



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE INGENIERÍA**

**“ESTRUCTURAS POLIMÉRICAS NANOFIBROSAS
BIORREASORBIBLES PARA
INGENIERÍA DE TEJIDOS VASCULARES”**

TESIS DOCTORAL

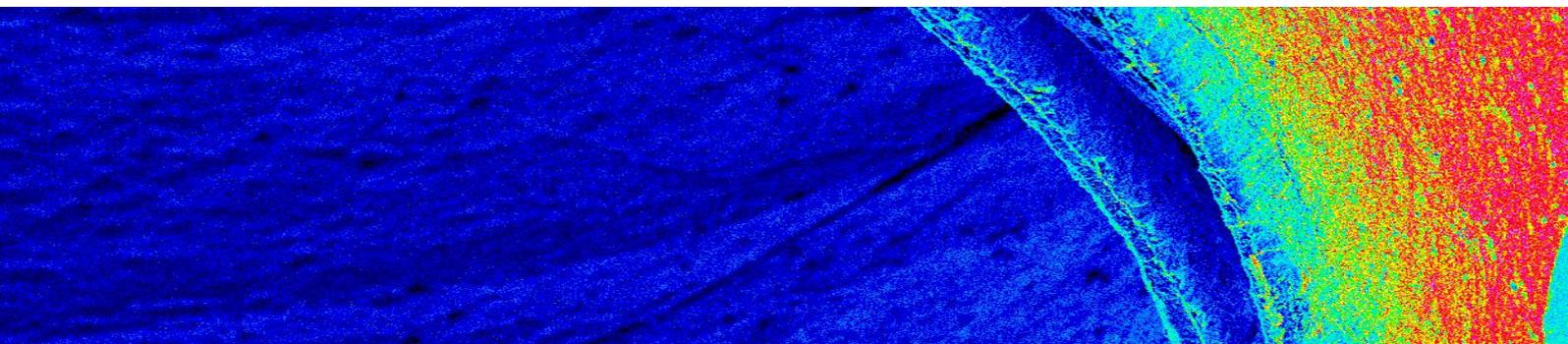
ING. FLORENCIA MONTINI BALLARIN

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

DIRECTOR: DR. GUSTAVO A. ABRAHAM

CO-DIRECTOR: DRA. PATRICIA M. FRONTINI

MAR DEL PLATA, MARZO DE 2015



*A Marcelo,
así de sencillo*

AGRADECIMIENTOS

A mi director el Dr. Gustavo Abraham, por su conocimiento, forma de trabajar, calidez humana, paciencia, dedicación, libertad, confianza y sus muchas respuestas frente a todas las preguntas planteadas a lo largo de este doctorado.

A mi co-directora la Dra. Patricia Frontini, por su vasto conocimiento, dedicación, consejos, ayuda, y sus respuestas y sugerencias de gran valor para el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad Nacional de Mar del Plata y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, por la financiación del trabajo de investigación. A CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral que permitió llevar a cabo esta tesis.

A los Dres. Ricardo Armentano Feijoo, Leandro Cymberknop del Grupo de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería de la Universidad Tecnológica Nacional Regional Buenos Aires y a los MScs. Diego Suárez Bagnasco y Guillermo Balay y al Dr. Carlos Negreira del Laboratorio de Ultrasonido de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Uruguay por la colaboración prestada en la realización de estudios mecánicos.

Al Ing. Daniel Calvo y los Dres. Francisco Rojo y Gustavo Guinea del Laboratorio de Biomateriales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad Politécnica de Madrid, España por recibirme y por la colaboración prestada en la realización de estudios mecánicos.

A los Farms. Luis Díaz-Gómez e Isabel Rial, y los Dres. Carmen Alvarez-Lorenzo y Angel Concheiro del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de

Santiago de Compostela, España por la colaboración prestada en la realización de los estudios biológicos.

Al Grupo de Procesamiento Digital de Imágenes del Departamento de Electrónica de la UNMDP por la ayuda prestada en el procesamiento de las micrografías.

Al personal de las División Ex Polímeros y de INTEMA, y al MSc. José Vilá (Lab. de Microscopía de la UNMDP) por la ayuda prestada en la operación de los equipos.

A todos los integrantes de la Facultad de Ingeniería y el INTEMA por hacer del lugar de trabajo un ambiente ameno y alegre.

A los Pablos, Vane, Agus, Guada, todos los temporales: Cris, Luis, Livia, Ale, Mari, Juani y Katia, y los agregados: Humar y Lauri, por todos los momentos, charlas, congresos, mates, y catas compartidos.

A mi Mamá que me trajo a este mundo y también al mundo de la ciencia, GRACIAS por todos los consejos (tanto en la vida cotidiana como laboral), miles de cartas y solicitudes leídas, idas y vueltas de la facu, en resumen por TODO.

A mi Papá, con el que comparto mucho más que los genes, GRACIAS por los consejos, por insistir en que baje las revoluciones, por hacerme reír y por TODO.

A mi Amorsis, sin vos claramente estos últimos 4 meses no hubieran sido lo mismo. GRACIAS por decirme todos los días que todo va a salir bien, por el apoyo diario y por aguantar todos los viajes, y fines de semana y feriados de trabajo. GRACIAS por TODO.

A mi hermano Seba, y toda mi familia, GRACIAS, *measure your life in love*. A mi abuela, por todos los rezos y siempre preocuparse durante este doctorado.

A mis amigas, Ale, Mica, Melu, Ceci, Luli, Euge, Belu, Maca, Deby, Ile, Juli, Paz, Car, y Meli gracias por aguantarse todas las veces que dije “tengo que escribir la tesis”, gracias por estar, por preguntar, y por las salidas y reuniones divertidas.

A mis amigos del resto del mundo, Alba, Audrey, François, Sarah, Andy, Jerry y Qian que hicieron que mis estancias en el exterior fueran menos solitarias y más alegres.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	4
<i>Capítulo 1: Introducción</i>	7
1.1. Biomateriales e ingeniería de tejidos.....	8
1.2. Polímeros biorreabsorbibles sintéticos: poli(L-ácido láctico) y poli(éster uretano) segmentado.....	16
1.3. Tejidos vasculares: estructura, afecciones y soluciones actuales.....	21
1.4. Ingeniería de tejidos vasculares.....	27
1.5. Estrategias para la obtención de estructuras tridimensionales porosas.....	31
1.6. Procesos electrohidrodinámicos.....	33
1.6.1. Fundamentos de electrohilado de soluciones poliméricas.....	33
1.6.2. Propiedades intrínsecas de la solución.....	37
1.6.3. Parámetros del proceso de electrohilado.....	40
1.6.4. Morfología de nanofibras.....	45
1.7. Objetivos e hipótesis.....	48
1.8. Descripción de la estructura y contenido de la tesis.....	50
1.9. Bibliografía.....	51
<i>Capítulo 2: Obtención de injertos vasculares nanofibrosos</i>	58
2.1. Introducción.....	59
2.2. Materiales y métodos.....	65
2.2.1. Materiales.....	65
2.2.1.1. Materiales.....	65
2.2.1.2. Síntesis de poli(éster uretano) segmentado.....	66
2.2.2. Obtención de matrices nanofibrosas planas y tubulares mediante electrospinning de soluciones poliméricas.....	67
2.2.2.1. Obtención de matrices nanofibrosas planas de PLLA, PHD y sus mezclas.....	67
2.2.2.2. Preparación de matrices alineadas de PLLA.....	69
2.2.2.3. Preparación de estructuras tubulares nanofibrosas de pequeño diámetro.....	70
2.2.3. Caracterización morfológica y topográfica.....	71
2.2.3.1. Análisis de la morfología fibrosa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	71
2.2.3.2. Análisis de micrografías de SEM mediante Image Pro-Plus y un algoritmo de morfología matemática.....	71
2.3. Resultados.....	72
2.3.1. Injertos vasculares de PLLA.....	72
2.3.1.1. Optimización de propiedades intrínsecas de soluciones y parámetros de procesamiento.....	72
2.3.1.2. Tubuladuras de pequeño diámetro.....	74
2.3.1.2.1. Influencia de la velocidad de rotación en la topografía de tubuladuras de pequeño diámetro.....	74
2.3.1.2.2. Efecto del campo eléctrico en la topografía.....	77
2.3.2. Injertos vasculares de PHD.....	82

2.3.2.1. Optimización de propiedades intrínsecas y parámetros de procesamiento	82
2.3.2.2. Tubuladuras de pequeño diámetro.....	84
2.3.3. Injertos vasculares multicapa PHD/PLLA.....	86
2.4. Conclusiones parciales	90
2.5. Bibliografía.....	91
<i>Capítulo 3: Caracterización y estudio del comportamiento degradativo in vitro de injertos vasculares electrohilados.....</i>	<i>99</i>
3.1. Introducción	100
3.2. Materiales y métodos	105
3.2.1. Materiales.....	105
3.2.2. Ensayo degradativo in vitro.....	105
3.2.3. Caracterización fisicoquímica.....	106
3.2.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	106
3.2.3.2. Cromatografía de permeación de geles (GPC)	106
3.2.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	107
3.2.3.4. Ángulo de contacto	107
3.2.4. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	107
3.3. Resultados	108
3.3.1. Caracterización de los injertos de PLLA, PHD y sus mezclas sin degradar	108
3.3.1.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	108
3.3.1.2. Cromatografía de permeación de geles (GPC)	109
3.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	110
3.3.1.4. Ángulo de contacto	114
3.3.2. Estudio de la degradación in vitro.....	115
3.3.2.1. Estudio de la degradación in vitro mediante GPC	115
3.3.2.2. Estudio de la degradación in vitro mediante DSC	119
3.3.2.3. Estudio de la degradación in vitro mediante ángulo de contacto y SEM.....	126
3.4. Conclusiones parciales	132
3.5. Bibliografía.....	134
<i>Capítulo 4: Estudio del desempeño mecánico de injertos vasculares electrohilados</i>	<i>137</i>
4.1. Introducción	138
4.2. Materiales y métodos	141
4.2.1. Materiales.....	141
4.2.2. Ensayos de tracción.....	141
4.2.3. Ensayos de resistencia a la sutura.....	143
4.2.4. Determinación de la variación de diámetro con la presión aplicada	144
4.2.4.1. Ensayos dinámicos en biorreactor	144
4.2.4.2. Ensayos de presión vs. diámetro a distintos L/L0	149
4.2.5. Ensayos de presión de reventado	151
4.3. Resultados	152

4.3.1. Ensayos de tracción.....	152
4.3.2. Ensayos de resistencia a la sutura	159
4.3.3. Determinación de la variación de diámetro con la presión aplicada	161
4.3.3.1. Ensayos dinámicos en biorreactor para injertos de PLLA y PHD	161
4.3.3.2. Ensayos de presión vs. diámetro para injertos bicapa de distinto espesor	168
4.3.3.3. Ensayos dinámicos en biorreactor para injertos bicapa de espesor #3	180
4.3.4. Ensayos de presión de reventado	185
4.4. Conclusiones parciales	189
4.5. Bibliografía	190
<i>Capítulo 5: Citocompatibilidad y repuesta celular de matrices nanofibras electrohiladas frente a distintos estímulos</i>	<i>197</i>
5.1. Introducción	198
5.2. Materiales y métodos	205
5.2.1. Materiales.....	205
5.2.1.1. Materiales.....	205
5.2.1.2. Obtención de preparación rica en factores de crecimiento (PRGF).....	205
5.2.1.3. Obtención de matrices nanofibras electrohiladas	206
5.2.2. Caracterización fisicoquímica de matrices nanofibras electrohiladas	207
5.2.3. Cultivos in vitro	207
5.2.3.1. Ensayos de proliferación de células madre mesenquimales (MSC).....	207
5.2.3.2. Evaluación de la morfología y citocompatibilidad de las células.....	208
5.2.3.3. Estudio del proceso de liberación de proteínas	209
5.2.3.4. Cultivos celulares con estímulos mecánicos en biorreactor	209
5.3. Resultados	210
5.3.1. Cultivos in vitro sobre matrices de PLLA.....	210
5.3.1.1. Cultivo de MSC en matrices nanofibras con distintas topografías.....	210
5.3.1.2. Cultivo de MSC en matrices con distinto estímulo químico	213
5.3.1.3. Cultivos celulares con estímulos mecánicos en biorreactor	218
5.3.2. Cultivo in vitro en matrices nanofibras de PLLA/PHD con la composición de las capas interna y externa de los injertos vasculares	220
5.4. Conclusiones parciales	221
5.5. Bibliografía	222
<i>Capítulo 6: Modelado del comportamiento mecánico de los injertos vasculares bajo presión interna</i>	<i>228</i>
6.1. Introducción	229
6.2. Materiales y métodos	231
6.2.1. Materiales.....	231
6.2.2. Modelo y ecuaciones constitutivas.....	232

6.3. Resultados	235
6.3.1. Análisis de la tensión circunferencial de pared con el modelo de dos capas.....	235
6.3.1.1. Corroboración del modelo de dos capas	235
6.3.1.2. Estudio de la variación del módulo elástico de las capas individuales del injerto en el comportamiento final del mismo ...	236
6.3.1.3. Estudio de la variación del espesor de las capas individuales del injerto en el comportamiento final del mismo	239
6.3.1.4. Estudio de la variación del diámetro interno del injerto en el comportamiento final del mismo	240
6.3.2. Análisis de la tensión circunferencial de pared con el modelo de tres capas.....	242
6.4. Conclusiones parciales	244
6.5. Bibliografía	244
<i>Capítulo 7: Conclusiones finales y Trabajos futuros</i>	<i>248</i>
7.1. Conclusiones finales.....	249
7.2. Trabajo futuro	251
<i>Capítulo 8: Publicaciones científicas</i>	<i>253</i>
8.1. Publicaciones científicas en revistas internacionales.....	254
8.2. Capítulos de libros	255
8.3. Publicaciones en revistas de divulgación científica	256
8.4. Participación en congresos nacionales e internacionales	256
8.4.1. Congresos internacionales	256
8.4.2. Congresos nacionales	259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de las etapas seguidas en un procedimiento de ingeniería de tejidos: 1) extracción de células, 2) cultivo para expansión, 3) sembrado en matriz con o sin factores de crecimiento, 4) cultivo <i>in vitro</i> estático y en biorreactores, 5) implantación del tejido diseñado en el lugar dañado (<i>in vivo</i>) (a). Micrografía de la etapa 4) del esquema anterior mostrando el cultivo <i>in vitro</i> (b).	13
Figura 1.2. Estructura química de las unidades repetitivas de los polímeros biodegradables sintéticos más usuales.	18
Figura 1.3. Estructura química de los diferentes estereo-isómeros del monómero de ácido láctico y la unidad repetitiva resultante, el centro quiral está marcado con *. ROP = polimerización por apertura de anillo. a) L-ácido láctico, b) D,D-ácido láctico, y c) meso-ácido láctico (Stridsberg, 2002).	19
Figura 1.4. Estructura química de un SPEU (Caracciolo, 2008; Caracciolo, 2009).	21
Figura 1.5. Esquema de la estructura en capas de las arterias.....	23
Figura 1.6. Fotografías de injertos vasculares sintéticos comerciales de a) Dacron® y b) Goretex®.....	26
Figura 1.7. Ejemplos de matrices porosas para aplicaciones en ingeniería de tejidos obtenidas por distintas técnicas, a) disolución de partículas (Chatterjee, 2012), b) separación de fases sólido-líquido, c) autoensamblado (Achilli, 2010) y d) manufactura aditiva (Yeong, 2004).	33
Figura 1.8. Montaje experimental básico para electrohilado de soluciones... ..	36
Figura 1.9. Micrografía de SEM de la estructura poliuretánica electrohilada de una solución en DMF/THF 50/50 a) 6% m/v y b) 12,5% m/v, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.....	38
Figura 1.10. Algunos tipos de colectores utilizados en el proceso de electrohilado: a) colector plano, b) colector rotatorio de disco, c) placas paralelas, y d) colector de punta.....	42
Figura 1.11. Efecto de velocidad de infusión, concentración y tensión aplicada en la morfología resultante de procesos electrohidrodinámicos (adaptada de Zamani, 2013).	45
Figura 1.12. a) Micrografía de transmisión y b) de barrido de fibras huecas obtenidas por la técnica de electrohilado coaxial (Li, 2010).....	47
Figura 2.1. Equipo de electrohilado con colector rotatorio. 1) Controlador de velocidad del mandril, 2) bomba de infusión, 3) boquilla, 4) fuente de alta tensión y 5) mandril rotatorio.	70
Figura 2.2. Micrografías SEM de matrices electrohiladas de PLLA a partir de soluciones al a) 7%, b) 10% y c) 15% p/v.....	73

Figura 2.3. a) Fotografía de la estructura tubular obtenida y b) micrografía SEM de un injerto vascular de PLLA de 4 mm.	75
Figura 2.4. a), c) Micrografías SEM y b), d) distribución de ángulos de las paredes de injertos vasculares para $\varnothing = 4$ mm y $r=1000$ y 3000 rpm respectivamente.	76
Figura 2.5. Líneas de campo eléctrico modeladas por elementos finitos para: a) placa colectora y b) colector de placas paralelas. c) Micrografías SEM de las matrices obtenidas empleando un colector plano y d) colector de placa paralelas.	78
Figura 2.6. Histogramas correspondientes a las matrices aleatoria (a, c) y alineada (b, d) obtenidos por las técnicas de procesamiento de imágenes IPM (a, b); y MA (c, d).	79
Figura 2.7. a) Micrografía SEM de la estructura nanofibrosa obtenida y b) histograma de distribución de ángulos de orientación de las nanofibras.	80
Figura 2.8. a) Micrografía SEM de la superficie de la estructura nanofibrosa tubular de PLLA, b) histograma de distribución de diámetros, y sus histogramas de distribución de ángulos medidos por c) IPM y d) MA. .	81
Figura 2.9. Micrografías SEM de las muestras de PHD a) 3, b) 2, c) 8 y d) 9.	84
Figura 2.10. a) Micrografías SEM de un injerto vascular electrohilado de PHD y detalle de su pared, b) morfología nanofibrosa de la pared, c) histogramas del diámetro de fibra y d) ángulo de la muestra.	86
Figura 2.11. Micrografías SEM a) de la capa externa y b) la capa interna, obtenidas a partir de la mezcla basada en proporciones en volumen, y c) capa externa y d) la capa interna, obtenidas a partir de la mezcla basada en proporciones en peso.	88
Figura 2.12. Micrografías SEM de la pared de tubuladuras electrohiladas a partir de las mezclas a) externa e b) interna.	89
Figura 2.13. Micrografías SEM del injerto nanofibroso bicapa.	90
Figura 3.1. Esquema del mecanismo de escisión hidrolítica de cadenas de PLA (Dias, 2012).	101
Figura 3.2. Esquema del mecanismo de degradación hidrolítica propuesto para PHD (adaptada de Guelcher, 2008).	103
Figura 3.3. Espectro ATR-FTIR para la a) capa interna, b) externa, c) PHD, y d) PLLA.	109
Figura 3.4. Termogramas de DSC de a) la capa interna, b) capa externa, c) PHD y e) PLLA electrohilados, y los polímeros sin procesar d) PHD y f) PLLA.	110
Figura 3.5. Termogramas de DSC de la capa interna, a) en un primer, y b) segundo calentamiento.	113

Figura 3.6. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para las matrices electrohiladas de PLLA (■), la capa externa (○), la capa interna (◇) y PHD (▲)	115
Figura 3.7. Peso molecular relativo de los injertos electrohilados de PLLA, PHD, capa externa e interna (a, c, e, g), e IP (b, d, f, h) a distintos tiempos de degradación hidrolítica.	117
Figura 3.8. Picos de elución de los injertos electrohilados de a) PLLA, b) PHD, c) capa externa e d) interna sin degradar (negro) y luego de 34 semanas (rojo) de degradación.	119
Figura 3.9. Termogramas de DSC del PLLA a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.	120
Figura 3.10. Termogramas de DSC del PHD a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.	121
Figura 3.11. Termogramas de DSC de la capa externa a) sin degradar, b) luego de 16 semanas y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.	123
Figura 3.12. Termogramas de DSC de la capa interna a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.....	124
Figura 3.13. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de PLLA en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□), 16 (○), 24 (Δ) y 34 (◇) semanas.	127
Figura 3.14. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de PHD en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□), 16 (○) y 24 (Δ) semanas.	128
Figura 3.15. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de capa externa en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆) y 8 (□) semanas.	129
Figura 3.16. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de capa interna en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□) y 16 (○) semanas.....	130
Figura 3.17. Micrografías SEM de los injertos electrohilados de PLLA (a, b, c), PHD (d, e, f), la capa externa (g, h, i) e interna (j, k, l) en función del tiempo degradación a 1 semana (a, d, g, j), 16 (b, e, h, k) y 34 (c, f, i, l) semanas.....	132
Figura 4.1. Curvas de presión-diámetro tipo “J” para arterias coronarias de seres humanos de distinta edad (Claes, 2010).....	139
Figura 4.2. a) Máquina de ensayos universales utilizada para los ensayos de tracción, b) y probeta de injerto bicapa montada en la misma.	142
Figura 4.3. Ensayos de sutura, a) con nudo de lazo simple y b) con lazo pasante.	143
Figura 4.4. a) Esquema del montaje experimental usado (adaptado de Falasco, 2005). b) Fotografía del montaje utilizado para medir espesores mediante sistema A-scan: 1) reservorio de líquido, 2) sistema de	

posicionamiento gradual mecánico, y 3) muestra colocada en el sistema de posicionamiento durante la medición del espesor.	147
Figura 4.5. Esquema del montaje experimental usado. Aire (línea negra), suero fisiológico para interior del injerto (línea celeste), y suero fisiológico para mantener la cámara a temperatura controlada (línea amarilla).	150
Figura 4.6. Equipamiento utilizado para los ensayos de presión-diámetro.	151
Figura 4.7. Curvas tensión deformación para a) las matrices nanofibras de los polímeros puros (PLLA rojo, PHD negro), y las mezclas presentes en las capas individuales (externa azul, interna verde), y b) los injertos vasculares bicapa en dirección axial (negro) y circunferencial (rojo).	153
Figura 4.8. a) Ondas de presión aplicadas en los intervalos 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul). Frecuencia: 60 ± 5 latidos por minuto. b) Ondas de diámetro medido para los intervalos 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).	162
Figura 4.9. Lazo de presión versus diámetro para a) injertos vasculares de PLLA y b) PHD para 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).	164
Figura 4.10. Variación de presión con respecto al valor mínimo de presión y el diámetro con respecto al valor mínimo para PLLA (negro) y PHD (rojo) en el intervalo fisiológico 80-120 mmHg.	164
Figura 4.11. Lazo de presión - diámetro para injertos vasculares de PLLA a altas presiones (azul) y PHD a bajas presiones (rojo), y arteria femoral (negro).	168
Figura 4.12. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro).	169
Figura 4.13. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa (negro) de a) espesor #1, b) espesor #2 y c) espesor #3, comparadas con arterias coronarias jóvenes (azul) y envejecidas (rojo) (Claes, 2010).	171
Figura 4.14. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa (negro) de a) espesor #1, b) espesor #2 y c) espesor #3, comparadas con arterias radiales (verdes), arterias mamarias (azul) y venas safenas (rojo) envejecidas (Claes, 2010).	173
Figura 4.15. Curvas de fuerza vs desplazamiento axial para un injerto vascular bicapa, a un alargamiento axial $L/L_0 = 1,05$ (negro) y $L/L_0 = 1,1$ (rojo).	174
Figura 4.16. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapas de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro) a $L/L_0 = 1,05$ (a) y $L/L_0 = 1,1$ (b).	175
Figura 4.17. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro) a $L/L_0 = 1,05$ y las arterias coronarias envejecidas (verde) y jóvenes (celeste) a $L/L_0 = 1,1$ (Claes, 2010).	176

