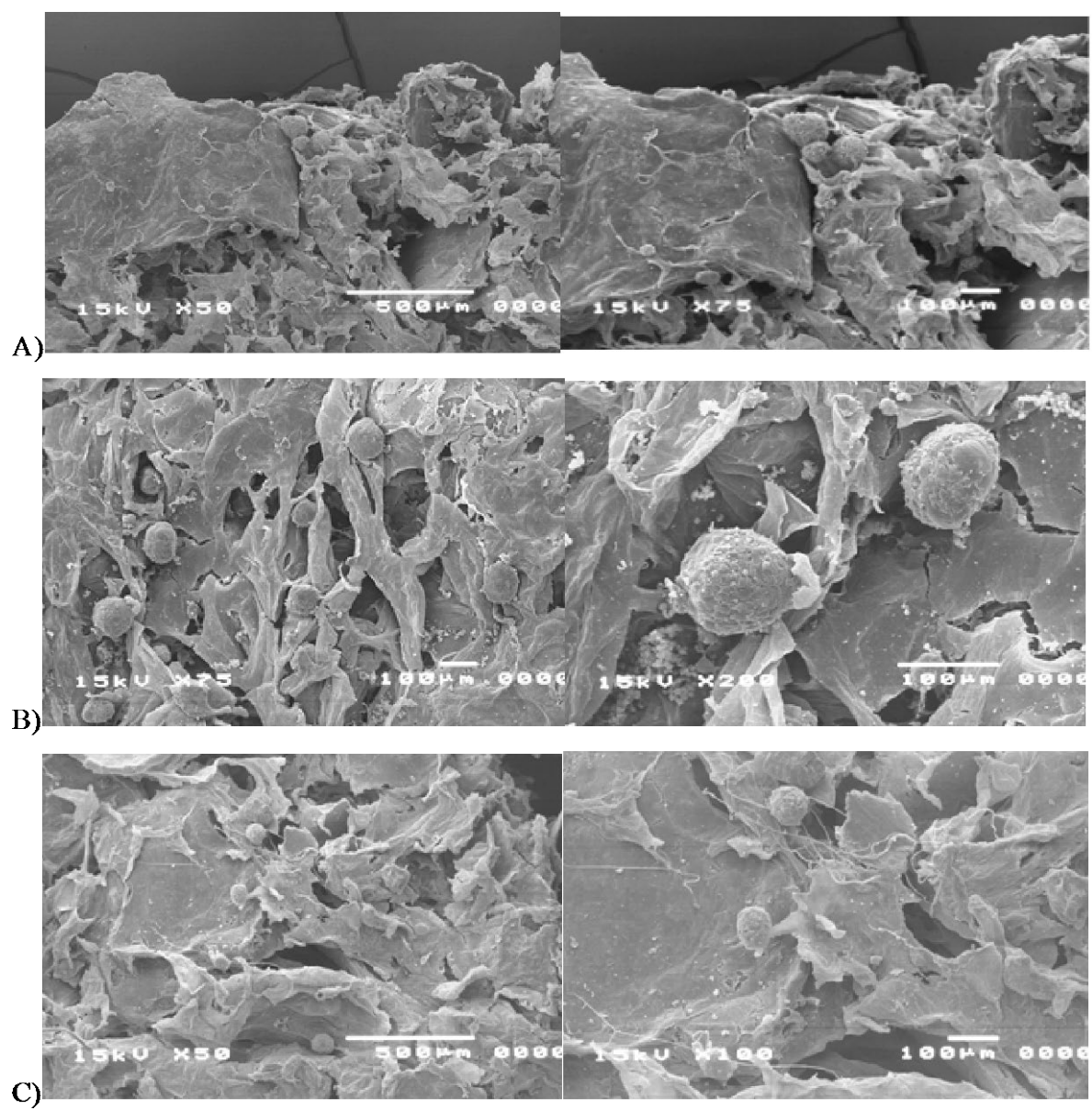
Fig. 5



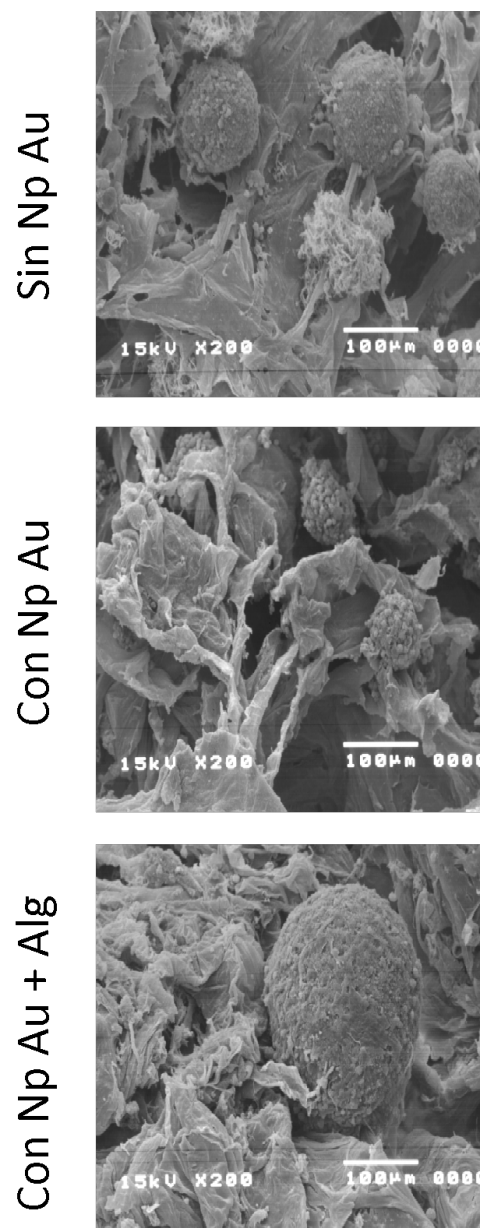
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**