Figura 4.18. <i>Compliance</i> (10^{-2} mmHg) para injertos vasculares bicapas de espesor #1, #2 y #3 comparada con arterias coronarias, mamarias, radiales, mamarias y venas safenas calculada en los intervalos a) 50-90 mmHg, b) 80-120 mmHg y c) 110-150 mmHg para $L/L_0=1$ (Claes, 2010). ..	178
Figura 4.19. <i>Compliance</i> (10^{-2} mmHg) para injertos vasculares bicapa de espesor #1, #2 y #3 a $L/L_0 = 1,05$ comparada con arterias coronarias a $L/L_0 = 1,1$, calculada en los intervalos a) 50-90 mmHg, b) 80-120 mmHg y c) 110-150 mmHg (Claes, 2010).	180
Figura 4.20. Lazo de presión versus diámetro para injertos vasculares bicapa de espesor #3 para 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).....	182
Figura 4.21. Injerto vascular bicapa montado en la máquina de ensayos, a) antes y b) después del ensayo de reventado.	186
Figura 4.22. Curva modelo del ensayo presión-deformación hasta rotura para un injerto de espesor #3.	187
Figura 5.1. Efecto de la arquitectura de la matriz soporte en la adhesión y unión celular (adaptada de Stevens, 2005).....	199
Figura 5.2. Células con orientación preferencial en la dirección circunferencial de dos injertos vasculares debido a: a) la alineación de las nanofibras (Uttayarat, 2010), y b) como resultado de aplicar una deformación axial cíclica en un biorreactor (Dermedenoudis, 2010).....	202
Figura 5.3. Esquema del colector utilizado para obtención de matrices con nanofibras alineadas.....	206
Figura 5.4. Resultados del análisis por SEM y los histogramas para fibras (a, b) aleatorias y (c, d) alineadas de PLLA.	211
Figura 5.5. (a-b) Micrografías SEM y (c-d) micrografía confocal de MSC cultivadas en (a-c) una matriz de PLLA al azar, y (b-d) alineadas, y sus correspondientes histogramas de distribución de ángulos (e) y (f).....	212
Figure 5.6. Espectros de FTIR de a) polvo de PRGF, y b) matrices de PLLA/PRGF 10/5, c) 10/3, d) 10/1 y e) 10/0.....	214
Figura 5.7. Suma acumulativa de proteínas liberadas a partir de matrices porosas de PLLA/PRGF en PBS a 37°C. *Diferencia estadística significativa con respecto a la matriz 10/0 ($p<0,05$).	216
Figura 5.8. Proliferación de MSC en matrices de PLLA:PRGF mediante ensayo de MTT. * Igualdad estadística significativa con respecto a la matriz 10/0 ($p<0,05$); # Igualdad estadística significativa con respecto al control + ($p<0,05$).	217
Figura 5.9. Micrografía confocal de MSC cultivadas en una matriz de a) PLLA con topografía aleatoria, y b) alineada con 5% p/v de PRGF.....	218
Figura 5.10. (a, b)Biorreactor para cultivos celulares con estímulo de tracción, y c) micrografía de la matriz luego de ser cultiva en el biorreactor.	219

Figura 5.11. Proliferación de MSC en matrices de PLLA/PHD 90/10 y 50/50 mediante ensayo de MTT. # Igualdad estadística significativa con respecto al control + ($p < 0,05$).	220
Figura 6.1. Esquema representativo del modelo de tres capas concéntricas. La capa interna presenta un radio interno $r = a$ y está sometida a una presión interna P_1 . La unión de la capa interna y la media (en $r = b$) presenta una presión P_2 . La interface en la capa media y la externa en $r = c$, sufre una presión P_3 . La presión externa P_0 actúa en $r = d$	233
Figura 6.2. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3.	235
Figura 6.3. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con: a) la capa interna variante (interna: negro, PLLA: verde, PHD: rojo); b) la capa externa variante (externa: negro, PLLA: verde y PHD: rojo); c) la capa interna de PHD y la externa variante (externa: negro, PLLA: verde y interna: rojo); d) la capa externa de PHD y la interna variante (interna: negro, PLLA: verde y interna: rojo); e) la capa interna de PLLA y la externa variante (externa: negro, PHD: verde y interna: rojo); f) la capa externa de PLLA y la interna variante (externa: negro, PHD: verde y interna: rojo).	238
Figura 6.4. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con espesor original (negro), espesor un 50% superior (rojo) y el doble de espesor (verde).	239
Figura 6.5. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con 5 mm (original) (negro), 3 mm (rojo) y 2 mm de diámetro interno (verde).	240
Figura 6.6. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con 2 mm de diámetro interno y el doble de espesor. .	241
Figura 6.7. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para un injerto tricapa con la capa externa de la mezcla externa, la capa media de la mezcla interna y la capa interna de PLLA (verde) y PHD (rojo), y capa externa de PLLA (negro) y PHD (azul), capa media de mezcla externa y capa interna de mezcla interna.	242
Figura 6.8. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para un injerto tricapa de 2 mm de diámetro interno y 0,45 mm de espesor, con capa externa de PLLA, capa media de mezcla externa y capa interna de mezcla interna.	243

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Registro de pacientes en lista de espera y donantes de la Argentina	9
Tabla 2.1. Parámetros de electrohilado estudiados para soluciones de PLLA..	68
Tabla 2.2. Diámetro y ángulo medio, y sus respectivas desviaciones estándares para las estructuras vasculares obtenidas.	75
Tabla 2.3. Soluciones de PHD estudiadas y su morfología resultante	83
Tabla 3.1. M_n , M_w e IP de los injertos electrohilados de PLLA, PHD y sus mezclas.	109
Tabla 3.2. Propiedades térmicas del PLLA y PHD sin procesar, y del PLLA, PHD, capa interna y externa electrohilados.....	111
Tabla 3.3. Propiedades térmicas del PLLA a distintos tiempos de degradación.	120
Tabla 3.4. Propiedades térmicas del PHD a distintos tiempos de degradación	122
Tabla 3.5. Propiedades térmicas de la capa externa a distintos tiempos de degradación.	123
Tabla 3.6. Propiedades térmicas de la capa interna a distintos tiempos de degradación.	125
Tabla 3.7. Diámetro medio para las muestras de los injertos luego de 1, 16 y 34 semanas de degradación.	132
Tabla 4.1. Módulo de Young de PLLA, PHD y sus mezclas formando las capas interna y externa.	154
Tabla 4.2. Módulo de Young, resistencia a la rotura y deformación a la rotura en las direcciones circunferencial y axial de los injertos bicapa.	155
Tabla 4.3. Resistencia a la sutura de los injertos vasculares bicapa.....	159
Tabla 4.4. Medidas de espesor de la pared (h) mediante ultrasonido (sistema A-Scan).	161
Tabla 4.5. Medidas dinámicas para los intervalos de presión. PR: Intervalo de presión, P_s , P_D , D_s : diámetro externo en sístole, D_D : diámetro externo en diástole, y σ_M	163
Tabla 4.6. Propiedades mecánicas de los injertos vasculares: %C y $E_{P\Box}$	165
Tabla 4.7. Propiedades mecánicas de arterias femorales ovinas: %C y E_{P_e}	166
Tabla 4.8. %C (10^{-2} mmHg) a distintos intervalos de presión para los injertos vasculares bicapa, arterias coronarias, mamarias, radiales y venas safenas. .	177
Tabla 4.9. %C (10^{-2} mmHg) a distintos intervalos de presión para los injertos vasculares bicapa a $L/L_0 = 1,05$, y arterias coronarias a $L/L_0 = 1,1$	179
Tabla 4.10. Medidas dinámicas para los injertos bicapa en distintos intervalos de presión. PR, P_s , P_D , D_s , D_D , σ_M	181

Tabla 4.11. Propiedades mecánicas de los injertos vasculares bicapa: %C y E_{Pe}	183
Tabla 4.12. Presión de reventado para injertos bicapa a distintos L/L_0	187
Tabla 5.1. Soluciones de PLLA/PRGF en DCM/DMF 60/40.....	207
Tabla 5.2. T_g , T_c y T_m , ΔH_c , ΔH_m , y X_c para el PLLA sin procesar, matrices electrohiladas de PLLA y PLLA/PRGF.....	215

ÍNDICE DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

PLA: poli(ácido láctico) o polilactida
PGA: poli(ácido glicólico) o poliglicolida
PLLA: poli(L-ácido láctico)
PG: poligliconato (Maxon®)
PLGA: poli(ácido láctico-co-glicólico)
PDLGA: poli(D,L-lactida-co-glicolida)
PCL: poli(ϵ -caprolactona)
PLCL: poli(L-lactida-co- ϵ -caprolactona)
PGC: poligecaprona
PHB: poli(3-hidroxi-butirato)
PDS: polidioxanona
PPF: poli(propilén fumarato)
SPU: poliuretanos segmentados
SPEU: poli (éster uretano) segmentado
PEUU: poli(éster uretano)urea
PET: poli(etilén tereftalato)
ePTFE: poli(tetrafluoroetileno) expandido
PGS: poli(glicerol sebacato)
PEO: poli(óxido de etileno)
PMMA: poli(metil metacrilato)
PRP: plasma rico en plaquetas
PRGF: preparación rica en factores de crecimiento
MSC: células madre mesenquimales
DCM: diclorometano
DMF: *N,N*-dimetilformamida
THF: tetrahidrofurano
TFE 2,2,2-trifluoroethanol
DMAc: *N,N*-dimetilacetamida
HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
TIPS: separación de fases inducida por temperatura
 M_n : peso molecular promedio en número
 M_w : peso molecular promedio en masa
IP: índice de polidispersidad (M_w/M_n)
C: concentración
V: tensión
d: distancia boquilla-colector
f: velocidad de infusión
d-placas: distancia entre placas colectoras
r: velocidad de rotación
 \emptyset : diámetro interno de los injertos
SEM: microscopía electrónica de barrido
FTIR: espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier
GPC: cromatografía de permeación de geles
DSC: calorimetría diferencial de barrido
BCA: ensayo de proteínas (ácido bicinonínico)

T_g : temperatura de transición vítrea
 T_c : temperatura de cristalización
 T_m : temperatura de fusión
 ΔH_c : entalpía de cristalización
 ΔH_m : entalpía de fusión
 X_c : porcentaje de cristalinidad
 $\%C$: *compliance* dinámica
 E_{pe} : módulo elástico incremental
 P_s : presión máxima (sístole, mmHg)
 P_D : presión mínima (diástole, mmHg)
 R_s : radio interno máximo (sístole, mm)
 R_D : radio interno mínimo (diástole, mm)
 D_s : diámetro externo en sístole
 D_D : diámetro externo en diástole
 P : presión transmural
 ε : deformación circunferencial
 D : diámetro del injerto
 D_0 : diámetro inicial
 P_m : presión media
 R_m : radio medio
 h : espesor de pared
 σ_m : tensión circunferencial de pared media
 L/L_0 : alargamiento axial
PR: Intervalo de presión
CWS: tensión de pared circunferencial
FGTN: distribución granulométrica de tamaños normalizada
IPM: procesamiento de imágenes manual
MA: algoritmo matemático

RESUMEN

En los últimos 60 años, el empleo de injertos sintéticos de Dacron® y ePTFE ha sido la única alternativa a los injertos autólogos y homólogos. Sin embargo, ninguno de estos injertos ofrece potencial de regeneración, y más aún, todos están asociados con diferentes niveles de trombogenicidad, estenosis y susceptibilidad a infecciones. La obtención de un injerto vascular de pequeño diámetro (< 6 mm) con un comportamiento apropiado y permanente aún representa un gran desafío. El desarrollo de un conducto para operaciones de *bypass* coronario que se encuentre inmediatamente disponible para su uso, sin tiempos prolongados de cultivos *in vitro*, y con las propiedades mecánicas y biológicas necesarias, es el principal desafío de las investigaciones actuales en el campo de la ingeniería de tejidos vasculares.

El injerto vascular ideal debe cumplir numerosos atributos: biocompatibilidad, no trombogenicidad, no toxicidad, *compliance* mecánica, resistencia a la hiperplasia neointimal, resistencia a la infección, facilidad para sutura, flexibilidad y elasticidad sin colapso por retorcimiento, facilidad de fabricación, características de manejo adecuadas para la implantación quirúrgica, disponibilidad en diversos tamaños y longitudes, capacidad para liberar localmente agentes terapéuticos, no inducción de malignidades, funciones biológicas y potencial de regeneración de tejidos. Con este panorama, la técnica de electrohilado constituye una tecnología ideal para diseñar injertos vasculares. Esta tesis estudia en profundidad la tecnología de electrohilado para la obtención de injertos vasculares bicapa de pequeño diámetro con un comportamiento biomimético.

El *primer capítulo* presenta una introducción general sobre la ingeniería de tejidos, las afecciones coronarias y los tratamientos actuales, la historia de la ingeniería de tejidos vasculares, y las técnicas de obtención de matrices porosas. El *capítulo 2* detalla los avances recientes en el desarrollo de injertos vasculares mediante la técnica de electrohilado y presenta el trabajo experimental llevado a cabo para la producción de matrices electrohiladas e injertos vasculares por dicha técnica. Este capítulo

está centrado en la fabricación de las matrices nanofibrosas y en la optimización de los parámetros del procesamiento para obtener estructuras reproducibles con morfología de fibras uniformes. Se utilizan dos polímeros biorreabsorbibles, poli(L-ácido láctico) y poli(éster uretano) segmentado sintetizado por nuestro grupo. Se producen injertos vasculares nanofibrosos monocapa y bicapa a partir de los polímeros puros y sus mezclas.

Los *capítulos 3, 4 y 5*, abarcan la caracterización de los diferentes injertos producidos a través de tres aspectos fundamentales para la ingeniería de tejidos. El *capítulo 3* estudia la caracterización térmica, físico-química y propiedades de superficie de los injertos y cómo las diferentes composiciones afectan estas propiedades. Se estudia también el comportamiento degradativo hidrolítico de los materiales poliméricos electrohilados empleados en el *capítulo 2*. En el *capítulo 4*, se realiza una caracterización mecánica completa de los injertos vasculares monocapa y bicapa mediante ensayos de tracción uniaxial, ensayos de sutura, ensayos de *compliance* dinámica, y ensayos de presión de reventado. El aspecto biológico es abordado en el *capítulo 5*, donde se analiza el efecto de diferentes estímulos (químicos, topográficos, mecánicos) en la proliferación celular. También, se estudia la citotoxicidad de las matrices electrohiladas *in vitro* mediante ensayos MTT de proliferación de células madre mesenquimales.

El *capítulo 6* presenta una primera aproximación del modelado mecánico, aplicando un modelo sencillo para observar la influencia de la composición y cantidad de las capas del injerto y sus dimensiones (espesor y diámetro interno) en la respuesta del mismo a presión interna.

El *capítulo 7* resume los resultados de esta tesis, presentando las conclusiones obtenidas y un panorama de los aspectos a explorar en el futuro para mejorar y optimizar los injertos vasculares de pequeño diámetro desarrollados.

Los estudios efectuados permitieron la obtención de injertos vasculares bicapa nanofibrosos mediante el electrohilado secuencial de soluciones de mezclas poliméricas. En general, las estructuras tubulares

bicapa preparadas presentaron: a) un comportamiento mecánico que imita la respuesta frente a regímenes de presión pulsátil de arterias coronarias y los vasos sanguíneos utilizados para su reemplazo; b) una velocidad de degradación hidrolítica equivalente para sus dos capas y con un tiempo de degradación coincidente con el tiempo de regeneración del tejido *in vitro*; c) una biocompatibilidad aceptable, demostrada por la proliferación de células madre mesenquimales, con valores superiores al control positivo para la capa externa. Todas estas cualidades son altamente deseadas para el diseño de una matriz polimérica para ingeniería de tejidos vasculares. Por lo tanto, los injertos bicapa electrohilados resultan estructuras con un alto interés para la ingeniería de tejidos vasculares como dispositivos degradables de pequeño diámetro para reemplazo de arterias coronarias. Además, los resultados del modelado indicaron que el agregado de una tercera capa externa más rígida, en conjunto con el incremento del espesor de pared conduce a una mayor distensibilidad. Por otro lado, el modelo es capaz de predecir que un menor diámetro, como el encontrado en arterias coronarias más pequeñas, también presenta propiedades biomiméticas.

ABSTRACT

In the last 60 years, the use of synthetic grafts like Dacron® and ePTFE has been the only alternative to autografts and homografts. However, none of these grafts presents a regeneration potential. Even more, all are associated with different levels of thrombogenicity, stenosis, and infection susceptibility. To these days, the production of a small diameter vascular graft (< 6 mm) with an appropriate and permanent response still presents a challenge. The development of an off-the-shelf conduit, without long *in vitro* culture periods, with proper biological and mechanical properties for coronary bypass surgery is the principal challenge of vascular tissue engineering current studies.

The ideal vascular graft must achieve numerous attributes: biocompatibility, no thrombogenicity, no toxicity, mechanical compliance, resistance to neointimal hyperplasia, resistance to infection, suturability, flexibility and elasticity without twisting collapse, ease of manufacture, proper handling characteristics for surgery implantation, availability in different sizes and length, capacity of locally therapeutic agents release, no induction of malignancies, biological functions and potential tissue regeneration. Within this overview, the electrospinning technique constitutes an ideal technology for vascular grafts design. This thesis deeply studies the electrospinning technique for the production of bilayered small-diameter vascular grafts with a biomimetic behavior.

The *first chapter* presents a general introduction to tissue engineering, coronary diseases and its current treatments, the history of vascular tissue engineering, and scaffolds production techniques. *Chapter 2* reviews recent advances in vascular grafts development by the electrospinning technique and presents the experimental work done in the production of electrospun scaffolds and vascular grafts by this technique. This chapter is focused on nanofibrous scaffold production and the optimization of the processing parameters in order to obtain reproducible structures with bead-free uniform nanofibers. Two bioreabsorbable

polymers are used, poly(L-lactic acid) and segmented poly(ester urethane) synthesized by our group. Monolayered and bilayered nanofibrous vascular grafts are produced from the polymers and its blends.

Chapters 3, 4 and 5 focus on the different grafts characterization through three fundamental aspects for tissue engineering. *Chapter 3* studies the grafts thermal, physico-chemical and surface properties and how the different compositions affect them. The hydrolytic degradation behavior of the electrospun polymeric materials used in *chapter 2* is also studied. In *chapter 4*, a complete mechanical characterization of the monolayered and bilayered vascular grafts is made by uniaxial tension, suture, dynamical compliance and burst pressure tests. The biological aspect is boarded in *chapter 5*, where the effect of different stimulus (chemical, topographic, mechanical) in cell proliferation is analyzed. The cytotoxicity of the electrospun scaffolds is studied by studying mesenchymal stem cells proliferation by *in vitro* MTT tests.

Chapter 6 presents a first approach of mechanical modeling, by applying a simple model to observe the graft dimensions (thickness and internal diameter), composition and number of layers influence in its response to internal pressure.

Chapter 7 resumes the main results of this thesis, presenting the final conclusions and an outlook of the aspects to explore in the future, in order to improve and optimize the small-diameter vascular grafts developed.

The performed studies allowed the fabrication of bilayered nanofibrous vascular grafts by sequential electrospinning of polymeric blend solutions. In general, the obtained bilayered tubular structures presented: a) a mechanical behavior that mimics the response to pulsatile pressure regimes of coronary arteries and vessels used for its replacement; b) an equivalent hydrolytic degradation rate for both of the grafts layers with a degradation time in agreement with the *in vitro* tissue regeneration time; c) an acceptable biocompatibility, as proved by mesenchymal stem cells proliferation, with higher values respect to the positive control for the external layer. All these qualities are highly desired for vascular tissue

engineering scaffold production. Hence, the electrospun bilayered grafts are structures with a deep interest for vascular tissue engineering as small-diameter degradable devices for coronary arteries replacement. Moreover, the modeling results showed that the incorporation of a third layer with higher stiffness, along with a thickness increase leads to a higher compliance. On the other hand, it is foreseen that a smaller diameter, as found in smaller coronary arteries, also presents biomimetic properties.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Biomateriales e ingeniería de tejidos

Cada día se realizan miles de procedimientos quirúrgicos que requieren tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar los que sufren de alguna patología, herida o traumatismo. Entre las aproximaciones tradicionales para estos tratamientos a través de la sustitución de tejidos y órganos se encuentran los implantes biológicos (autoinjerto o reconstrucción quirúrgica, aloinjerto o trasplante, xenoinjerto) y los dispositivos biomédicos basados en biomateriales (Langer, 1993; Mooney, 1999; Langer, 1999; Chapekar, 2000; Hoerstrup, 2004).

Autoinjerto o autoplastia (autografting): involucra la extracción de tejidos sanos de un determinado lugar del paciente para trasplantarlo en otra parte del mismo paciente. Los injertos autólogos típicamente producen los mejores resultados clínicos, dado que no existen causas para el rechazo inmune. Sin embargo, existen varios problemas asociados con esta terapia, infección y dolor en la zona de extracción, hematoma, pérdida de sangre, necesidad de transfusión (con los riesgos inherentes), falta de disponibilidad de tejido, y altos costos entre otras desventajas.

Aloinjerto u homoplastia (allografting): en este procedimiento se emplean tejidos u órganos de un individuo donante y se trasplantan a otro. Para el caso de extracción de corazón, riñón, hígado, páncreas o hueso el donante debe haber fallecido recientemente, pero se puede extraer pulmón y riñón de donantes vivos. Aunque la tecnología de trasplantes ha mejorado notablemente en las últimas décadas con el desarrollo de drogas anti-rechazo, las principales limitaciones se encuentran en el riesgo del rechazo por el sistema inmunológico del paciente, la posibilidad de producir una infección o transmitir alguna enfermedad y sobre todo la escasa disponibilidad de donantes. El Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI), organismo que impulsa, normaliza, coordina y fiscaliza las actividades de donación y trasplante de

órganos, tejidos y células en nuestro país, publica diariamente las estadísticas de demanda de tejidos, órganos y células. Como se puede apreciar, el número de pacientes en lista de espera supera ampliamente el número de donantes reales (Tabla 1.1). El número de donantes por millón de habitantes en octubre de 2014 fue de 10,94.

Tabla 1.1. Registro de pacientes en lista de espera y donantes de la Argentina

República Argentina	
Población	42669500
<i>Lista de Espera de órganos y tejidos (LE) y Enfermedad Renal Crónica (ERC)</i>	
Registro de pacientes con ERC (PAIERC)	2556
Pacientes en diálisis	28345
Pacientes inscriptos en LE	11230
Pacientes en proceso de inscripción	9833
<i>Procuración (año en curso)</i>	
Registros de Glasgow 7	2820
Donantes Reales	469
Donantes Multiorgánicos	271
Donantes de Tejidos	373
<i>Trasplantes (Tx) (año en curso)</i>	
Cantidad de Tx (órgano/tejidos)	2169
Pacientes bajo el programa de medicación inmunosupresora	4033

Fuente: INCUCAI, WWW.INCUCAI.GOV.AR (acceso 31 de octubre de 2014)

Xenoinjerto (xenografting): involucra el implante de tejidos de otras especies, previamente tratados para reducir las reacciones de antigeneicidad, eventos de trombosis, calcificación, etc. El empleo de pericardio bovino, convenientemente tratado, como válvula cardíaca preparada a partir de materiales de origen biológico y la piel porcina liofilizada para la cobertura temporal de quemaduras hasta que sea posible la realización del autoinjerto, constituyen dos ejemplos del uso de tejidos provenientes de individuos de otra especie.

Dispositivos biomédicos basados en biomateriales: la ciencia y tecnología de biomateriales ha permitido la creación de materiales y dispositivos biomiméticos para reemplazar, aumentar o extender diversas funciones

realizadas por los sistemas biológicos. Los ejemplos son numerosos y van desde dispositivos de asistencia cardíaca hasta prótesis de cadera o implantes de mamas. Muchos de estos sistemas han producido un enorme impacto en la calidad de vida y en la cantidad de vidas salvadas.

Los materiales empleados en estas terapias están, sin embargo, sujetos a eventos de fatiga, fractura, desgaste, toxicidad, inflamación, y falta de remodelación con el tiempo (crecimiento, cambio de forma, respuesta, etc.). Además, los dispositivos actuales no se comportan fisiológicamente como tejidos u órganos. Por ejemplo, los dispositivos de asistencia cardíaca están diseñados para terapias temporarias, como puente hasta la disponibilidad de un órgano donado y viable.

En este contexto resulta evidente que esta estrategia terapéutica posee serias limitaciones. La ingeniería de tejidos (*tissue engineering*) surgió a finales del siglo XX como una aproximación multi- e interdisciplinaria para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para el tratamiento de falla o reemplazo de órganos, las que están relacionadas principalmente con la dificultad de obtener tejidos u órganos para su trasplante y la falta de una recuperación funcional completa, constituyendo éste uno de los principales problemas mundiales en el sistema de salud. La denominación “ingeniería de tejidos” se propuso en una reunión auspiciada por la *Nacional Science Foundation* en 1987 (Skalak, 1988), donde se definió este campo de investigación y desarrollo como (Nerem, 2006):

“la aplicación de los principios y métodos de ciencias de la ingeniería y la vida para el conocimiento fundamental de la relación entre estructura y función en tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de substitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de

Una década después D.F. Williams definió ingeniería de tejidos como:

“La persuasión del cuerpo para curarse a sí mismo, ayudado por la presencia de células apropiadas, biomoléculas y estructuras de soporte en situaciones donde la evolución ha determinado que el ser humano no tiene” (Williams, 1999).

En 2009, D.F. Williams redefinió a la ingeniería de tejidos como:

“la estimulación deliberada y controlada de determinadas células blanco, a través de una combinación sistemática de señales moleculares y mecánicas” (Williams, 2009).

En la ingeniería de tejidos confluyen diversas disciplinas que se complementan, ciencias químicas, biológicas y médicas (bioquímica, biomecánica, biología celular, inmunología, fisiología, anatomía, cardiología, ortopedia, etc.), ingenierías (ciencia y tecnología de materiales, mecánica computacional, cinética química y dinámica de fluidos), bio y nanotecnologías (cultivo celular, separación de células y transfección génica), entre otras.

El desarrollo de la biología molecular y celular, genética y la ingeniería de tejidos condujo a la aparición de la medicina regenerativa como un campo nuevo de investigación interdisciplinario, que involucra tanto el empleo de matrices extracelulares como de moléculas solubles, terapia génica y terapia con células madre. Sin embargo, actualmente los términos ingeniería de tejidos y medicina regenerativa se emplean indistintamente.

La definición de ingeniería de tejidos no hace ninguna mención a un tipo de biomaterial en particular y se reconoce ampliamente que la ingeniería de tejidos no involucra un material convencional. Si consideramos el paradigma clásico de la ingeniería de tejidos normalmente se emplea un material, en la forma de matriz o andamiaje poroso (*scaffold*), para proporcionar una forma al tejido en construcción y para facilitar la

liberación de señales moleculares y mecánicas. Una de las estrategias que se aborda consiste en el sembrado de células en matrices porosas y degradables. Desde sus orígenes, los mayores esfuerzos se han dirigido al diseño y desarrollo de diferentes materiales y tecnologías de fabricación para satisfacer la alta demanda existente de tejidos (O'Brien, 2011). En esta aproximación, el punto de partida es el diseño de biomateriales con una composición química y arquitectura tal que tenga la capacidad de conformar una matriz extracelular artificial, un entorno en el que tienen lugar los procesos celulares que conducen al crecimiento de los tejidos. El concepto de biomaterial abarca entonces, al compuesto formado por la matriz y las células sembradas. Si durante un proceso *ex-vivo* en un biorreactor la matriz se degrada y se reemplaza por el tejido regenerado, el resultado es también un biomaterial.

La matriz porosa actúa como una guía para la formación de tejido y normalmente se siembra con células y ocasionalmente con factores de crecimiento o es sometida a estímulos bio-físicos en un biorreactor, un dispositivo o sistema que aplica diferentes tipos de estímulos mecánicos o químicos a las células (Figura 1.1.) (O'Brien, 2011). Para cumplir satisfactoriamente esta función, los biomateriales deben poseer una extensa serie de requisitos, muchos de los cuales dependen de cada aplicación en particular, (Kramschuster, 2013; O'Brien, 2011). Estos requerimientos son:

Biocompatibilidad: este es un requerimiento fundamental, y puede definirse como:

ODEDSDELGDGGHXQELRPDWHULDOSDUDEHMHUFHUMXIXQELyQERQUHVS
 una terapia médica, sin provocar ningún efecto indeseable local o sistémico en el beneficiario de tal terapia, y generando una respuesta celular o tisular apropiada en esa situación específica, y optimizando el rendimiento clínicamente relevante de la terapia (Williams, 2008).

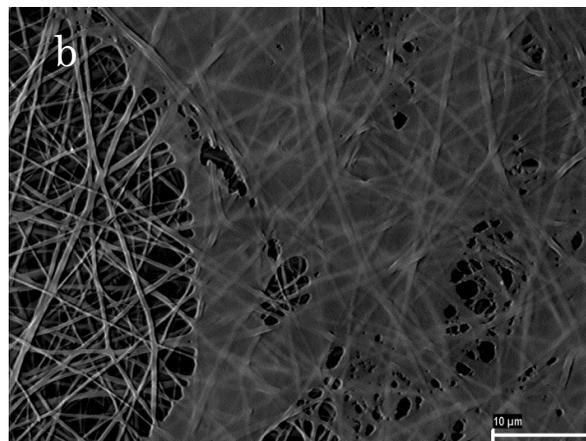
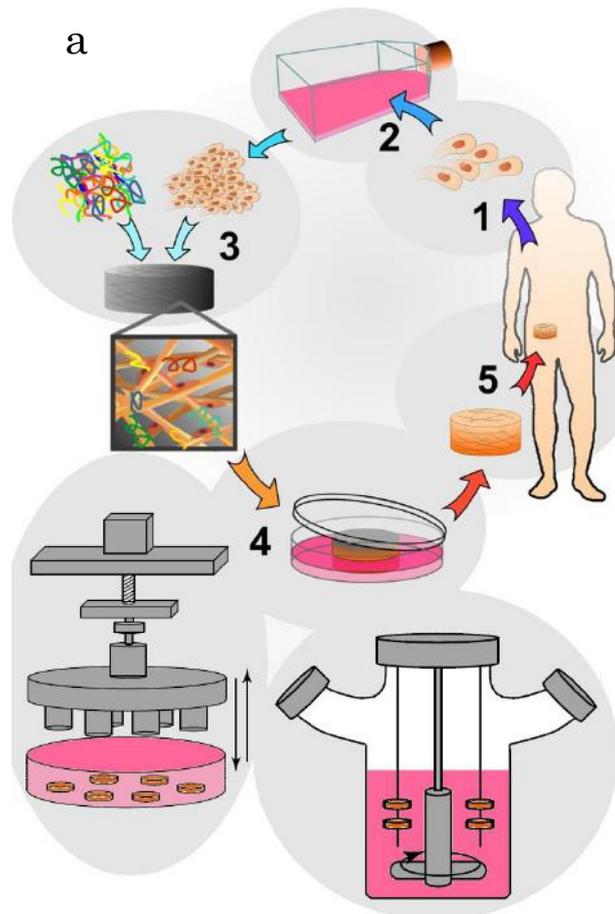


Figura 1.1. Esquema de las etapas seguidas en un procedimiento de ingeniería de tejidos: 1) extracción de células, 2) cultivo para expansión, 3) sembrado en matriz con o sin factores de crecimiento, 4) cultivo *in vitro* estático y en biorreactores, 5) implantación del tejido diseñado en el lugar dañado (*in vivo*) (a). Micrografía de la etapa 4) del esquema anterior mostrando el cultivo *in vitro* (b).

Biodegradabilidad, biorreabsorbabilidad: la matriz debe ser degradada *in vivo* para permitir que las células produzcan su propia matriz extracelular. Los productos resultantes de la degradación no deben ser tóxicos y deben poder metabolizarse mediante las rutas metabólicas o salir del organismo sin interferir con otros órganos. Este proceso, denominado biorreabsorción implica la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales. El proceso de degradación debe ocurrir idealmente en sincronización con el proceso de reparación o regeneración, para lo cual se requiere una respuesta inflamatoria combinada con un proceso de infusión de macrófagos.

Propiedades mecánicas: la matriz debe tener propiedades mecánicas consistentes con la sollicitación mecánica propia del lugar anatómico en el cual será implantada, y desde un punto de vista práctico, resistir el manejo quirúrgico durante la operación.

Arquitectura: las matrices deben tener una estructura porosa interconectada, con alta porosidad para asegurar la penetración celular y una difusión adecuada de nutrientes a las células dentro del sistema y hacia la matriz extracelular formada por dichas células. Más aún, se requiere una porosidad interconectada para permitir también, la difusión de los productos de desecho y de degradación fuera de la matriz, sin interferencia con los tejidos y órganos circundantes. Los poros necesitan tener un tamaño suficientemente grande para permitir que las células migren dentro de la estructura permitiendo la vascularización; pero deben ser suficientemente pequeños para establecer una superficie específica suficientemente alta que conduzca a una densidad crítica de células en la matriz. Por lo tanto, existe un intervalo crítico de tamaño de poros que puede cambiar dependiendo del tipo de célula y tejido que se está regenerando.

Tecnología de producción: para que una matriz porosa o sistema de ingeniería de tejidos sea comercialmente y clínicamente viable debe involucrar un proceso rentable, que incluya todas sus etapas hasta la esterilización y manipulación final, y en algunos casos factible de ser producido en masa.

El comportamiento celular está fuertemente influenciado por señales biológicas y bioquímicas de la matriz extracelular. La inspiración para el diseño de nuevos biomateriales fue derivada a partir del análisis de la relación función-estructura de los materiales de las matrices extracelulares. En este sentido, las matrices artificiales deben actuar también como sistemas de liberación de factores de crecimiento, adhesión de péptidos y citoquinas que imitan estas señales biológicas naturales. Los nuevos materiales que imitan materiales extracelulares y celulares poseen un contenido rico de información, con un énfasis particular en la presentación de señales en una forma controlada en el espacio y tiempo. Por otro lado, las propiedades físicas de los materiales son probablemente tan importantes como sus propiedades químicas en términos de la respuesta biológica que provocan. La respuesta celular *in vitro* o *in vivo* puede ser drásticamente alterada dependiendo de las propiedades mecánicas así como también las dimensiones de los biomateriales. Además, las señales externas ambientales como la temperatura y los campos electromagnéticos se están usando para modular el desempeño de los biomateriales. Los biomateriales pueden también diseñarse para manipular poblaciones celulares específicas que residen en el receptor a una distancia significativa del lugar del implante. Esto se logra al orientar al material hacia células específicas o lugares anatómicos, o al controlar el tráfico de las poblaciones celulares destino (Huebsch, 2009; Williams, 2009; Langer, 2009).

De esta forma los materiales tradicionales utilizados en el campo biomédico tales como cerámicos, metales, polímeros sintéticos y biopolímeros, están siendo reemplazados en los muchos casos por materiales inteligentes, dado que imitan la naturaleza y trabajan con los mecanismos

de reparación propios de ésta. En base a estas consideraciones, D.F. Williams (Williams, 2009) propuso una definición de biomaterial que contempla las nuevas situaciones a las que se enfrenta la tecnología biomédica, denominando biomaterial a:

Un material que, como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de sistemas vivos, el curso de un procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria.

Esta nueva visión del concepto de biomaterial es radicalmente diferente a las propuestas anteriores, dado que muchas de las sustancias que tradicionalmente no eran consideradas como biomateriales (como por ejemplo los tejidos ingenierilmente diseñados, células, órganos y virus) deben ser tenidas en cuenta como tales, siempre y cuando sus funciones y prestaciones estén directamente controladas por las interacciones con los tejidos y los componentes tisulares.

Los avances en el diseño de biomateriales e ingeniería conducen a una nueva generación de materiales como candidatos para medicina regenerativa (Place, 2009). Las matrices artificiales para ingeniería de tejidos se transforman así en matrices inteligentes que no solo cumplen una mera función de sostén o soporte, sino que proveen a las células de señales biológicas biomiméticas.

1.2. Polímeros biorreabsorbibles sintéticos: poli(L-ácido láctico) y poli(éster uretano) segmentado

Algunos trabajos recientes identifican a los poliésteres alifáticos como los polímeros más interesantes entre los polímeros degradables debido a que poseen propiedades térmicas, mecánicas y químicas que los hacen compatibles con el cuerpo humano. Por este motivo el uso de los mismos en

aplicaciones biomédicas se ha incrementado en los últimos años. Los ésteres alifáticos son los más utilizados debido a que degradan mediante reacciones hidrolíticas o enzimáticas generando ácidos carboxílicos con grupos terminales hidroxilo que posteriormente se metabolizan en el organismo humano.

Los poliésteres forman un grupo importante de polímeros biodegradables; éstos pueden sintetizarse por policondensación de ácidos hidroxicarboxílicos o por polimerización por apertura de anillo de ésteres cíclicos (lactonas). La polimerización por apertura de anillo es el método preferido para producir poliésteres de alto peso molecular, baja polidispersidad y con mayor control del proceso, ya sea en masa, solución, emulsión o dispersión. Asimismo, mediante esta vía se pueden obtener copoliésteres bien definidos, incorporar grupos funcionales terminales específicos que estén disponibles para reacciones posteriores a la polimerización, introducir moléculas activas como vitaminas, hormonas, fármacos, o preparar macromonómeros, técnica que ha abierto el campo de la síntesis de copolímeros de injerto con bloques biodegradables.

Los poli(α -hidroxiácidos) tales como poli(ácido láctico) o polilactida (PLA) y poli(ácido glicólico) o poliglicolida (PGA), otros poliésteres como poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(3-hidroxi butirato) (PHB), polidioxanona (PDS) y poli(propilén fumarato) (PPF), los polianhídridos y poliortoésteres, (Figura 1.2.) son algunos ejemplos de polímeros biodegradables utilizados para aplicaciones biomédicas. Las propiedades de estos polímeros pueden mejorarse mediante copolimerización o mezclado (Middleton, 2000).

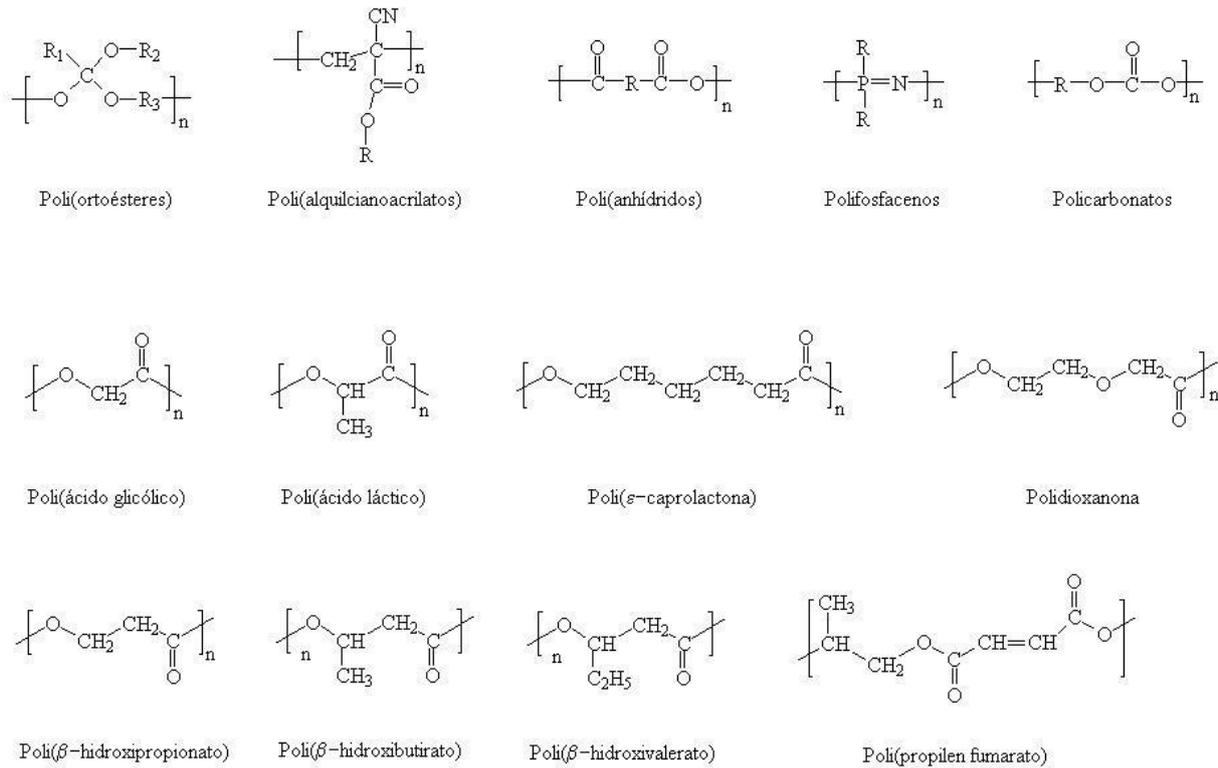


Figura 1.2. Estructura química de las unidades repetitivas de los polímeros biodegradables sintéticos más usuales.

Entre los numerosos poliésteres mencionados, el poli(L-ácido láctico) (PLLA) ha demostrado ser el tipo más atractivo y útil de polímero biorreabsorbible. El PLLA es conocido por su buena procesabilidad, biocompatibilidad y biorreabsorbibilidad. El PLLA es un polímero termoplástico aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) con alta resistencia y módulo elástico, que puede ser fácilmente procesado por las técnicas convencionales de procesamiento utilizadas para termoplásticos. Además, el PLLA ha demostrado ser un buen polímero para ser procesado por el método de electrohilado. El PLLA presenta una estructura semicristalina, tiene una estructura más ordenada y compacta (Figura 1.3) y por lo tanto, mejores propiedades mecánicas y mayor tiempo de servicio. Durante su degradación, el PLLA se hidroliza a ácido láctico, el cual es un producto normal de la contracción muscular en animales y humanos. Se puede lograr un amplio intervalo de propiedades mecánicas y físicas, y velocidades de degradación al copolimerizar el PLLA y variar su peso

molecular y su composición. Se han llevado a cabo un gran número de investigaciones a partir del PLLA y sus copolímeros en aplicaciones biomédicas para implantes biorreabsorbibles en la forma de varillas, placas, tornillos, fibras, esponjas, suturas, microesferas para sistemas de liberación de drogas, filmes para tratamiento de heridas e ingeniería de tejidos (Gupta, 2007; Gupta, 2007b; Savioli Lopesa, 2012).

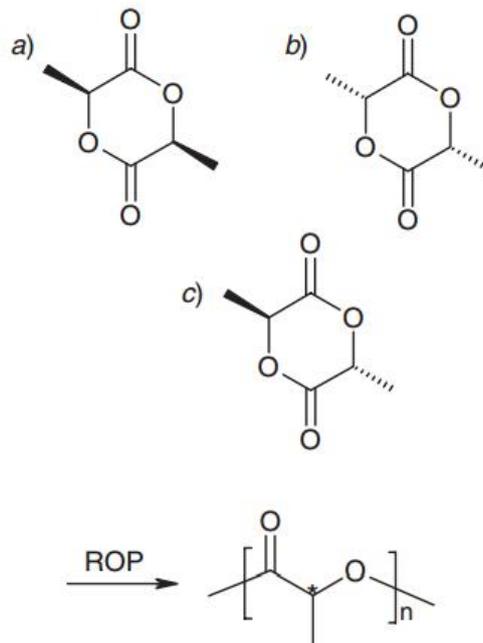


Figura 1.3. Estructura química de los diferentes estéreo-isómeros del monómero de ácido láctico y la unidad repetitiva resultante, el centro quiral está marcado con *. ROP = polimerización por apertura de anillo. a) L-ácido láctico, b) D,D-ácido láctico, y c) meso-ácido láctico (Stridsberg, 2002).

Los poliésteres sintéticos proveen la resistencia necesaria para la estabilidad estructural de los dispositivos biomédicos, sin embargo, son demasiado rígidos y con poca elasticidad. Los poliuretanos son materiales elastoméricos, con comportamiento tipo gomas, que pueden soportar la acción de esfuerzos y cargas, y recuperarse elásticamente con poca o sin histéresis. En los últimos años, se han desarrollado e investigado

poliuretanos segmentados (SPU) para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos.

En la síntesis de poliuretanos se emplean principalmente tres monómeros, un isocianato (di o polifuncional), aromático o alifático; un polioli (di o polifuncional) de cadena larga y flexible que a temperatura ambiente se encuentra por encima de su temperatura de transición vítrea; y un monómero de cadena corta, denominado extendedor de cadena si es difuncional (diol o diamina), o entrecruzante si su funcionalidad es mayor a 2. Dentro de los poliuretanos, los SPU son copolímeros en bloque, compuestos por bloques o segmentos blandos que forman dominios blandos (fase viscosa o gomosa), con temperatura de transición vítrea ($T_{g,s}$) por debajo de la temperatura ambiente, y bloques o segmentos duros que forman dominios duros (fase vítrea) con $T_{g,h}$ por encima de la temperatura ambiente. Los segmentos blandos están constituidos por la cadena del macrodiol, mientras que los segmentos duros están formados por una distribución de unidades [diisocianato – extendedor de cadena] $_n$ – diisocianato. Los dominios blandos pueden tener una morfología amorfa o semicristalina, dependiendo de la longitud de cadena, geometría y estructura química del macrodiol. Los dominios duros, de la misma manera, puede ser amorfos o semicristalinos. Los segmentos blandos (poliéteres, poliésteres, poli(éster-éter-éster), policarbonatos o polisiloxanos) proporcionan flexibilidad y son generalmente la fase continua, mientras que los segmentos duros (bloques con unidades uretano, urea, amida o anillos aromáticos) actúan como puntos de entrecruzamiento físico reversible por cristalización y/o asociación molecular. La morfología de los sistemas poliuretánicos es un factor clave en las propiedades finales de los materiales.

Los poliuretanos biorreabsorbibles permiten el desarrollo de matrices adecuadas para una gran variedad de aplicaciones en ingeniería de tejidos, entre las que se encuentran injertos vasculares de diámetro pequeño, piel artificial, prótesis de esófago y tráquea, canales para regeneración de nervios, vectores no virales para terapia génica, parches para reparación de

pericardio y miocardio y matrices porosas para el tratamiento de periodontitis. En cirugía ortopédica y traumatología se emplean para la preparación de sustitutos de hueso esponjoso, tejidos para reparación de cartílago articular, materiales inyectables para corrección de defectos óseos, cementos inyectables para el tratamiento de fracturas compresivas de vértebras con osteoporosis, regeneración de meniscos, y para el reemplazo de núcleos pulposos calcificados en discos intervertebrales en la forma de hidrogeles inyectables. La selección apropiada de los componentes de la formulación posibilita la preparación de poliuretanos biorreabsorbibles, con un amplio intervalo de propiedades mecánicas, composición, estabilidad química y propiedades superficiales. La biodegradación en componentes no tóxicos puede ser promovida con el uso de diisocianatos alifáticos. Se utilizan segmentos blandos de poliésteres biorreabsorbibles para brindar uniones hidrolíticamente lábiles que aumentan la velocidad de degradación de los SPU (Moore, 2005; Caracciolo, 2009; Adhikari, 2008). La figura 1.4. presenta la estructura química del segmento duro del poli (éster uretano) segmentado (SPEU) utilizado en esta tesis, siendo el segmento blando la PCL.

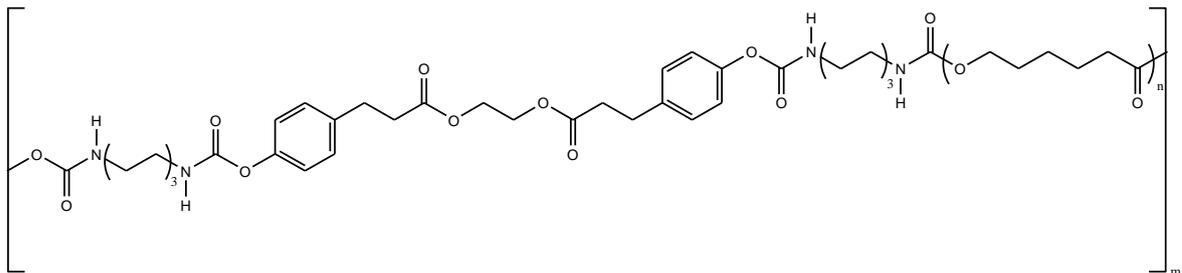


Figura 1.4. Estructura química de un SPEU (Caracciolo, 2008; Caracciolo, 2009).

1.3. Tejidos vasculares: estructura, afecciones y soluciones actuales

Los tejidos vasculares se dividen en arterias, capilares y venas. Debido al riesgo e impacto de las enfermedades vasculares en las arterias, el

mayor esfuerzo se ha centrado en el estudio y la búsqueda de estrategias para su reemplazo o regeneración. Las arterias presentan una estructura compleja (Figura 1.5.), y se componen de tres capas denominadas íntima, media y adventitia, cada una de las cuales presenta una composición y función distinta. Más aún, la composición varía según el tipo de arteria.

La íntima es la capa más interna y se compone principalmente de células endoteliales. Ésta controla la transferencia de moléculas hacia el interior de la pared, provee la no-trombogenicidad y está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis, la regulación del tono muscular y la regulación inmunogénica e inflamatoria.

La media, como su nombre lo indica es la capa del medio de la arteria, está compuesta mayormente por células de músculo liso en un arreglo circunferencial, alternadas con láminas de elastina y en menor medida fibras de colágeno. Las células de músculo liso se vuelven contráctiles en la madurez y son, por lo tanto, las responsables de regular el tamaño del vaso. La elastina posee una alta distensibilidad y le confiere a las arterias una capacidad de deformación elástica alta a bajas presiones.

La adventitia es la capa externa de la arteria y se compone de fibras de colágeno y fibroblastos. El colágeno, está dispuesto en orientación circunferencial como fibras onduladas que se estiran y actúan a altas presiones, protegiendo y reforzando el vaso (Bouten, 2011; Rhodin, 2014).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial. Cada año se pierden 17 millones de vidas por causa de estas enfermedades, lo que representa un 29% de la totalidad de las muertes globales. En particular, las enfermedades coronarias representan un 50% de las causas de muerte por enfermedades cardiovasculares (Seifu, 2013).

Hoy en día, el mayor esfuerzo está puesto en el estudio de las arterias musculares (que poseen un diámetro menor a 6 mm) y principalmente las arterias coronarias, dado que los tratamientos actuales presentan serios inconvenientes.

Las principales causas de las enfermedades coronarias son la trombosis y la aterosclerosis. La trombosis es el bloqueo de un vaso

sanguíneo debido a la formación de un coágulo o trombo sanguíneo. Las causas son lesiones en el endotelio, cambio en el flujo sanguíneo o factores hereditarios o enfermedades de la sangre. El bloqueo impide la irrigación sanguínea de la zona afectada. La acumulación de sustancias lipídicas en las paredes arteriales en forma de placas de ateroma produce el engrosamiento de las mismas, denominado aterosclerosis. En estado avanzado, la aterosclerosis resulta en el estrechamiento del lumen arterial, fenómeno conocido como estenosis. Las expresiones clínicas de la aterosclerosis son de naturaleza crónica, como en la angina de pecho estable causada por el esfuerzo o en la claudicación intermitente, secuela previsible y reproducible; otras veces, aparecen episodios clínicos agudos mucho más graves como un infarto de miocardio. El infarto de miocardio ocurre cuando disminuye bruscamente el flujo coronario después de una oclusión trombótica de una arteria coronaria, ya estrechada por aterosclerosis.

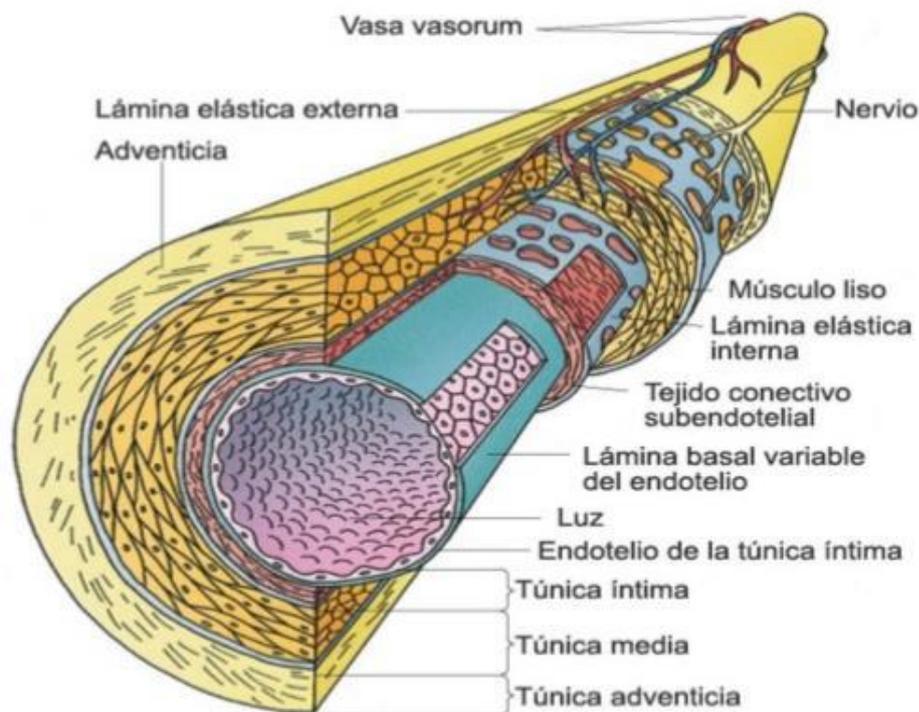


Figura 1.5. Esquema de la estructura en capas de las arterias.

El tratamiento de estas enfermedades se basa en la prevención, mientras que en los casos en que la oclusión o estenosis son severos se requiere de un tratamiento de trombólisis, y en los casos contraindicados, se requiere de intervenciones invasivas de revascularización como la angioplastia o cirugía de derivación arterial coronaria, también conocida como técnica de *bypass* coronario.

El tratamiento de trombólisis busca el restablecimiento inmediato de la permeabilidad de la arteria coronaria, mediante la administración intravenosa de preparados trombolíticos de activador tisular del plasminógeno (tPA), estreptocinasa y complejo anisoilado del activador del plasminógeno y la estreptocinasa (APSAC). Estos medicamentos facilitan la conversión del plasminógeno en plasmina, que posteriormente disuelve los trombos de fibrina.

La angioplastia consiste en la abertura de las arterias coronarias obstruidas. Tras introducir una guía flexible en una arteria coronaria y a través de la estenosis que se pretende dilatar, se hace avanzar un catéter balón miniatura sobre la guía hasta la estenosis, luego se infla el balón repetidas veces hasta que desaparece o disminuye la obstrucción. En las estenosis adecuadas que afectan arterias epicárdicas con un diámetro mayor o igual a 3 mm se puede colocar un conducto expansible de metal denominado *stent* dentro de la estenosis dilatada para que no ocurra ninguna estenosis residual o ésta sea mínima, y reducir al mismo tiempo la incidencia de reestenosis (Libby, 1998; Willerson, 1991).

La cirugía de *bypass*, consiste en desviar el flujo sanguíneo de la zona obstruida para irrigar el resto del tejido cardíaco. Para este procedimiento quirúrgico se emplean injertos a partir de venas o arterias autólogas, homólogas y heterólogas, e injertos sintéticos de similares dimensiones.

Cuando la estenosis ocurre en el tronco principal izquierdo o cuando la oclusión ocurre en múltiples vasos (más de tres) que irrigan áreas del miocardio, la cirugía está indicada y la angioplastia está contraindicada.

Los injertos autólogos siguen siendo hoy en día el *gold standard* al momento de efectuar un *bypass*. En particular la vena safena mayor y la

arteria torácica interna (también denominada arteria mamaria interna) son los injertos que han presentado mejores resultados en el tiempo. La vena safena mayor presenta una tasa de permeabilidad (grado de apertura) del 80-90% luego de un año de implantada, no obstante a largos tiempos sufre el desarrollo de aterosclerosis y el 50% de los injertos se cierran luego de 10 años de la operación. La arteria torácica interna presenta una tasa de permeabilidad de 90% a los 10 años después de la operación. Las causas de este mejor rendimiento no son completamente conocidas. Sin embargo, la vena safena sigue siendo el injerto más elegido por los cirujanos. En los casos que la vena safena y la arteria torácica interna no se encuentran disponibles para su utilización como injertos otros vasos sanguíneos, tales como la arteria radial, la arteria gastro-omental derecha, la arteria epigástrica inferior, la vena safena corta y venas de las extremidades superiores, son utilizados (Canver, 1995).

A pesar del buen desempeño de los injertos autólogos, el 15% de los pacientes con enfermedades coronarias necesitan injertos alternativos debido a la imposibilidad o no disponibilidad de utilizar los vasos mencionados.

Los injertos sintéticos aprobados para su uso en *bypass* de arteria coronaria son bioestables y presentan una alta rigidez. Las tubuladuras de poli(etilen tereftalato) (PET) patentadas como Dacron® (Figura 1.6. a) fueron introducidas en 1957 y se forman mediante el tejido de múltiples filamentos del poliéster. El Dacron® posee alta cristalinidad, alto módulo elástico y alta resistencia en tensión. Estos injertos se usan exitosamente en *bypass* de arteria aorta y en la revascularización de injertos de gran diámetro periféricos. Los injertos de poli(tetrafluoroetileno) expandido (ePTFE), conocidos por su nombre comercial Goretex® (Figura 1.6. b), también presentan una alta cristalinidad y poseen una alta rigidez, aunque menor que los injertos de Dacron®. El Goretex® se usa con excelentes resultados en injertos para las extremidades inferiores, de diámetros internos entre 7-9 mm. Ambos tipos de injertos, Dacron® y Goretex®, fallan en la revascularización de arterias de menor diámetro (< 6 mm),

principalmente debido a su alta rigidez y al desacuerdo de su distensibilidad (*compliance*) en la zona de anastomosis. Por este motivo, se desarrollaron injertos vasculares sintéticos a partir de elastómeros poliuretánicos.

Los poliuretanos tienen una naturaleza más distensible y elastomérica que el PET y el ePTFE, característica que los posiciona como excelentes candidatos para reducir los problemas asociados a la rigidez de los injertos y desacuerdo mecánico con los tejidos nativos (Kannan, 2005; Ravi, 2010).

En cuanto al desempeño de estos injertos sintéticos como injertos para *bypass* de arteria coronaria, el injerto de ePTFE posee una tasa de permeabilidad del 14% luego de 45 meses de la operación y el PET resulta en vasos abiertos luego de 17 meses de implantado, no habiendo resultados reportados a mayor tiempo de seguimiento. Si bien se han reportado algunos resultados preliminares con tubuladuras de poliuretano, no existen datos de los resultados a altos tiempos de implantación.

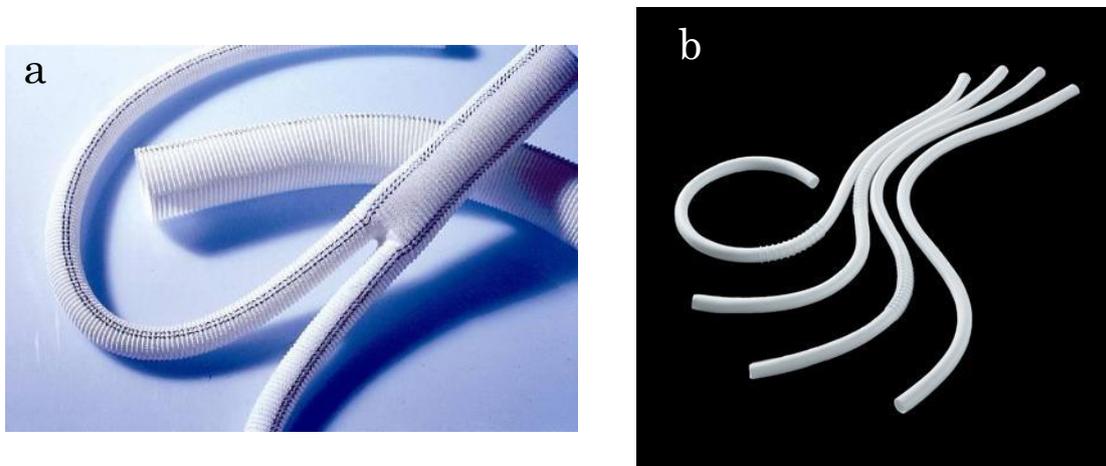


Figura 1.6. Fotografías de injertos vasculares sintéticos comerciales de a) Dacron® y b) Goretex®.

En los últimos 30 años poco ha cambiado en relación a los injertos sintéticos, y la obtención de un injerto vascular de pequeño diámetro (< 6 mm) con un comportamiento apropiado y permanente aún representa un gran desafío. El desarrollo de un conducto para operaciones de *bypass* coronario que pueda estar inmediatamente disponible (*off-the-shelf*), sin

tiempos prolongados de cultivos *in vitro*, con las propiedades mecánicas y biológicas necesarias es el centro de las investigaciones actuales en el campo de la ingeniería de tejidos vasculares.

1.4. Ingeniería de tejidos vasculares

Como se mencionó en la sección anterior, los injertos más comúnmente usados hoy en día son sintéticos, autólogos, provenientes de un donante o de origen animal. Sin embargo, ninguno de estos injertos ofrece potencial de regeneración, y más aún, todos están asociados con diferentes niveles de trombogenicidad, estenosis y susceptibilidad a infecciones. Además, las intervenciones quirúrgicas, tratan solamente la manifestación de la aterosclerosis, sin tratar las causas de la condición. Por lo tanto, los síntomas tienden a aparecer nuevamente y los pacientes con frecuencia requieren una nueva intervención (Kurobe, 2012; Seifu, 2013).

Luego de descartar a los injertos sintéticos estables, las estrategias para la creación de un material apropiado para los injertos vasculares se ha centrado en tres áreas de investigación: recubrimientos y modificación superficial de los materiales sintéticos existentes; empleo de matrices porosas biodegradables; y matrices constituidas por polímeros naturales.

La modificación superficial de los injertos sintéticos, como el Dacron® y el Goretex®, se ha centrado en la endotelización del lumen de los mismos. Esto ha presentado sus limitaciones, debido a dificultades en la fuente de las células, así como también, la adhesión y retención durante las condiciones de flujo pulsátil. Por otro lado, la regeneración *in situ* de un revestimiento endotelial funcional también ha presentado dificultades, debido a respuestas pro-trombóticas e inflamatorias a los materiales sintéticos. También, se han ligado proteínas en el interior del injerto y se ha liberado óxido nítrico para prevenir la formación de trombos y la deposición de plaquetas (Ravi, 2010; Kannan, 2005).

La cirugía vascular emergente ha evolucionado del “reemplazo” a la “regeneración” del tejido vascular, y por lo tanto las otras dos estrategias son las que están predominando en la actualidad.

El injerto vascular ideal debe cumplir los siguientes atributos: biocompatibilidad, no trombogenicidad, no toxicidad, *compliance* mecánica, resistencia a la hiperplasia neointimal, resistencia a la infección, facilidad para sutura, flexibilidad y elasticidad sin colapso por retorcimiento, facilidad de fabricación, características de manejo adecuadas para la implantación quirúrgica, disponibilidad en diversos tamaños y longitudes, capacidad para liberar localmente agentes terapéuticos, no inducción de malignidades, funciones biológicas y potencial de regeneración de tejidos. Con este panorama, la ingeniería de tejidos presenta la forma ideal para diseñar un injerto perfecto.

La relación estructura-función de los tejidos cardiovasculares nativos plantea un criterio de diseño fuerte para los substratos requeridos. Por lo tanto, a la hora de diseñar un injerto vascular hay que tener en cuenta su estructura y funciones a un nivel macroscópico y microscópico.

La ingeniería de tejidos vasculares plantea diferentes enfoques: los injertos obtenidos por láminas celulares auto-ensambladas (*cell-sheet tissue engineering*) y los injertos asistidos por matrices biomiméticas.

Las láminas de células auto-ensambladas surgen a partir del éxito observado en las láminas de células epiteliales en el tratamiento de pacientes con quemaduras severas. Este enfoque utiliza células humanas exclusivamente para fabricar vasos sanguíneos sin el uso de substratos externos al paciente. Se cultivan células de músculo liso y fibroblastos *in vitro*, luego se despegan de las placas de cultivo manteniendo la integridad y se enrollan sobre un mandril del diámetro deseado, enrollando primero células de músculo liso, fibroblastos, y finalmente se efectúa un recubrimiento con células endoteliales. Estos injertos vasculares presentan presiones de reventado superiores a los 2000 mmHg, resistencia a la sutura adecuada y un endotelio funcional. Incluso estudios *in vivo* demostraron que soportan las condiciones de flujo fisiológico (L'Heureux, 1998; Konig, 2009).

Estos resultados desafían la presunción de que las matrices soporte son realmente necesarias para la fabricación de injertos vasculares. Sin embargo, las láminas de células llevan un tiempo considerablemente elevado de fabricación. Dentro de este mismo enfoque se planteó el desarrollo de un injerto vascular a partir del crecimiento del tejido vascular en la cavidad peritoneal del mismo paciente. Este vaso, derivado de células inflamatorias, se asemeja a los vasos sanguíneos nativos. Posee un recubrimiento interior o mesotelium, formado por células parecidas a las endoteliales; una capa media de células miofibroblásticas; y una capa externa de tejido conectivo colagenoso (Song, 2010; Campbell, 1999). Sin embargo, este enfoque no es viable clínicamente debido al procedimiento invasivo del crecimiento del vaso dentro de la cavidad peritoneal del paciente.

Los injertos vasculares asistidos por matrices biomiméticas plantean una solución más rápida y no tan invasiva. En este enfoque la elección del biomaterial soporte es un paso crítico en el diseño exitoso de las tubuladuras. Como ya se mencionó es fundamental que el injerto responda tanto mecánica como biológicamente al ambiente hemodinámico al que va a estar sometido, y en este aspecto el material y la estructura de la matriz porosa cumplen un rol principal.

La primera alternativa explorada para la fabricación de las matrices soporte involucró el uso de materiales naturales (Weinberg, 1986). Sin embargo, estos injertos de geles de colágeno, presentaron propiedades mecánicas pobres y no resistieron su uso clínico sin un recubrimiento polimérico sintético de soporte. También se han utilizado materiales naturales como la elastina, la fibrina de seda, geles de fibrina, y polímeros a base de proteínas con unidades repetitivas de pentapéptidos similares a la elastina. No obstante, las propiedades mecánicas observadas en todos los injertos generados son inferiores a los injertos sintéticos (Ravi, 2010; Seifu, 2013).

Los materiales sintéticos biodegradables o biorreabsorbibles se utilizan como otra alternativa para la obtención de matrices soportes para

ingeniería de tejidos de injertos vasculares. Los polímeros elegidos son poliésteres como el PLLA, PGA, PCL y sus copolímeros, y SPU. Los polímeros sintéticos permiten obtener estructuras con propiedades mecánicas a medida, así como velocidad de degradación, porosidad y microestructura específicas. El primer vaso sanguíneo diseñado por ingeniería de tejidos se desarrolló a partir de tubuladuras de PGA cultivadas en un biorreactor con células bovinas (Niklason, 1999). En el 2001, Shinoka *et al.* fueron los primeros en utilizar un injerto de ingeniería de tejidos para tratar una enfermedad congénita en pacientes pediátricos (Kurobe, 2012).

Por otro lado, se exploró el uso de matrices decelularizadas provenientes de donantes o animales como soporte. Las matrices pueden ser criopreservadas, permitiendo tener un número de las mismas listas para su uso inmediato. Si bien presentan las ventajas de tener una fuente de matrices abundante, listas para usarse, éstas corren el riesgo de transmitir patógenos del animal donante al paciente. Por otro lado, las propiedades biomecánicas de la matriz son variables debido a la variabilidad de especies donantes, así como también las distintas edades o sexo de la misma, afectando el resultado clínico (Seifu, 2013; Bouten, 2011).

Todos estos enfoques han producido resultados interesantes y alentadores, y como puede apreciarse presentan algunas limitaciones y principalmente la necesidad de un tiempo de cultivo *in vitro* previo a la realización del implante. En ese sentido la ingeniería de tejidos *in vivo* permite que el crecimiento y la proliferación celular suceda una vez implantado el injerto. Hoy en día, el enfoque se dirige a cambiar la función del substrato de uno meramente pasivo o semi-bioactivo, brindando un soporte tridimensional para las células, hacia uno verdaderamente bioactivo, que interaccione y responda a los estímulos biológicos del cuerpo. Se plantea así, la incorporación de agentes bioactivos, mediante modificaciones superficiales del interior del injerto, que proporcionen un nicho celular similar al presente en los vasos sanguíneos naturales (Bouten, 2011).

A pesar de los avances obtenidos, al presente no existe en el mercado un injerto vascular de pequeño diámetro (< 6mm) que, una vez implantado, mantenga su tasa de permeabilidad, ni se produzca la formación de trombosis o hiperplasia intimal (Conte, 1998).

1.5. Estrategias para la obtención de estructuras tridimensionales porosas

Desde un punto de vista físico las matrices o andamiajes pueden clasificarse en tres grupos: sólidos porosos celulares, textiles y sistemas inyectables. Según la terminología empleada por la ASTM (ASTM, 1999) los sólidos porosos se clasifican también en tres grupos: interconectados (poros abiertos), no interconectados (poros cerrados) o una combinación de ambos.

El número de publicaciones científicas relacionadas con matrices para aplicaciones biomédicas se incrementó notablemente en los últimos años, hecho que revela un alto y sostenido interés en el diseño y preparación de matrices porosas (Hutmacher, 2005). Teniendo en cuenta los requisitos indispensables que debe reunir una matriz extracelular artificial, la tecnología de procesamiento para su producción debe poseer un control importante de las propiedades macro y microestructurales. El comportamiento viscoso de los polímeros por encima de su temperatura de transición vítrea o temperatura de fusión y su solubilidad en diferentes solventes orgánicos, determina la aplicación de una amplia variedad de técnicas para preparar matrices poliméricas porosas a partir de polímeros sintéticos y naturales, en algunos casos se realizan compuestos con materiales cerámicos (Karp, 2003; Ma, 2005; Thomson, 2000). No existe una metodología única para crear matrices porosas, la elección de la técnica más apropiada resulta entonces crítica y depende de cada material polimérico y la aplicación específica (Abraham, 2007).

A continuación se listan algunas de las técnicas disponibles (Figura 1.7.) para la preparación de matrices tridimensionales porosas acelulares

usando polímeros naturales o sintéticos, materiales cerámicos o nanocompuestos:

1. Técnicas tradicionales

a. Procesamiento de fibras

- i. Mallas de fibras no tejidas, fibras unidas

b. Procesamiento de soluciones

- i. Evaporación de solvente y disolución de partículas
- ii. Extracción de hidrocarburos porógenos
- iii. Electrohilado (*electrospinning*)
- iv. Autoensamblado molecular

c. Separación de fases

- i. Separación de fases inducida térmicamente (*TIPS*)
- ii. Separación sólido-líquido: liofilización, técnicas combinadas con disolución de partículas
- iii. Inversión de fases y remoción de partículas
- iv. Separación de fases inducida por polimerización

d. Otras técnicas

- i. Moldeo en fundido
- ii. Agregación de micropartículas
- iii. Espumado de compuesto polímero-cerámico
- iv. Espumado por gas a alta presión
- v. Formación de gas
- vi. Mezclado/espumado asistido por CO₂ supercrítico

2. Tecnologías de manufactura aditiva basadas en CAD/CAM

- a. Fabricación asistida por calor: sinterizado electivo por láser (*SLS*)
- b. Moldeo por deposición de fundidos (*FDM*)
- c. Impresión tridimensional (*3D Plotting*)
- d. Laminación (*LOM*)
- e. Fabricación asistida por radiación: estereolitografía (*SLA*)
- f. Fabricación asistida por adhesivo: impresión tridimensional (*3DP*), microjeringa asistida por presión (*PAM*)
- g. Fabricación por moldeo indirecto

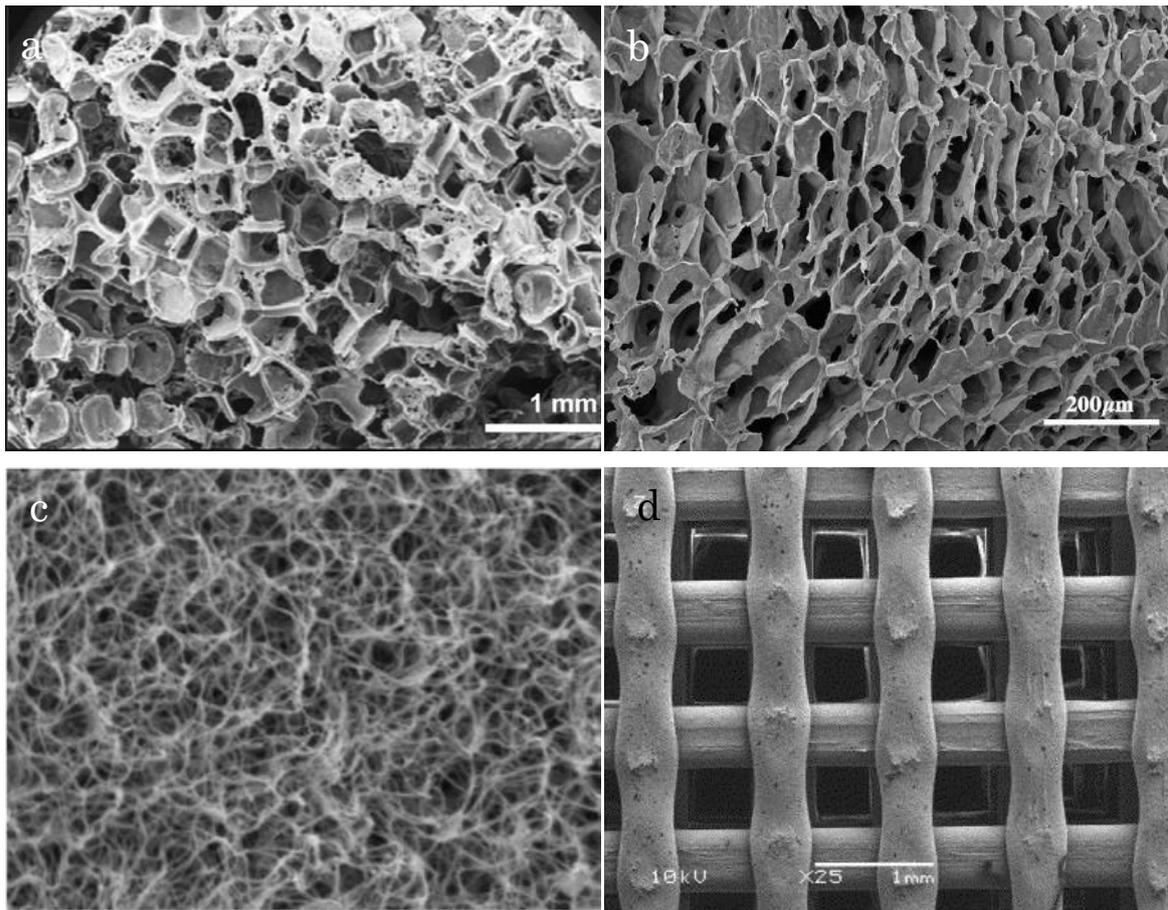


Figura 1.7. Ejemplos de matrices porosas para aplicaciones en ingeniería de tejidos obtenidas por distintas técnicas, a) disolución de partículas (Chatterjee, 2012), b) separación de fases sólido-líquido, c) autoensamblado (Achilli, 2010) y d) manufactura aditiva (Yeong, 2004).

1.6. Procesos electrohidrodinámicos

1.6.1. Fundamentos de electrohilado de soluciones poliméricas

Desde el siglo XVIII los procesos electrohidrodinámicos han llamado la atención de los científicos quienes exploraron el comportamiento de fluidos con la aplicación de cargas eléctricas. (Tucker, 2012). En 1600, el primer registro de atracción electrostática de un líquido fue observado por W. Gilbert. En 1745, G.M. Bose creó un spray en aerosol al aplicar una alta tensión a un líquido en la punta de un capilar de vidrio. Lord J.W.S. Rayleigh calculó la máxima carga que una gota puede soportar antes de que

las fuerzas eléctricas superen la tensión superficial de la gota. C.F. Schönbein produjo celulosa altamente nitrada en 1846. En 1887 C.V. Boys describió el proceso en un trabajo sobre manufactura de nanofibras. J.F. Cooley completó la primera patente de electrohilado en 1900. En 1914 J. Zeleny publicó un trabajo sobre el comportamiento de gotas de fluido al final de capilares metálicos. Su esfuerzo comenzó con los intentos de modelar matemáticamente el comportamiento de fluidos bajo fuerzas electroestáticas. Entre 1931 y 1944, A. Formhals llevó a cabo al menos 22 patentes sobre electrohilado. En 1938, N.D. Rozenblum y I.V. Petryanov-Sokolov generaron fibras electrohiladas, las cuales desarrollaron como filtros. Entre 1964 y 1969 Sir G.I. Taylor produjo los comienzos de la comprensión teórica del electrohilado con el modelado matemático de la forma del cono (Taylor) formado por una gota de fluido bajo el efecto de un campo eléctrico. Taylor analizó las condiciones a las que es sometida una gota deformada por un campo eléctrico, y mostró que una interface cónica es estable si el cono tiene un semi-ángulo de $49,3^\circ$. En los tempranos 1990s varios grupos de investigación (notablemente el grupo de D.H. Reneker quien popularizó el término de *electrospinning*) produjeron nanofibras electrohiladas. Desde 1995, el número de publicaciones acerca de la técnica de electrohilado ha crecido exponencialmente cada año (Doshi, 1995).

Los procesos electrodinámicos involucran las técnicas de electropulverizado (*electrospraying*) y electrohilado (*electrospinning*). El electropulverizado consiste en la atomización de un líquido (típicamente una solución polimérica diluida) mediante el empleo de un campo eléctrico de alta tensión. El campo eléctrico produce fuerzas eléctricas que estiran el menisco de la gota pendiente de un capilar, formando entonces un microchorro que luego es atomizado en gotas finas. Estas gotas pueden ser de tamaño submicrométrico, con una distribución de tamaños angosta. La técnica de electropulverizado se usa en la producción de micro/nanopartículas, deposición de filmes finos, y para la formación de capas funcionales. Cuando la viscosidad y la concentración de la solución permiten alcanzar una determinada concentración de enmarañamiento de

cadena crítica, el microchorro sufre otro tipo de inestabilidades y se forma una fibra continua de tamaño submicrométrico, proceso conocido como electrohilado.

La tecnología de electrohilado constituye uno de los métodos de procesamiento de vanguardia que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. La técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. En los últimos años, se han electrohilado numerosos tipos de materiales que incluyen prácticamente todos los polímeros sintéticos y naturales que sean solubles o puedan fundirse, y nanocompuestos, para obtener fibras continuas de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones que generan una matriz hilada no tejida altamente porosa (Greiner, 2007). Las fibras resultantes no requieren de una etapa extensa de purificación como, por ejemplo, los whiskers submicrométricos, las nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono.

Aunque la técnica de electrohilado constituye una vía versátil para la producción de nanofibras, el proceso es sumamente complejo y depende de numerosos parámetros. El diseño experimental básico para electrohilado de soluciones consta de cuatro componentes (Figura 1.8.): un reservorio de solución o material fundido, una bomba de infusión que permite suministrar un flujo constante y controlado de solución, una fuente de alta tensión y un sistema colector sobre el que se deposita el material electrohilado. Al aplicar una tensión de 5 - 30 kV, la solución polimérica se electrifica fuertemente. Se generan cargas inducidas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de solución polimérica que pende de una boquilla. La gota experimenta un conjunto de fuerzas: fuerza de repulsión coulombica entre las cargas presentes, fuerza electroestática producto del campo eléctrico externo generado al aplicar la tensión, fuerza gravitatoria, fuerzas viscoelásticas que dependen del polímero y solvente, y la tensión superficial que se opone al estiramiento y afinamiento de la gota. Bajo la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona en forma cónica, fenómeno conocido como cono de

Taylor. En estas condiciones el balance de fuerzas llega a un equilibrio. Cuando las fuerzas electroestáticas repulsivas superan la tensión superficial del polímero, se produce una situación inestable que provoca la expulsión de un microchorro líquido cargado desde la boquilla del capilar. Este microchorro electrizado sufre estiramiento y movimientos tipo latigazo (*whipping*), dando lugar a la formación de hilos largos y delgados. A medida que el chorro líquido se deforma continuamente y se evapora el solvente (o solidifica el fundido), las cargas superficiales aumentan conduciendo a una disminución drástica del diámetro de las fibras. Los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permiten dar continuidad al microchorro, formando fibras que se depositan en el sistema colector que se encuentra conectado a tierra (Andrady, 2008; Ramakrishna, 2006).

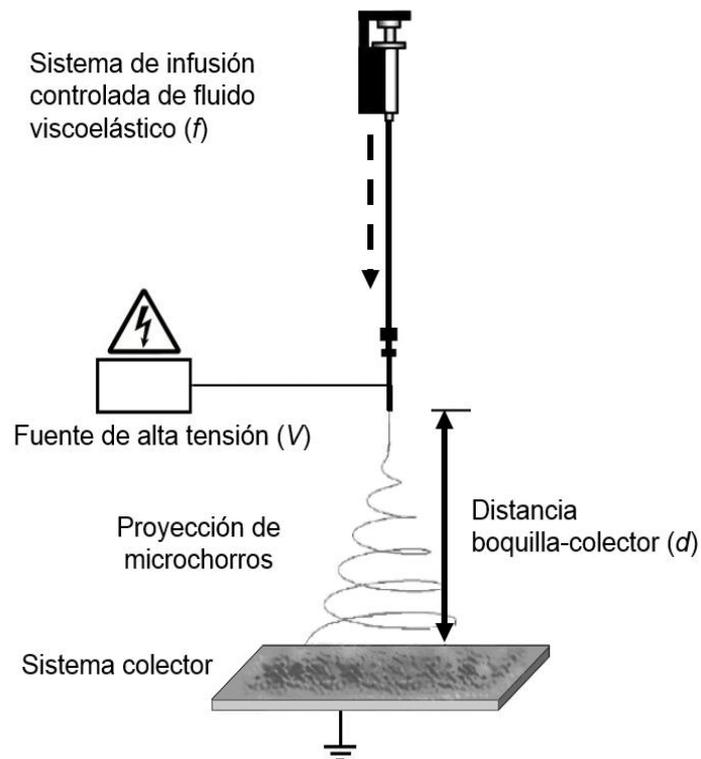


Figura 1.8. Montaje experimental básico para electrohilado de soluciones.

Por lo tanto las propiedades intrínsecas de la solución y los parámetros que afectan el procesamiento tienen un efecto directo en las fuerzas que dominan al proceso de electrohilado y la obtención de fibras con distinta morfología, estructura y tamaño.

1.6.2. Propiedades intrínsecas de la solución

Los parámetros de la solución influyen notablemente en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. Se describen a continuación algunos de los parámetros más importantes a considerar (Andrady, 2008; Ramakrishna, 2005; Robb, 2011).

Concentración: Se requiere de una concentración crítica en el régimen semidiluido para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el microchorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas (Figura 1.9.a). Un incremento de la concentración puede formar una morfología de fibras no uniformes (estructura tipo rosario). La concentración crítica para la cual se obtienen fibras uniformes varía con cada sistema analizado, y depende del peso molecular del polímero (a mayor peso molecular del mismo polímero, menor concentración para igual sistema de solventes), y de la viscosidad de la solución entre otros. Por otro lado, una vez alcanzada la concentración crítica para la obtención de nanofibras (Figura 1.9.b), el incremento de la misma produce un aumento en el diámetro medio de las fibras.

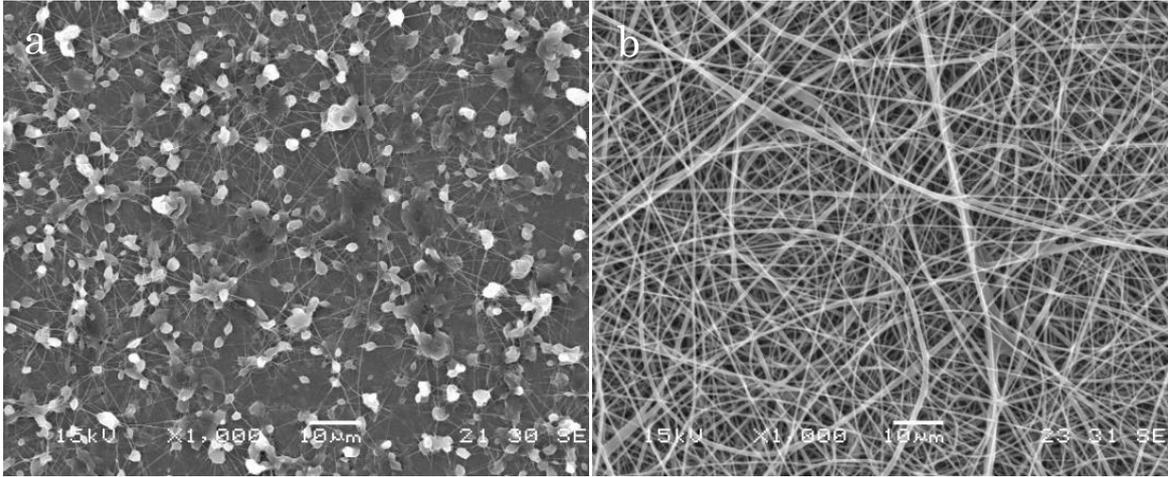


Figura 1.9. Micrografía de SEM de la estructura poliuretánica electrohilada de una solución en DMF/THF 50/50 a) 6% m/v y b) 12,5% m/v, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

Viscosidad: La viscosidad de la solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el solvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución. La viscosidad actúa contrarrestando las fuerzas de estiramiento producidas por la repulsión electrostática del microchorro cargado. Aumentar la viscosidad ayuda a obtener un microchorro estable y por lo tanto fibras con diámetro uniforme (sin presencia de gotas). La viscosidad de la solución se puede aumentar incrementando el peso molecular del polímero, la concentración de la solución polimérica, o incluso también con el agregado de polielectrolitos en pequeñas cantidades que permiten incrementar la viscosidad sin modificar la concentración. Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen fibras por electrohilado.

Solventes: Los solventes utilizados influyen y determinan varios aspectos del proceso de electrohilado. En primer lugar afectan la conformación de las cadenas poliméricas en solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del microchorro. Tanto el momento dipolar como la conductividad de la solución determinan la obtención o no de fibras electrohiladas, así como también el tamaño de las mismas. A mayor polaridad del solvente se

obtienen fibras de menor diámetro. La velocidad de solidificación del microchorro también está determinada por el solvente o mezclas de solventes utilizados. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente mayor será la velocidad de solidificación del microchorro. No obstante, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la boquilla. Por otra parte cuando la temperatura de ebullición es muy elevada, las fibras alcanzan el colector con una cantidad considerable de solvente que produce un film por disolución. El empleo de mezclas de solventes de bajo y alto punto de ebullición permite balancear esta situación.

Conductividad: La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado, dado que influye en la repulsión electroestática de las cargas superficiales presentes en la solución. La conductividad puede incrementarse por agregado de partículas conductoras o iones a la solución o seleccionando un solvente con mayor polaridad. El aumento de la conductividad de la solución también tiene un efecto en la disminución del diámetro medio de fibras. En algunos casos, tener una conductividad muy elevada produce una solución muy inestable que no logra la formación de fibras, esto ocurre con algunos polímeros naturales como el quitosano.

Tensión superficial: La tensión superficial de la solución es la fuerza principal a vencer para lograr el estiramiento del microchorro y la producción de nanofibras. Cuanto mayor es la tensión superficial, mayor cantidad de cargas superficiales y tensión aplicada se requerirá en el proceso. Dado que el solvente determina la tensión superficial de la solución, sería ideal emplear un solvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, el aumentar la concentración polimérica de la solución disminuye la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es con el agregado de surfactantes a la solución.

Constante dieléctrica: La constante dieléctrica de una solución es una medida de la capacidad para mantener cargas eléctricas en la solución. Cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución, con más facilidad se obtendrán fibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una solución se puede variar reemplazando el solvente o una fracción del mismo por uno con mayor o menor constante dieléctrica.

Factores ambientales: Por último, si bien en la mayoría de los casos se realiza el proceso de electrohilado en atmósfera de aire, también puede realizarse en presencia de nitrógeno u otros gases que modifican el proceso de secado del microchorro y la pérdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente. Otras condiciones ambientales que afectan el secado del microchorro son la temperatura y humedad ambiente. En particular, la elevada humedad ambiente genera nanofibras con poros superficiales. Esto se debe a que gotas de agua se depositan sobre la superficie del microchorro, debido al enfriamiento del mismo por la evaporación del solvente. Los poros se producen cuando el solvente y el agua se evaporan.

1.6.3. Parámetros del proceso de electrohilado

Los parámetros del proceso de electrohilado también poseen una notable influencia en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. A continuación se describen resumidamente los aspectos más importantes a tener en cuenta (Andrady, 2008; Ramakrishna, 2005; Robb, 2011).

Tipo de colector: El colector conductor plano es el más usado para producir una matriz nanofibrosa con orientación aleatoria (Figura 1.10.a). Existe una variedad de colectores para favorecer la obtención de matrices con una orientación determinada o para definir estructuras macroscópicas de la matriz. Uno de los colectores más populares es el colector rotatorio, ya sea

en la forma de cilindro o como disco (Figura 1.10.b). La velocidad de rotación es el factor dominante en el grado de alineación de las fibras. Si bien el colector de disco produce una mejor alineación, el cilindro de diámetro grande genera una matriz de mayor tamaño. Para mejorar la alineación, se han desarrollado cilindros con barras paralelas con separación de 2-3 cm, combinando el efecto de la rotación con la modificación del campo eléctrico. Otro tipo de colectores rotatorios son los cilindros de pequeño diámetro (< 6 mm), estos son de gran interés ya que permiten desarrollar estructuras 3D ideales para ingeniería de injertos vasculares. Este tipo de colector no presenta un efecto significativo en la morfología o el tamaño de fibra obtenido. Los colectores de placas paralelas (Figura 1.10.c) también pueden producir matrices con fibras alineadas. Si bien estos colectores logran alinear las nanofibras, algunos con gran efectividad, el tamaño de la matriz obtenida es reducido. El colector de punta produce matrices porosas de gran superficie con nanofibras alineadas, y se presenta como una alternativa a los colectores existentes. En este caso las fibras son eyectadas una a la vez y se alinean por repulsión electrostática entre la fibra ya depositada y la nueva (Figura 1.10.d).

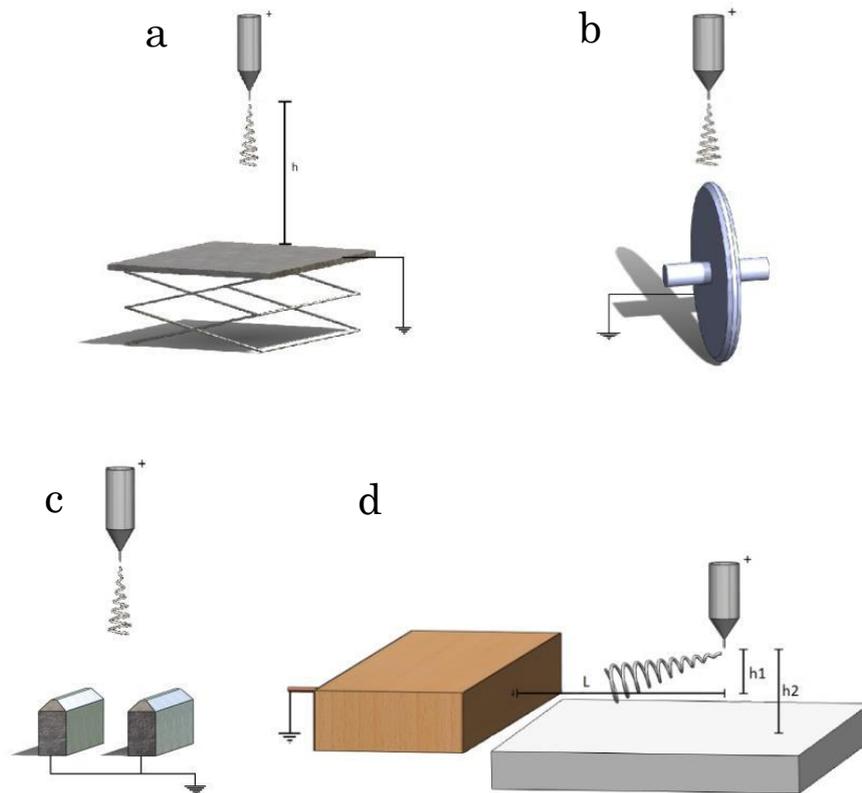


Figura 1.10. Algunos tipos de colectores utilizados en el proceso de electrohilado: a) colector plano, b) colector rotatorio de disco, c) placas paralelas, y d) colector de punta.

Material del colector: El material del colector influye en la estructura de la matriz obtenida. Por lo general, se utilizan colectores conductores conectados a tierra, ya que de esta manera el exceso de carga presente en las nanofibras depositadas es eliminado permitiendo un empaquetamiento compacto de las mismas. No obstante, en algunas aplicaciones se han utilizado colectores no conductores y se han obtenido empaquetamientos menos densos de fibras. Incluso, altos tiempos de deposición o una alta velocidad de infusión pueden producir empaquetamientos poco densos de fibras. En estos casos, donde una capa considerable de fibras no conductoras cubre el colector, la eliminación de cargas se dificulta obteniendo un efecto similar al de tener un colector no conductor. La deposición de nanofibras en agua antes de la colección por un colector conectado a tierra produce un

efecto significativo en la morfología de las fibras obtenidas y también aumenta la densidad de empaquetamiento.

Tensión aplicada: La tensión aplicada a la solución polimérica, carga superficialmente la misma, generando las fuerzas electroestáticas necesarias para vencer la tensión superficial. El efecto que tiene este parámetro en las nanofibras obtenidas depende fuertemente del sistema estudiado y de las otras variables en juego, como la concentración o la distancia boquilla-colector. Se ha demostrado que al aumentar la tensión aplicada se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del microchorro, resultando en fibras de menor diámetro. Sin embargo, una tensión alta aplicada también produce la evaporación más rápida del solvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro del microchorro, obteniéndose en algunos casos fibras de mayor tamaño del esperado. En algunos casos no se observa ninguna tendencia en el diámetro al variar la tensión aplicada.

Velocidad de infusión: Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es dosificada y la velocidad de remoción de la misma por efecto del campo eléctrico aplicado. Por lo general, la velocidad de infusión es controlada mediante una bomba que infunde la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. Si bien el mayor efecto de este parámetro es la obtención o no de un microchorro continuo, el aumento de la velocidad de infusión aumenta el diámetro medio de fibras, aunque se debe tener en cuenta que si la cantidad de solvente en el colector es apreciable se perderá la estructura fibrosa por disolución de las fibras.

Boquilla capilar: El diámetro interno de la boquilla influye en el diámetro de las nanofibras, y en la velocidad de evaporación del solvente en la boquilla. Al disminuir el diámetro interno de la boquilla aumenta la tensión superficial de la solución, por lo tanto a igual tensión aplicada se necesita de

una mayor fuerza coulombica para vencerla. Consecuentemente, la aceleración del microchorro disminuye y posee mayor tiempo de estiramiento y elongación antes de ser depositado en el colector, generando fibras de menor diámetro. Los sistemas de producción industrial emplean un sistema de dosificación sin boquillas evitando la interferencia eléctrica que se genera cuando se utilizan simultáneamente múltiples boquillas. Las boquillas coaxiales permiten obtener nanofibras con un núcleo interno y un recubrimiento exterior o nanofibras huecas.

Distancia boquilla-colector: Este parámetro influye directamente en el tiempo de vuelo del microchorro y en la fuerza del campo eléctrico aplicado. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de fibras obtenidas y en su morfología. Si la distancia es alta, hay un mayor tiempo para que el microchorro se elongue y estire, lo que produce matrices con tamaño medio de fibra menor. No obstante, el aumentar la distancia se debilita la magnitud del campo eléctrico, resultando en menor estiramiento del microchorro y un mayor tamaño medio de fibra. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del microchorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye la evaporación del solvente es pobre.

La figura 1.11. resume el efecto de algunos de los parámetros más influyentes del proceso de electrohilado.

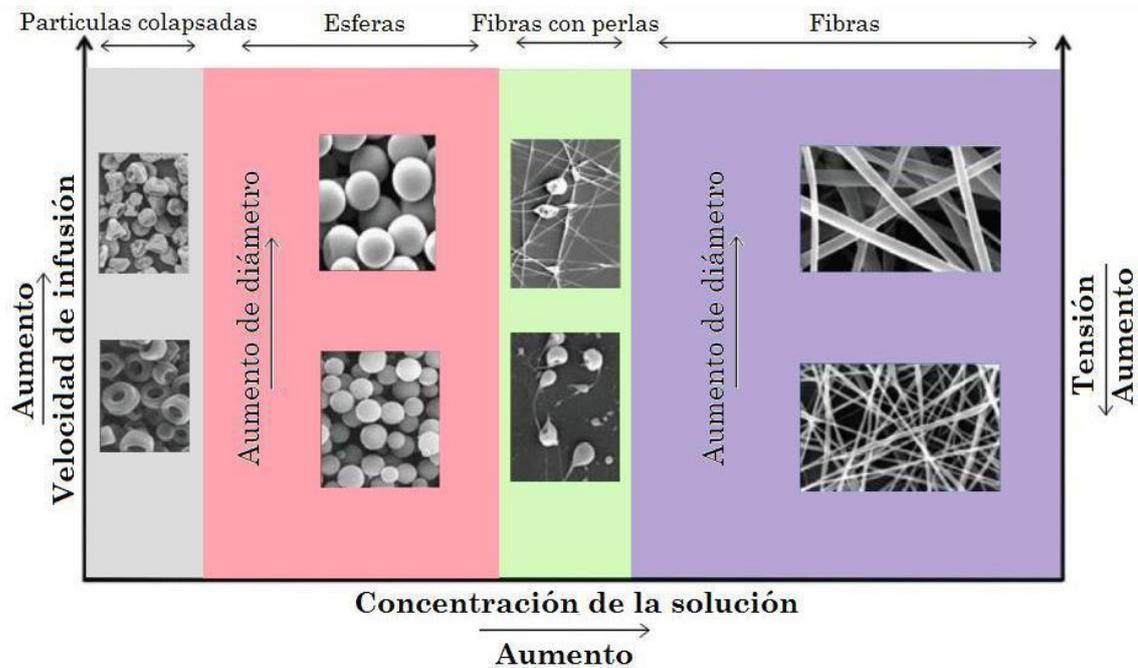


Figura 1.11. Efecto de velocidad de infusión, concentración y tensión aplicada en la morfología resultante de procesos electrohidrodinámicos (adaptada de Zamani, 2013).

1.6.4. Morfología de nanofibras

Las fibras pueden presentar una variedad de secciones transversales: fibras circulares, ramificadas, planas, divididas y con perlas colapsadas. Las fibras circulares constituyen la morfología más usual (Figura 1.9. b).

Las fibras planas pueden generarse por el colapso de fibras huecas durante la evaporación del solvente. Una fibra hueca con morfología de rosario puede también colapsar y formar una estructura de fibras con perlas colapsadas. La evaporación del solvente y la elongación del flujo del microchorro cambian la forma y la carga por unidad de área presente en el microchorro. El balance de la fuerza eléctrica y la tensión superficial cambia rápidamente, de modo que la forma del microchorro se puede volver inestable. Este microchorro inestable reduce su carga local por unidad de área superficial al despedir un microchorro menor desde la superficie del microchorro primario. Esta inestabilidad conlleva a la formación de fibras ramificadas. Las fibras divididas se forman al dividirse el microchorro

primario en dos microchorros menores a partir del microchorro primario (Hsu, 2003).

El empleo de dos o más boquillas concéntricas permite la obtención de nanofibras con estructura de cáscara-núcleo. Esta técnica también es útil para electrohilar soluciones que no son óptimas para el proceso de electrohilado, utilizando la solución difícilmente electrohilable en el núcleo central y una solución fácil de procesar en la cáscara que puede ser removida posteriormente de manera selectiva. De igual modo se obtienen fibras huecas al eliminar selectivamente el componente del núcleo (Figura 1.12.). También se han producido fibras cerámicas huecas, al realizar un tratamiento de sinterizado posterior a la extracción del núcleo. Otra ventaja de esta técnica es la obtención de fibras con doble funcionalidad, utilizando un material con integridad estructural en la cáscara y un fármaco, agente bioactivo o biológico en el interior, de alto interés en aplicaciones terapéuticas (Greiner, 2008). En particular, dado que las cargas eléctricas se encuentran en la superficie del microchorro, los agentes dispersos en la solución del núcleo no están sometidos a estas interacciones pero si al proceso de estiramiento y elongación. Es importante mencionar que durante la infusión las dos soluciones no están en contacto, solo toman contacto en la punta de la boquilla. De este modo la solución destinada al núcleo de la nanofibra se infunde en el centro del dispositivo y la solución de la cáscara en la cavidad anular entre dos tubos concéntricos.

Las nanofibras con estructura de cáscara-núcleo o tubos huecos también se obtienen utilizando las nanofibras electrohiladas como plantillas (*tubes by fiber templates, TUFT*) y depositando sobre ellas un recubrimiento polimérico, metálico o cerámico mediante deposición por fase vapor (*vapor phase deposition*) o recubrimiento por inmersión (*dip coating*) (Greiner, 2008). Empleando la técnica de deposición por fase vapor se obtuvieron recubrimientos delgados uniformes de 50 nm Esta metodología permite la obtención de nanofibras con multicapas de distintos materiales con morfología específica. Esto es de particular utilidad para la liberación controlada de agentes bioactivos. Los agentes bioactivos se suspenden en la

solución electrohilada y luego se realiza un recubrimiento sobre las nanofibras obtenidas por esta técnica, en donde se puede seleccionar el o los materiales del mismo para la liberación del fármaco en un tiempo o ambiente determinado. Con los mismos efectos se ha utilizado la técnica de recubrimiento por inmersión, para obtener nanofibras con estructura de cáscara-núcleo. Sin embargo, la solución puede no cubrir uniformemente toda la superficie. También se obtuvieron nanofibras huecas al remover el polímero usado como plantilla luego de la deposición del material de la cáscara y tubuladuras con rugosidad interna al usar plantillas de nanofibras con porosidad superficial.

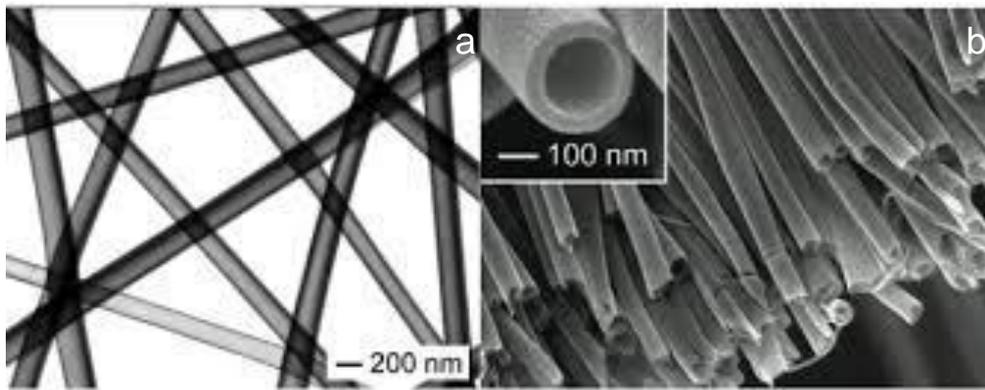


Figura 1.12. a) Micrografía de transmisión y b) de barrido de fibras huecas obtenidas por la técnica de electrohilado coaxial (Li, 2010).

El área superficial de matrices electrohiladas se puede aumentar más aún al introducir porosidad superficial en las fibras. Esta morfología resulta atractiva para aplicaciones en sensores, catalizadores o liberación de agentes bioactivos. Entre las técnicas disponibles se encuentra la remoción de un componente en fibras de dos componentes. Ésta consiste en disolver dos polímeros termodinámicamente inmiscibles en un mismo solvente. Se procesa la solución mediante electrohilado y se produce una separación de fases de los dos componentes *in situ*. Luego de la extracción de uno de los polímeros con un solvente que solo disuelve uno de los componentes, se obtienen nanofibras con porosidad superficial. Otra técnica se basa en la

separación de fases durante el proceso de electrohilado de una solución de un solo polímero con un solvente volátil. Bajo ciertas condiciones de procesamiento se produce la separación de fases inducida termodinámicamente en la superficie del microchorro. Las zonas en donde el solvente es pobre solidifican en fibras, mientras que las zonas donde hay mayor contenido de solvente forman poros superficiales. Esta técnica puede ser promovida al enfriar el colector o el microchorro y obtener el mismo efecto para solventes no tan volátiles (Andrady, 2008).

El electrohilado de campo cercano (*near field electrospinning*) (Sun, 2006), permite obtener fibras cortas en un colector en movimiento. En esta técnica una gota de solución pende de una punta de microscopio de fuerza atómica y con la aplicación de un campo eléctrico es dirigida a un electrodo opuesto situado a una distancia menor a los micrones. Otro enfoque, llamado electrohilado de alta precisión (*high precision deposition electrospinning*) toma el sistema de boquilla-colector estándar y reduce la distancia entre los electrodos a un intervalo de unos pocos micrones hasta el milímetro. La disminución de la distancia en esa magnitud disminuye el área de deposición de las fibras, lo que produciría problemas con la evaporación del solvente y/o supresión de inestabilidades y consecuentemente del afinamiento de las fibras. Sorprendentemente, se obtienen nanofibras depositadas selectivamente, de tamaño, orientación y geometría controlados. Esta tecnología permite aplicaciones del proceso de electrohilado en el área de sensores, microfluídica y modificación superficial de implantes.

1.7. Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta tesis es explorar la potencialidad del proceso de electrohilado (*electrospinning*) como nanotecnología de vanguardia para la obtención de matrices poliméricas nanoestructuradas de aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos biológicos, desarrollando, caracterizando y evaluando el comportamiento de matrices poliméricas con

características biomiméticas para aplicaciones en ingeniería de tejidos vasculares.

En el marco del objetivo general se detallan a continuación los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar los parámetros del proceso de electrohilado para preparación de estructuras nanofibrasas poliméricas con estructura y morfología controlada.
- Estudiar la relación estructura - propiedades de matrices nanofibrasas electrohiladas con distinta composición y estructura en multicapa, mediante caracterización térmica, físico-química y propiedades de superficie.
- Estudiar el comportamiento degradativo hidrolítico de matrices nanofibrasas electrohiladas con distinta composición mediante un conjunto de técnicas fisicoquímicas, de análisis térmico y de superficie.
- Investigar las características mecánicas de injertos vasculares nanofibrasos de diámetro pequeño en función de la composición y estructura mediante ensayos de tracción uniaxial, ensayos de sutura, ensayos de presión de reventado, y ensayos de *compliance* dinámica.
- Predecir el desempeño de injertos vasculares sometidos a presión interna frente a cambios en las dimensiones del injerto vascular (diámetro, espesor), en las propiedades (módulo de Young) y en la cantidad de las capas presentes, mediante modelado mecánico.
- Estudiar el efecto de diferentes estímulos (químicos, topográficos, mecánicos) en la proliferación celular de células madre mesenquimales sobre matrices porosas electrohiladas.
- Estudiar la citotoxicidad de las matrices electrohiladas *in vitro* mediante ensayos MTT de proliferación de células madre mesenquimales.

Este trabajo de tesis se basa en las siguientes hipótesis: a) es posible obtener injertos vasculares sintéticos biorreabsorbibles con morfología

nanofibras y características biomiméticas a través del procesamiento mediante electrohilado y una adecuada composición y espesor de las capas nanofibras; b) la utilización de dos polímeros sintéticos biorreabsorbibles y biocompatibles que se comportan mecánicamente de manera similar a los componentes de la matriz extracelular nativa de las arterias (colágeno y elastina) permite el logro de una respuesta mecánica biomimética; c) el conjunto de características del injerto diseñado conduce a una respuesta presión-diámetro tipo “J” dentro del intervalo fisiológico extendido bajo regímenes de flujo pulsátil.

1.8. Descripción de la estructura y contenido de la tesis

El *primer capítulo* presenta una introducción general sobre la ingeniería de tejidos, las afecciones coronarias y los tratamientos actuales, la historia de la ingeniería de tejidos vasculares, y las técnicas de obtención de matrices porosas. El *capítulo 2* detalla los avances recientes en el desarrollo de injertos vasculares mediante la técnica de electrohilado y presenta el trabajo experimental llevado a cabo para la producción de matrices electrohiladas e injertos vasculares por dicha técnica. Este capítulo está centrado en la fabricación de las matrices nanofibras y en la optimización de los parámetros del procesamiento para obtener estructuras reproducibles con morfología de fibras uniformes. Se utilizan dos polímeros biorreabsorbibles, poli(L-ácido láctico) y poli(éster uretano) segmentado sintetizado por nuestro grupo. Se producen injertos vasculares nanofibras monocapa y bicapa a partir de los polímeros puros y sus mezclas.

Los *capítulos 3, 4 y 5*, abarcan la caracterización de los diferentes injertos producidos a través de tres aspectos fundamentales para la ingeniería de tejidos. El *capítulo 3* estudia la caracterización térmica, físico-química y propiedades de superficie de los injertos y cómo las diferentes composiciones afectan estas propiedades. Se estudia también el comportamiento degradativo hidrolítico de los materiales poliméricos electrohilados empleados en el *capítulo 2*. En el *capítulo 4*, se realiza una

caracterización mecánica completa de los injertos vasculares monocapa y bicapa mediante ensayos de tracción uniaxial, ensayos de sutura, ensayos de *compliance* dinámica, y ensayos de presión de reventado. El aspecto biológico es abordado en el *capítulo 5*, donde se analiza el efecto de diferentes estímulos (químicos, topográficos, mecánicos) en la proliferación celular. También, se estudia la citotoxicidad de las matrices electrohiladas *in vitro* mediante ensayos MTT de proliferación de células madre mesenquimales.

El *capítulo 6* presenta una primera aproximación del modelado mecánico, aplicando un modelo sencillo para observar la influencia de la composición y cantidad de las capas del injerto y sus dimensiones (espesor y diámetro interno) en la respuesta del mismo a presión interna.

El *capítulo 7* resume los resultados de esta tesis, presentando las conclusiones obtenidas y un panorama de los aspectos a explorar en el futuro para mejorar y optimizar los injertos vasculares de pequeño diámetro desarrollados.

1.9. Bibliografía

- Abraham G.A., Caracciolo P.C., Buffa F., Cuadrado T.R., 2007. Diseño y preparación de matrices poliméricas porosas para ingeniería de tejidos biológicos, *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 59: 1-15.
- Achilli M., Mantovani D., 2010. Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation, *Polymers*, 2: 664-680.
- Adhikari R., Gunatillake P.A., Griffiths I., Tatai L., Wickramaratna M., Houshyar S., Moore T., Mayadunne R.T., Field J., McGee M., Carbone T., 2008. Biodegradable injectable polyurethanes: synthesis and evaluation for orthopaedic applications, *Biomaterials*, 29:3762-70.

- Andrady A.L., 2008. Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- ASTM D883-99, 1999. Standard Terminology relating to Plastics, American Standard for Testing and Methods.
 - Bouten C.V.C., Dankers P.Y.W., Driessen-Mol A., Pedron S., Brizard A.M.A., Baaijens F.P.T., 2011. Substrates for cardiovascular tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 221-241.
 - Campbell J.H., Efendy J.L., Campbell G.R., 1999. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circulation Research*, 85: 1173-1178.
 - Canver C.C., 1995. Conduit Options in Coronary Artery Bypass Surgery, *CHEST*, 108:1150-55.
 - Caracciolo P.C., de Queiroz A.A., Higa O.Z., Buffa F., Abraham G.A., 2008. Segmented poly(esterurethane urea)s from novel urea-diol chain extenders: synthesis, characterization and in vitro biological properties, *Acta Biomaterialia*, 4: 976-88.
 - Caracciolo P.C., Buffa F., Abraham G.A., 2009. Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20: 145-155.
 - Chapekar M.S., 2000. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 53: 617-620.
 - Chatterjee K., Hung S., Kumar G., Simon C.G.Jr., 2012. Time-Dependent Effects of Pre-Aging 3D Polymer Scaffolds in Cell Culture Medium on Cell Proliferation, *Journal of Functional Biomaterials*, 3: 372-381.
 - Conte M.S., 1998. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail?, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 12: 43-45.
 - Doshi J., Reneker D.H., 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of Electrostatics*, 35: 151-160.

- Greiner A., Wendorff J.H., 2007. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers, *Angewandte Chemie International Edition*, 46: 5670-5703.
- Greiner A., Wendorff J.H., 2008. Functional Self-Assembled Nanofibers by Electrospinning, *Advances in Polymer Science*, 219: 107-171.
 - Gupta A.P., Kumar V., 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique, *European Polymer Journal*, 43: 4053-4074.
 - Gupta B., Revagade N., Hilborn J., 2007b. Poly(lactic acid) fiber: an overview, *Progress in Polymer Science*, 32: 455-482.
 - Hoerstrup S.P., Lu L., Lysaght M.J., Mikos A.G., Rein D., Schoen F.J., Temenoff J.S., Tessmar J., Vacanti J.P., 2004. *Tissue Engineering in: Biomaterials Science*, 2nd. Ed., Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., (Editors), Elsevier Academic Press, p. 709-750.
 - Hsu C.-M., 2003. Electrospinning of poly(ϵ -caprolactone), Master of Science Thesis, Worcester Polytechnic Institute.
 - Huebsch N., Mooney D.J., 2009. Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature*, 462: 426-432.
 - Hutmacher D.W., 2005. Design and Fabrication of Scaffolds Via Solid Free Form Fabrication in: *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Reis R.L., San Román J., (Editores). CRC Press, Boca Raton, FL. USA, p. 67-90.
 - Kannan R.Y., Salacinski H.J., Butler P.E., Hamilton G., Seifalian A.M., 2005. Current Status of Prosthetic Bypass Grafts: A Review, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B: 570-581.
 - Karp J.M., Dalton P.D., Shoichet M.S., 2003. Scaffolds for tissue engineering, *MRS Bulletin*, 28: 301-306.
 - König G., McAllister T.N., Dusserre N., Garrido S.A., Iyican C., Marini A., Fiorillo A., Avila H., Wystrychowski W., Zagalski K., Maruszewski M., Linthurst Jones A., Cierpka L., de la Fuente L.M., L'Heureux N., 2009. Mechanical properties of completely autologous human tissue

- engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery, *Biomaterials*, 30: 1542-1550.
- Kramschuster A., Turng L.-S., 2013. Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds in *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, S. Ebnesajjad (Editor), Elsevier Inc., p. 427–446.
 - Kurobe H., Maxfield M.W., Breuer C.K., Shinoka T., 2012. Concise Review: Tissue-Engineered Vascular Grafts for Cardiac Surgery: Past, Present, and Future, *Stem Cells Translational Medicine*, 1: 566-571.
 - L’Heureux N., Paquet S., Labbe R., Germain L., Auger F.A., 1998. A completely biological tissue engineered human blood vessel. *FASEB Journal*, 12: 47-56.
 - Langer R.S., Vacanti J.P., 1993. Tissue Engineering, *Science*, 260: 920-926.
 - Langer R.S., Vacanti J.P., 1999. Tissue Engineering: The Challenges Ahead, *Scientific American*, 280: 86-9.
 - Langer R., 2009. The evolution of biomaterials, Interview by Stoddart A., Cleave V., *Nature Materials*, 8: 444-445.
 - Li F., Zhao Y., Song Y., 2010. Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning in *Nanofibers*, Kumar A. (Editor), InTech.
 - Libby P., Antman E.N., Braunwald E., Selwyn A.P., Baim D.S., Grossman W., 1998. Enfermedades Vasculares en *Harrison-principios de medicina interna*, volumen I, 14ª edición, A.S. Fauci, E. Braunwald, K.J. Isselbacher, J.D. Wilson, J.B. Martin, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo (Editores), McGraw Hill Madrid, p. 1536-1574.
 - Ma P.X., Elisseeff J., 2005. *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
 - Middleton J.C., Tipton A.J., 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21: 2335-2346.
 - Mooney D.J., Mikos A.G., 1999. Growing New Organs, *Scientific American*, 280: 60-5.

- Moore T., 2005. Design and synthesis of biodegradable thermoplastic polyurethanes for tissue engineering. Tesis de doctorado, Swinburne University of Technology, Australia.
- Nerem R.M., 2006. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future, *Tissue Engineering*, 12: 1143-1150.
 - Niklason L.E., Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R., Langer R., 1999. Functional Arteries Grown in Vitro, *Science* 284: 489-493.
 - O'Brien, F.J., 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14: 88-95.
 - Place E.S., Evans N.D., Stevens M.M., 2009. Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nature Materials*, 8: 457-470 .
 - Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Lim T-Ch., Ma Z., 2005. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, New Jersey, London, Singapur.
 - Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R., 2006. Electrospun nanofibers: solving global issues, *Materials Today*, 9: 40-50.
 - Ravi S., Chaikof E.L., 2010. Biomaterials for vascular tissue engineering, *Regenerative Medicine*, 5: 107-120.
 - Rhodin J.A.G., 2014. Architecture of the Vessel Wall in *Comprehensive Physiology*, Supplement 7: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Vascular Smooth Muscle: 1-31. First published in print 1980. doi: 10.1002/cphy.cp020201.
 - Robb B., Lennox B., 2011. The electrospinning process, conditions and control in *Electrospinning for tissue regeneration*, Bosworth L.A., Downes S. (Editors), Woodhead publishing, Oxford-Cambridge-Philadelphia-New Delhi, p. 51-66.
 - Savioli Lopesa M., Jardini A.L., Maciel Filho R., 2012. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications, *Procedia Engineering*, 42: 1402-1413.

- Seifu D.G., Purnama A., Mequanint K., Mantovani D., 2013. Small-diameter vascular tissue engineering, *Nature Reviews: Cardiology* advance, online publication, doi:10.1038/nrcardio.2013.77.
- Skalak R., Fox C.F., 1988. *Proceedings of the Tissue Engineering Workshop*, Granlibakken, Lake Tahoe, California, Alan Liss, New York.
 - Song L., Wang L., Shah P.K., Chaux A., Sharifi B.G., 2010. Bioengineered vascular graft grown in the mouse peritoneal cavity. *Journal of Vascular Surgery*, 52: 994-1002.
 - Stridsberg K.M., Ryner M., Albertsson A.-C., 2002. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture in Degradable Aliphatic Polyesters, *Advances in Polymer Science*, 157: 41-65. Springer Berlin Heidelberg
 - Sun D., Chang Ch., Li S., Lin L., 2006. Near-Field Electrospinning, *Nano Letters*, 6: 839-842.
 - Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G., 2000. Polymer Scaffold Processing in: *Principles of Tissue Engineering*, 2nd. Ed., Lanza, R.P., Langer R., Vacanti J. (Editors), Academic Press, USA, p. 251-262.
 - Tucker N., Stanger J.J., Staiger M.P., Razzaq H., Hofman K., 2012. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7: 63-73.
 - Weinberg C.B., Bell E., 1986. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science*, 231: 397-400.
 - Willerson J.T., Sabiston D.C. jr., 1991. *Trastornos coronarios en Cecil-tratado de medicina interna*, volumen 1, 18ª edición, J.B. Wyngaarden, L.H. Smith Jr. (Editores), Interamerica-McGraw Hill, México, p. 362-379.
 - Williams D.F., 1999. *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, UK, p. 318.
 - Williams D.F., 2008. On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials*, 29, 2941-2953.

Williams D.F., 2009. On the nature of biomaterials, *Biomaterials*, 30: 5897-5909.

- Yeong W.Y., Chua C.K., Leong K.F., Chandrasekaran M., 2004. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, *Trends in Biotechnology*, 22: 643-52.
- Zamani M., Prabhakaran M.P., Ramakrishna S., 2013. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2997-3017.

Capítulo 2

Obtención de injertos vasculares nanofibrosos

2.1. Introducción

El desarrollo de injertos vasculares de pequeño diámetro (< 6mm) aún representa un desafío. En los últimos 60 años, el empleo de injertos sintéticos de Dacron® y ePTFE ha sido la única alternativa a los injertos autólogos y homólogos. Como se mencionó en el capítulo 1, la ingeniería de tejidos presenta una alternativa prometedora a dichos injertos, los cuales fallan cuando se utilizan como injertos de pequeño diámetro. Dentro de la ingeniería de tejidos vasculares actualmente se investigan tres aproximaciones diferentes, ingeniería de tejidos sin soportes porosos, empleo de matrices decelularizadas y uso de matrices porosas (Vindigni, 2011). Todas estas estrategias poseen ventajas y desventajas. La utilización de una matriz porosa diseñada a medida, biomimética, con posibilidad de incorporación de agentes bioactivos, y con propiedades mecánicas adaptables, se dirige hacia la producción de injertos que se encuentren listos para ser implantados, sin necesidad de largos tiempos de cultivos *in vitro*, ideales para enfermedades de arterias coronarias.

La microestructura, porosidad, y topografía del injerto poroso son factores fundamentales para su desempeño exitoso. La producción de injertos vasculares se puede abordar mediante la utilización de diferentes técnicas. P.M. Crapo *et al.* fabricaron injertos vasculares de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli(glicerol sebacato) (PGS) mediante la técnica de evaporación de solvente y disolución de partículas (Crapo, 2010; Gao, 2008). El grupo de D.A. Vorp desarrolló injertos de poli(éster uretano)urea (PEUU) obtenidos mediante la técnica de separación de fases inducida por temperatura (TIPS) (Nieponice, 2008). Otros grupos utilizaron polímeros naturales, C.E. Ghezzi *et al.* produjeron injertos densos de colágeno simplemente al envolver circunferencialmente láminas de gel de colágeno densas, comprimidas plásticamente, alrededor de un soporte cilíndrico (Ghezzi, 2012). S. Liu *et al.* desarrollaron injertos bicapa reforzados de fibrina de seda con heparina (Liu, 2013).

Se han logrado injertos con propiedades interesantes mediante las técnicas mencionadas, no obstante, la tecnología de electrohilado resulta una técnica prometedora para la producción de injertos vasculares. Esta es una técnica versátil, que permite la producción de fibras de nano/microescala que presentan un gran potencial para imitar el microambiente fibroso de la matriz extracelular natural presente en las arterias (Hasan, 2014). El electrohilado ofrece la posibilidad de ajustar finamente las propiedades mecánicas durante la fabricación, controlando la microarquitectura porosa, tamaño y la orientación de las fibras, logrando comportamientos anisotrópicos como los observados en los vasos sanguíneos. Además, la posibilidad de usar un colector rotatorio de pequeño diámetro, resulta en la obtención de una tubuladura sin costura ideal para aplicaciones vasculares. Todas estas ventajas, en conjunto con las ya mencionadas en el capítulo 1, posicionan a la técnica de electrohilado como una técnica ideal para la producción de injertos vasculares de pequeño diámetro.

El desarrollo de injertos vasculares electrohilados compuestos de un solo tipo de polímero se ha centrado principalmente en el estudio de injertos a partir de PCL (Drilling, 2009; Nottelet, 2009; Wu, 2010; Mugnai, 2013), poliuretanos estables (How, 1961; Matsuda, 2005; Grasl, 2010; Miyazu, 2010; Han, 2013a; He, 2013; Bergmeister, 2013) y biodegradables (Courtney, 2006; Han, 2011; Punnakitikashem, 2014). Si bien estos injertos presentaron resultados prometedores, las tubuladuras compuestas de un único polímero presentan propiedades mecánicas extremas (o muy rígidas o muy elásticas). También se han desarrollado injertos monocapa a partir de biopolímeros como la fibrina de seda (Marelli, 2010) y tropoelastina recombinante humana (McKenna, 2012). Sin embargo, su utilidad ha sido limitada debido a las pobres propiedades mecánicas e inestabilidad dimensional causadas por la contracción y la prematura disolución en condiciones de cultivo de los polímeros naturales (Li, 2005; Sell, 2010).

Se utilizaron copolímeros y mezcla de polímeros electrohilados con el fin de mejorar tanto la respuesta mecánica, como biológica. El grupo de T.

Matsuda estudió el comportamiento mecánico y biológico de injertos a partir de poli(L-lactida-co-ε-caprolactona) (PLCL) (Inoguchi, 2006; Inoguchi, 2007). W. He *et al.* también realizaron injertos electrohilados de PLCL, en este caso se recubrió el interior del injerto con colágeno para mejorar la adhesión celular (He, 2009). C. Huang *et al.* obtuvieron dos injertos de PLCL, uno con fibras de estructura de tipo cáscara-núcleo en donde encapsularon heparina y otro injerto en el cual se pre-cultivó endotelio *in vitro* en el interior (Huang, 2013). El trabajo muestra mejores resultados de la tasa de permeabilidad *in vivo* para los injertos pre-endotelizados. A pesar de la mejora en las propiedades de los copolímeros frente a las presentes en los polímeros puros, se encontró que muchas propiedades, como por ejemplo la degradación, se ve más beneficiada por la mezcla de polímeros (Cha, 1990; Hiljanen-Vainio 1996). Algunos injertos se realizaron con mezclas de polímeros sintéticos (Yu, 2012; Wang, 2012; Wang, 2012b), pero en la mayoría de los casos las mezclas se efectuaron con polímeros sintéticos y naturales. Se logran aprovechar así, las buenas propiedades mecánicas y buena procesabilidad de los polímeros sintéticos, y la biocompatibilidad, hidrofiliidad y buena adhesión celular de los polímeros naturales.

A. Atala y su grupo produjeron injertos vasculares a partir de mezclas de distintos poliésteres sintéticos, colágeno y elastina (Stitzel, 2006; Lee, 2007; Lee, 2008; Tillman, 2009). En un primer estudio, analizaron las propiedades mecánicas y citotoxicidad de injertos electrohilados de mezclas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PDLGA), colágeno y elastina (Stitzel, 2006). Se obtuvieron resultados prometedores, con valores de *compliance* y presión de reventado similares a los encontrados en arterias naturales. Luego, analizaron la contracción e hinchamiento de estos injertos *in vitro*, así como también de mezclas de elastina y colágeno, con PCL, PLLA, o PLCL (Lee, 2007). Los injertos obtenidos a partir de polímeros naturales colapsaron en tan solo 4 días de cultivo *in vitro*. Las mezclas con PDLGA y PLCL sufrieron contracciones severas luego de un mes de cultivo, mientras que las mezclas con PLLA y PCL mantuvieron su forma, incluso luego de dos meses de cultivo. Posteriormente, estudiaron en mayor profundidad las mezclas de

PCL y colágeno. Estos injertos mostraron alta estabilidad en cultivos en biorreactor y buenas propiedades mecánicas (Lee, 2008). Los injertos presentaron una *compliance* en el orden de las arterias naturales, sin embargo esta fue calculada fuera del intervalo fisiológico (0-120 mmHg) y no es comparable. La formación de un endotelio en el lumen de los injertos se estudio mediante ensayos *in vivo* y cultivos *in vitro* en biorreactor (Tillman, 2009). Se encontró una buena tasa de permeabilidad luego de un mes de implantación y las propiedades mecánicas, si bien disminuyeron, se mantuvieron en el orden de las arterias naturales. Los resultados obtenidos son prometedores no obstante, la caracterización mecánica no es representativa del desempeño *in vivo*, ya que solo se analizó en tracción uniaxial.

Y.K. Vohra *et al.* desarrollaron un injerto a partir de poligecaprona (PGC), PCL, elastina soluble bovina y gelatina bovina (Zhang, 2011). El estudio se centró en un aspecto más biológico, poniendo el énfasis en la formación de endotelio y adhesión de plaquetas al interior del injerto. La capa de células endoteliales llegó a confluencia en 24 h, tiempo que representa un intervalo factible en el caso de cirugía cardiovascular. Sin embargo, estos injertos carecen de una caracterización mecánica que demuestre la viabilidad de los mismos frente a solicitaciones fisiológicas pulsátiles en el tiempo.

A. Yin *et al.*, realizaron mezclas de PLCL con colágeno y quitosano, y estudiaron distintas proporciones de cada polímero en los injertos (Yin, 2013). El estudio se centró en la optimización de las propiedades mecánicas, obteniendo una buena presión de rotura para casi todas las mezclas estudiadas. Sin embargo, el injerto con mejor comportamiento general, presentó un valor de *compliance* muy bajo.

L. Jia *et al.* estudiaron el comportamiento de mezclas a partir de PLLA y colágeno (Jia, 2013). El trabajo se centró en el análisis biológico de estructuras fibrosas electrohiladas en colector plano como candidatas para ingeniería de tejidos vasculares. Los resultados obtenidos son interesantes,

no obstante la caracterización mecánica es pobre y carece de estudios de estructuras con geometría tubular.

Los injertos electrohilados de mezclas de polímeros presentan un mejor comportamiento, tanto mecánico como biológico, sin embargo, la estructura en capas de las arterias naturales sugiere que los injertos con dos o tres capas concéntricas pueden lograr un mayor grado de biomimeticidad. Muchos grupos se han centrado en el desarrollo de este tipo de injertos, en algunos casos mediante injertos híbridos con una capa electrohilada y otra obtenida mediante otras técnicas de obtención de fibras o matrices porosas (Williamson, 2006; Soletti, 2010; Rapoport, 2012), y en otros casos a partir de capas con distinta morfología y porosidad pero con el mismo polímero (de Valence, 2012). La mayoría de estos estudios se enfocaron en injertos con multicapas electrohiladas de mezclas de distinta composición y en algunos casos tomando como base los estudios previos en injertos monocapa de mezclas de polímeros.

S. Kidoaki *et. al.* fueron los primeros en producir injertos vasculares multicapa por la técnica de electrohilado. Su trabajo se centró en la descripción de la técnica de electrohilado secuencial. Realizaron injertos bicapa con una capa interna de colágeno y una externa de un poliuretano bioestable (Kidoaki, 2005).

El grupo de Y.K. Vohra también estudió y optimizó injertos multicapas (Thomas, 2007; Zhang, 2010; Zhang, 2010b). En una primera aproximación, produjeron injertos bicapa y tricapa a partir de elastina, gelatina y poligliconato (PG) (Maxon®). Se obtuvieron capas con distinta porosidad. Los autores consideraron a los injertos como buenos candidatos, sin embargo carecen de una caracterización mecánica profunda, así como también estudios de citotoxicidad (Thomas, 2007). Posteriormente, en base a los injertos monocapa de mezclas (Zhang, 2011), realizaron tubuladuras bicapa de PGC, PCL, elastina y colágeno para la capa interna y PGC, PCL y elastina para la capa externa (Zhang, 2010; Zhang, 2010b). Estudiaron el comportamiento mecánico en forma un poco más completa, pero sin realizar ensayos dinámicos bajo regímenes fisiológicos. También estudiaron la

capacidad de regeneración de endotelio *in vitro* de los injertos, obteniendo buenos resultados.

G.L. Bowling y su grupo desarrollaron injertos tricapa a base de PCL, elastina y colágeno o fibrina de seda (McClure, 2010; McClure, 2012). Los injertos se caracterizaron mecánicamente, mediante ensayos dinámicos bajo sollicitaciones fisiológicas, ensayos de resistencia a la sutura y presión de reventado. La variación en la composición de la capa media y externa, así como también la presencia de colágeno o fibrina de seda en la mezcla de la capa y el tipo de entrecruzante utilizado, permitieron modular la respuesta mecánica. Las propiedades mecánicas no tuvieron variaciones significativas luego de 4 semanas de degradación hidrolítica. El análisis realizado permitió concluir que los injertos resultaron mecánicamente biomiméticos, y que son potenciales candidatos para el reemplazo de vasos de pequeño diámetro. Sin embargo, aún requieren de estudios celulares *in vitro* y/o *in vivo* previos a los estudios clínicos.

S.G. Wise *et al.* realizaron injertos vasculares bicapa, con una capa interna a partir de elastina sintética y una capa externa a partir de una mezcla de PCL y elastina. Los autores concluyen que la capa interna estimula la endotelización y evita la adhesión de plaquetas en el lumen del injerto, mientras que la capa externa le confiere estabilidad mecánica (Wise, 2011). El injerto imita el desempeño mecánico de la arteria mamaria.

En los últimos años, también se prepararon injertos multicapa electrohilados con factores de crecimiento y agentes anticoagulantes, para mejorar la infiltración celular y evitar la formación de trombos (Han, 2013b; Wang, 2013; Lu, 2013). Mediante la biofuncionalización de los injertos, se busca evitar la etapa de cultivo *in vitro* y producir injertos listos para su implementación quirúrgica.

La mayoría de los injertos multicapa, o a partir de mezclas de polímeros se desarrollaron a partir de polímeros naturales y algún poliéster sintético que mejore la estabilidad mecánica de los mismos. Considerando que los injertos vasculares están sometidos a sollicitaciones pulsátiles es importante imitar su respuesta mecánica, y en consecuencia los materiales

presentes en la estructura porosa deben comportarse como los componentes presentes en la matriz extracelular de las arterias, principalmente colágeno y elastina. Por este motivo, muchos investigadores han desarrollado injertos vasculares a partir de ambos. En esta tesis se eligió el PLLA debido a que exhibe un comportamiento mecánico similar al observado en el colágeno y se seleccionó un SPEU el cual exhibe un comportamiento elastomérico característico que puede imitar a la elastina. El comportamiento conjunto de PLLA y SPEUs se ha estudiado muy poco en estas aplicaciones (Hasan, 2014).

Este capítulo se centra en el procesamiento y optimización por la técnica de electrohilado de tubuladuras nanofibrosas de PLLA y SPEU, así como también de estructuras conformadas por dos mezclas de distinta proporción de éstos, con posible aplicación como matriz para ingeniería de tejidos vasculares de pequeño diámetro.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

2.2.1.1. Materiales

PLLA (PLA2002D, $M_n = 78,02 \text{ kg mol}^{-1}$, $M_w = 129,91 \text{ kg mol}^{-1}$, IP = 1,67) obtenido de Natureworks (MN, USA). SPEU biodegradable (denominado PHD) sintetizado en nuestro laboratorio (Caracciolo, 2009a). Diclorometano (DCM) y *N,N*-dimetilformamida (DMF) fueron adquiridos en Anedra (BA, Argentina). Tetrahidrofurano (THF) se compró a Cicarelli (Santa Fé, Argentina). 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) fue adquirido de Sigma-Aldrich (MO, USA). Todos los solventes fueron de grado analítico y se emplearon tal como fueron recibidos.

2.2.1.2. Síntesis de poli(éster uretano) segmentado

El SPEU se sintetizó a partir de un diisocianato alifático, un poli(éster) alifático y un extendedor de cadena de tipo diéster aromático siguiendo el procedimiento reportado previamente (Caracciolo, 2009a). Brevemente, se preparó PCL diol ($M_n = 2,25 \text{ kg mol}^{-1}$) por polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona iniciado por trietilenglicol. Se utilizó un derivado de la tirosina como un extendedor de cadena diesterdifenol. Este compuesto se sintetizó mediante una reacción de esterificación de Fisher entre ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (desamino tirosina) y etilenglicol (relación 2:1 molar) catalizado por el ácido *p*-toluensulfónico en reflujo de tolueno. La reacción se llevó a cabo hasta su finalización usando un aparato Dean-Stark para atrapar el agua emergente.

El SPEU se obtuvo por un método de polimerización de dos pasos. En resumen, el PCL diol reaccionó con hexameten diisocianato en una relación 1:2,01 molar a 80 °C en *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) anhidro bajo agitación y atmósfera de nitrógeno. La prepolimerización procedió en presencia de dibutilestano dilaurato como catalizador (0,1 p% de macrodiol) por 1 h, y luego la solución se concentró. El extendedor de cadenas fue disuelto previamente en DMAc, y se agregó en una relación 1:1 molar con respecto al prepolímero. La reacción de extensión de cadenas se llevó a cabo por 6 h a 80 °C. El polímero resultante (PHD) se precipitó en agua destilada fría, se lavó y luego secó bajo vacío. El peso molecular promedio en número (M_n) determinado por GPC es de 25,16 kg mol⁻¹, el peso molecular promedio en masa (M_w) es 58,47 kg mol⁻¹ y el índice de polidispersidad (IP) es 2,32.

2.2.2. Obtención de matrices nanofibrosas planas y tubulares mediante electrospinning de soluciones poliméricas

2.2.2.1. Obtención de matrices nanofibrosas planas de PLLA, PHD y sus mezclas

Las condiciones experimentales de procesamiento se optimizaron mediante un dispositivo de electrohilado estándar, estudiando diversas mezclas de solventes, concentraciones de polímeros y parámetros de electrohilado. Cada una de las soluciones se cargó en una jeringa de polipropileno estándar de 10 mL conectada a un tubo de poliamida y a una aguja de acero inoxidable de 18-gauge de punta roma, usada como boquilla. La velocidad de infusión se controló a través de una bomba de infusión programable (Activa A22 ADOX S.A., Argentina). Se utilizó una fuente de alta tensión (ES30P, Gamma High Voltage Research Inc.) y se conectó el electrodo de polaridad positiva a la boquilla y el electrodo a tierra a la placa colectora de aluminio. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en una cámara acrílica con un sistema de ventilación. Las matrices electrohiladas se secaron bajo vacío a temperatura ambiente para eliminar por completo el solvente residual, y finalmente se almacenaron en desecador.

Se analizó la influencia de las variables del procesamiento en la obtención de fibras uniformes (sin gotas) y se estableció una condición de electrohilado óptima para el PLLA, PHD y las mezclas estudiadas. Para el PLLA, se eligió una mezcla de solventes DMF/DCM en relaciones 25/75 y 40/60. Las concentraciones (Cs) utilizadas fueron 7, 10 y 15% p/v. Para cada solución diferente, se variaron los parámetros de electrohilado. Se utilizaron los siguientes valores experimentales: tensión, V : 10, 12, 15 kV; distancia boquilla-colector, d : 10, 12, 15 cm; y velocidad de infusión, f : 1, 2 ml/h). La tabla 2.1 resume todas las condiciones de electrohilado estudiadas.

En el caso del PHD, la concentración así como la relación de la mezcla de solventes utilizada para solubilizar el poliuretano fueron los parámetros

analizados en mayor profundidad. Se usaron soluciones de PHD 30% p/v en DMF/THF con relaciones de 50/50, 40/60, 60/40. También se emplearon soluciones de PHD 40% p/v en DMF/THF (60/40), 20% p/v en DMF/THF (40/60) y 20% p/v en DMF/DCM (40/60 y 30/70). Finalmente, se utilizaron soluciones de PHD en TFE 20 y 25% p/v. En todos los casos se variaron los parámetros de procesamiento de electrohilado ($f = 0,5, 1$ ml/h; $d = 10, 15$ cm; $V = 10, 13, 15, 20$ kV).

Tabla 2.1. Parámetros de electrohilado estudiados para soluciones de PLLA.

f (mL/h)	d (cm)	V (kV)	PLLA 15%	PLLA 10%	PLLA 10%	PLLA 7%
			DMF/DCM 25/75	DMF/DCM 25/75	DMF/DCM 40/60	DMF/DCM 40/60
1	10	10	X	X	X	X
1	10	12	X	X	X	X
1	10	15	X	X	X	X
1	12	10	X	X	X	X
1	12	12	X	X	X	X
1	12	15	X	X	X	X
1	15	10			X	X
1	15	12				X
1	15	15			X	X
2	10	10	X			X
2	10	12				X
2	10	15				X
2	12	10		X		X
2	12	12		X	X	X
2	12	15		X	X	X

Luego de fijar las condiciones óptimas de electrohilado para los polímeros puros, se estudiaron mezclas de ambos polímeros. La configuración en capas del injerto permite contener una capa de células endoteliales formando la íntima. Dado que las capas externas, media y adventitia, son las que le brindan a la arteria su funcionalidad mecánica, estas se diseñaron mediante la técnica de electrohilado. Se utilizaron dos relaciones de mezclas de polímeros (PLLA/PHD) distintas, las cuales serán denominadas a lo largo de la tesis como capa interna y externa respectivamente. Para la composición de las mezclas, se tuvo en cuenta la relación de colágeno/elastina de las arterias musculares (Fisher, 1966) y la

cantidad estudiada de cada uno de estos polímeros naturales en las capas (Rhodin, 2014; McClure, 2012).

Las proporciones de PLLA/PHD se fijaron en 50/50 y 90/10 para la capa interna y externa respectivamente, empleando TFE como solvente para el procesamiento. En primer lugar, la mezcla se preparó considerando la proporción de cada solución polimérica utilizada previamente para el electrohilado de los polímeros puros; p.e.: 50% de PLLA 10% p/v y 50% de PHD 25% p/v en TFE para la capa interna y 90% de PLLA 10% p/v y 10% de PHD 25% p/v en TFE para la capa externa. Esto resultó en una concentración total de 17,5% p/v y 11,5% p/v para la capa interna y externa respectivamente. Además, se estudió una concentración total de la solución mayor, y las proporciones de las mezclas utilizadas se establecieron fijando una relación en peso de cada polímero. En consecuencia, se utilizaron las siguientes concentraciones: 20% p/v en TFE para la capa interna con PLLA/PHD 50/50 p/p y 15% p/v en TFE para la capa externa con PLLA/PHD 90/10 p/p. Los parámetros de electrohilado analizados para estas soluciones fueron: $f = 0,5, 1$ ml/h; $d = 15$ cm; $V = 13$ kV.

2.2.2.2. Preparación de matrices alineadas de PLLA

Buscando una morfología similar a las fibras de colágeno, se utilizó un colector de dos placas paralelas para estudiar la alineación de las nanofibras de PLLA. Se empleó la solución de PLLA estudiada en colector plano (10% p/v en DMF/DCM 40/60) para optimizar los parámetros de electrohilado conducentes a la obtención de una topografía altamente alineada. Se estudió el efecto de la distancia entre las placas (*d-placas*) así como también de f , d , y V . Los valores explorados fueron $d-placas = 2, 2,5, 3$ cm; $f = 0,5, 1$ ml/h; $d = 15$ cm; $V = 13, 15$ kV.

2.2.2.3. Preparación de estructuras tubulares nanofibrosas de pequeño diámetro

Se utilizó un mandril rotatorio de pequeño diámetro de acero inoxidable (5 mm de diámetro, 15 cm de longitud) como colector de las nanofibras para obtener estructuras tubulares (Figura 2.1.). La boquilla se cambió de posición cada un lapso de tiempo fijo para lograr estructuras con un espesor uniforme a lo largo del eje.



Figura 2.1. Equipo de electrohilado con colector rotatorio. 1) Controlador de velocidad del mandril, 2) bomba de infusión, 3) boquilla, 4) fuente de alta tensión y 5) mandril rotatorio.

Las estructuras de PLLA se electrohilieron a partir de una solución 10% p/v empleando $f = 0,5$ mL/h, $d = 15$ cm, $V = 13$ kV y velocidad de rotación (r) = 1000 rpm. Se utilizaron dos colectores auxiliares, un colector plano y otro de placas paralelas, los que se colocaron por debajo del mandril

rotatorio para estudiar el efecto del campo electroestático en la alineación de las fibras dentro del injerto.

Las estructuras de PHD se obtuvieron a partir de una solución al 25% p/v empleando $f = 1$ mL/h, $d = 15$ cm, $V = 13$ kV, $r = 1000$ rpm y una placa plana de aluminio como colector auxiliar.

Se utilizó una solución al 20% p/volumen total con PLLA/PHD 50/50 p/p y 15% p/volumen total con PLLA/PHD 90/10 p/p para las capas interna y externa respectivamente. Los parámetros de electrohilado utilizados para capa interna fueron los usados para el PHD y para la capa externa se emplearon los parámetros fijados para el PLLA.

2.2.3. Caracterización morfológica y topográfica

2.2.3.1. Análisis de la morfología fibrosa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica de las matrices porosas de PLLA, PHD y las mezclas de PLLA/PHD, y las estructuras tubulares se realizó a partir de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio JEOL (JSM-6460LV; JEOL, Japan), luego de recubrir las mismas con oro.

2.2.3.2. Análisis de micrografías de SEM mediante Image Pro-Plus y un algoritmo de morfología matemática

Las micrografías obtenidas se analizaron utilizando un software de procesamiento digital de imágenes (Image Pro Plus; Media Cybernetics Inc., USA), se midió el diámetro de las nanofibras y su orientación. A fin de obtener un dato estadísticamente significativo se midieron aproximadamente 100 fibras por cada condición estudiada. Se obtuvieron histogramas de distribución de diámetro y ángulo de las fibras, se determinó

el diámetro medio y su desviación estándar, y el ángulo de orientación medio y su desviación estándar.

Se desarrolló un algoritmo basado en técnicas de morfología matemática, con el fin de automatizar la caracterización de las matrices. Este utiliza la función granulométrica de tamaños para cuantificar las orientaciones de las nanofibras realizando además un análisis de la estadística de la orientación que aparece en cada imagen. Dada la familia que surge de la aplicación de sucesivas aperturas con elementos estructurantes de tamaños crecientes, λ , se define la función de distribución granulométrica de tamaños normalizada (FGTN) expresada en la siguiente ecuación.

$$G(\lambda) = \frac{\int_{\lambda}^{\infty} A \circ E \circ \Omega}{\int_{\lambda}^{\infty} A} \quad (2.1.)$$

donde A es la operación apertura determinada por el elemento estructurante $E\lambda$, y Ω es una medida de la imagen resultante. Luego de determinar la FGTN, que se comporta como una función de distribución de probabilidad, se obtuvo el valor medio, la desviación estándar y la energía de esta función, valores que se utilizaron como estadísticos de las imágenes. Se aplicaron elementos estructurantes lineales con inclinaciones en un intervalo de 0° a 175° de a 10° grados (Gonzalez, 2012).

2.3. Resultados

2.3.1. Injertos vasculares de PLLA

2.3.1.1. Optimización de propiedades intrínsecas de soluciones y parámetros de procesamiento

Se realizó un estudio completo de los parámetros de electrohilado y su influencia en el diámetro de las nanofibras para efectuar un estudio

detallado de la obtención de estructuras nanofibrosas de PLLA. Se exploraron tres concentraciones diferentes (7, 10 y 15% p/v). La solución 7% p/v mostró estar por debajo de la concentración crítica para la producción de nanofibras uniformes, conduciendo a la formación de una estructura de fibras en forma de rosario (Figura 2.2. a). Las soluciones más concentradas, 10% y 15% p/v, presentaron una estructura nanofibrosa uniforme (Figura 2.2. b, c). En consecuencia, se eligió la solución 10% p/v por encontrarse por encima de la concentración crítica requerida para producir el enmarañamiento de las cadenas poliméricas y al mismo tiempo formar fibras de menor diámetro (732 ± 215 nm) que las obtenidas con la solución 15% p/v (1114 ± 260 nm) ($p < 0,05$).

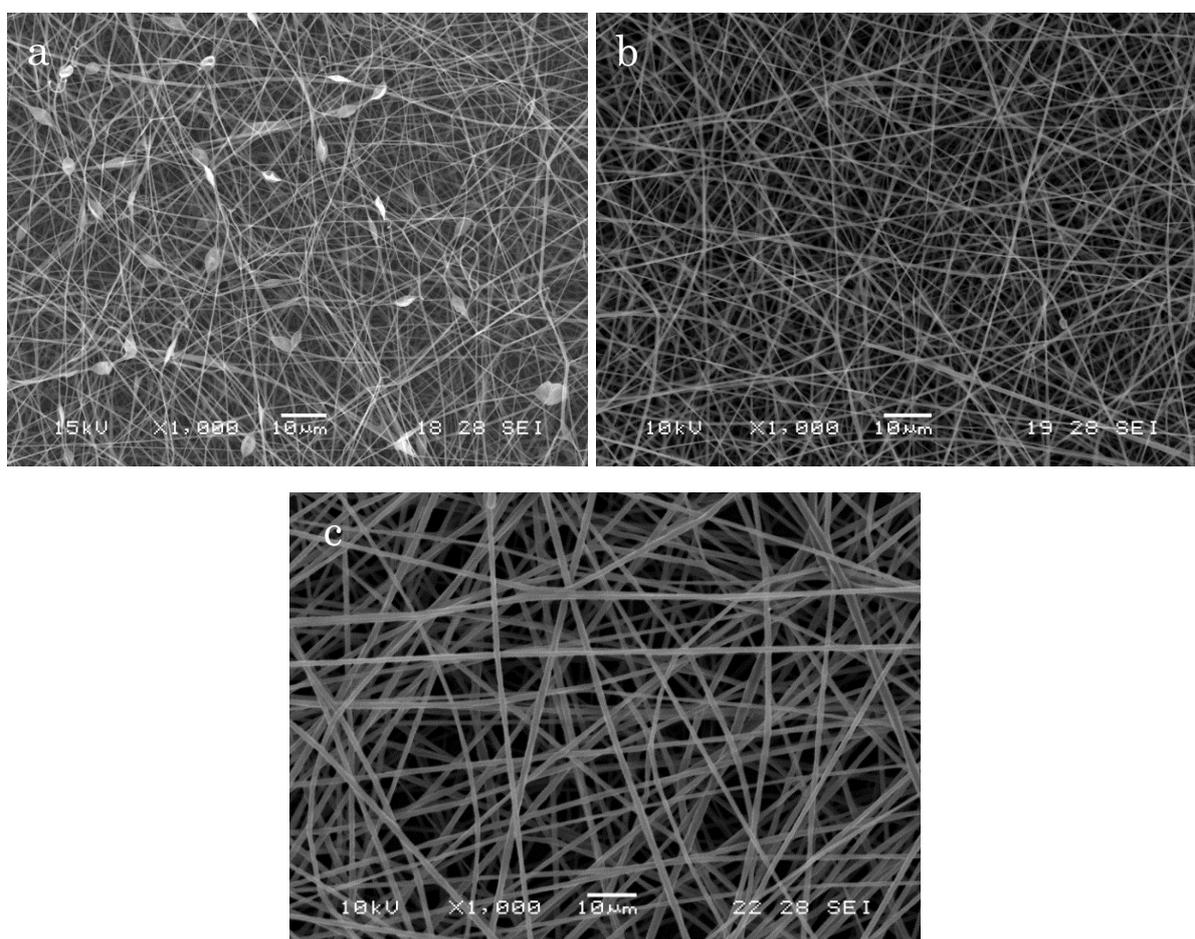


Figura 2.2. Micrografías SEM de matrices electrohiladas de PLLA a partir de soluciones al a) 7%, b) 10% y c) 15% p/v.

Además, se modificó la proporción de las mezclas de DMF/DCM entre 25/75 y 40/60 v/v y se analizó el efecto de la mezcla de solventes utilizada. En el proceso de electrospinning el solvente se evapora casi completamente en la trayectoria que recorre el microchorro entre los electrodos durante el tiempo de proyección. Se pensó que el empleo de una mezcla de solventes con mayor contenido de DCM, el cual posee un bajo punto de ebullición ($T_{eb\ DCM} = 39,6\text{ °C}$, $T_{eb\ DMF} = 153\text{ °C}$) produciría fibras con menor diámetro, sin embargo, el momento dipolar del DMF es mayor ($P_{DCM} = 1,6\text{ D}$, $P_{DMF} = 3,86\text{ D}$), lo cual favorece la conducción de cargas en la solución. De esta manera, el efecto del momento dipolar dominó al producido por la temperatura de ebullición, y la mezcla de DMF/DCM 40/60 condujo a la formación de nanofibras con menor diámetro medio y menor desviación estándar ($732 \pm 215\text{ nm}$ contra $506 \pm 136\text{ nm}$) ($p < 0,05$).

Los parámetros de procesamiento (V , d y f) no presentaron una influencia significativa en el diámetro medio de las nanofibras en las condiciones experimentales exploradas ($p < 0,05$). Las nanofibras resultantes de la condición óptima de electrohilado, a partir de la solución de PLLA 10% p/v en DMF/DCM 40/60 electrohiladas a $f = 1\text{ mL/h}$, $V = 10\text{ kV}$ y $d = 10\text{ cm}$, presentaron un diámetro medio de $506 \pm 136\text{ nm}$.

2.3.1.2. Tubuladuras de pequeño diámetro

2.3.1.2.1. Influencia de la velocidad de rotación en la topografía de tubuladuras de pequeño diámetro

En base a los resultados anteriores, se electrohilieron dos tipos de estructuras vasculares con diferente diámetro interno (\emptyset), 4 y 5 mm y se estudió el efecto de la velocidad de rotación del mandril en la topografía de las nanofibras en busca de fibras alineadas similares al colágeno (Figura 2.3.). Las muestras presentaron una morfología nanofibrosa uniforme. La velocidad de infusión se disminuyó de 1 a 0,5 mL/h, dado que la rotación del mandril a altas revoluciones genera la acumulación de fibras y el diámetro

del tubo se incrementa de manera no uniforme. La tabla 2.2. resume los resultados de la caracterización de las estructuras vasculares.

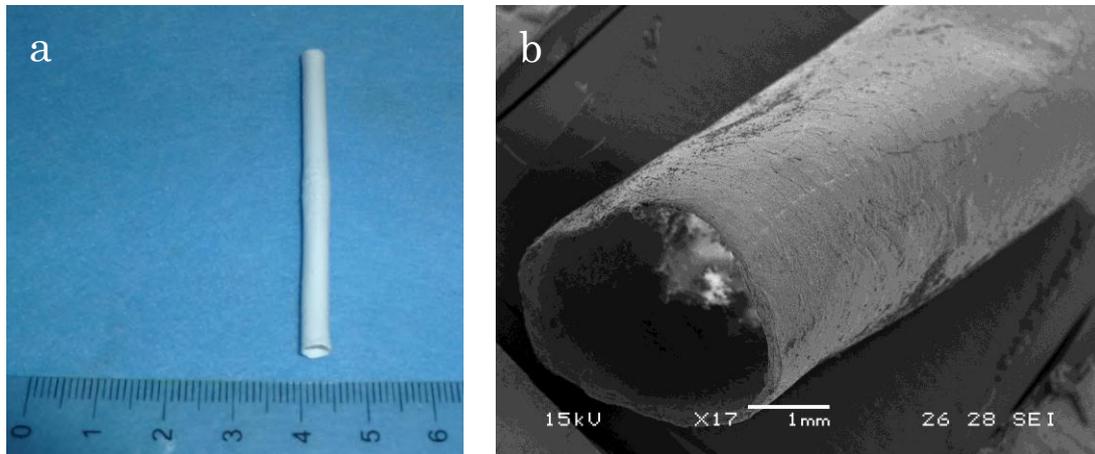


Figura 2.3. a) Fotografía de la estructura tubular obtenida y b) micrografía SEM de un injerto vascular de PLLA de 4 mm.

Los valores de diámetro medio de las nanofibras se encontraron comprendidos entre 300 y 600 nm. La velocidad de rotación del mandril no mostró ninguna influencia en el tamaño de las nanofibras en las condiciones experimentales empleadas.

Tabla 2.2. Diámetro y ángulo medio, y sus respectivas desviaciones estándares para las estructuras vasculares obtenidas.

	Diámetro medio (nm)	Desviación estándar (nm)	Ángulo medio (°)	Desviación estándar (°)
PLLA Ø=4 mm				
r=1000 rpm	532	155	112	80,9
r=2000 rpm	337	185	98	61,5
r=3000 rpm	501	130	99	60,9
r=4000 rpm	393	109	99	71,7
PLLA Ø=5 mm				
r=1000 rpm	513	138	112	87,5
r=2000 rpm	601	185	98	52
r=3000 rpm	382	122	101	66,1
r=4000 rpm	540	139	97	80,3

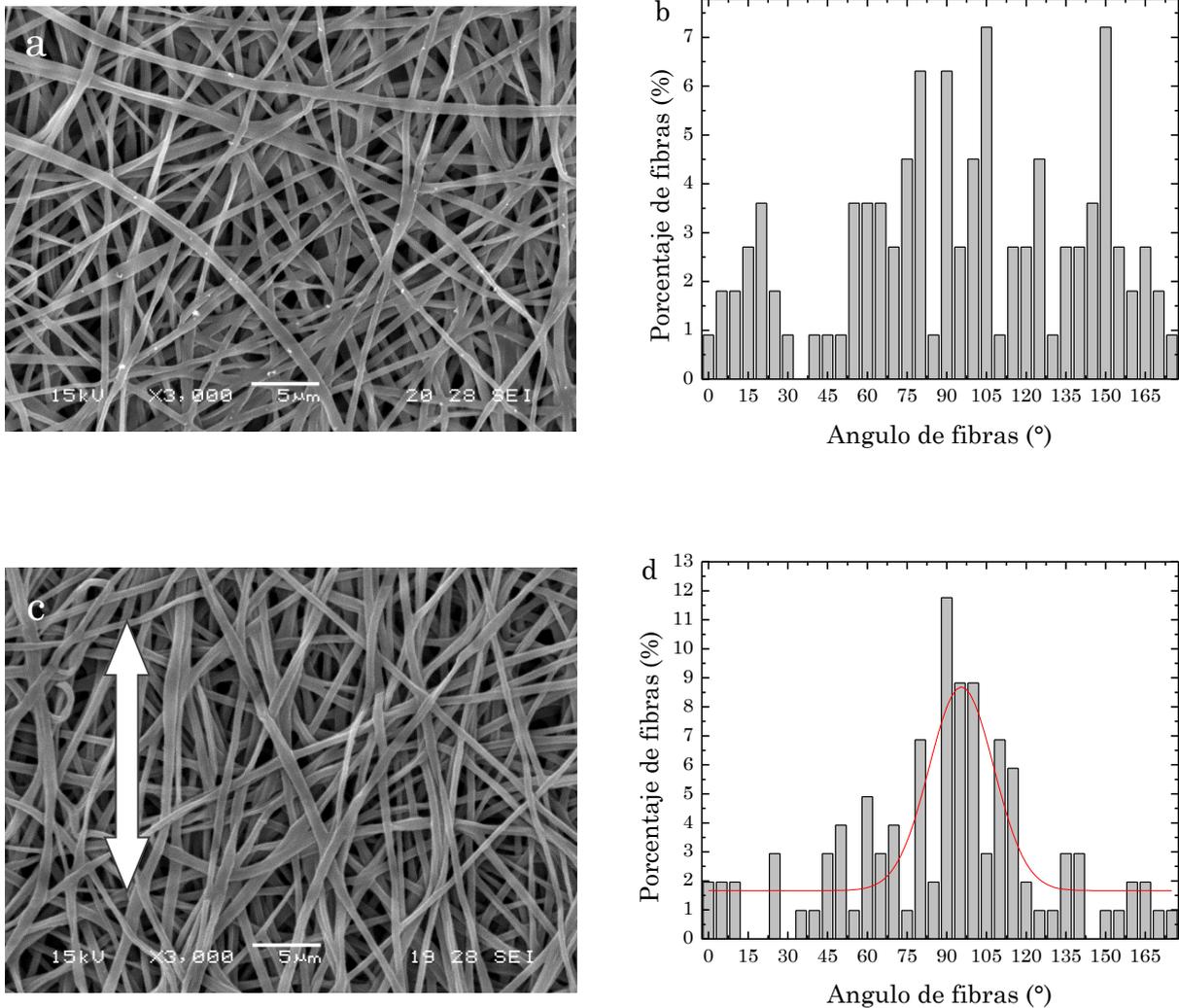


Figura 2.4. a), c) Micrografías SEM y b), d) distribución de ángulos de las paredes de injertos vasculares para $\varnothing = 4$ mm y $r=1000$ y 3000 rpm respectivamente.

Los diámetros de fibras presentaron una distribución unimodal angosta en todas las condiciones estudiadas. En cuanto a la orientación, aunque el ángulo medio parece encontrarse en un intervalo pequeño de valores (90 - 100°), la alta desviación estándar obtenida indica que no se obtuvo ninguna orientación preferencial. En efecto, al observar las micrografías SEM y los histogramas de distribución de ángulos, no se encontró una orientación predominante (Figura 2.4. a, b), excepto por una orientación leve presente en la estructura de 4 mm de diámetro interno obtenida a 3000 rpm (Figura 2.4. c, d). Sin embargo, no se puede afirmar

que la topografía es alineada dado que el valor de la desviación estándar es alto.

2.3.1.2.2. Efecto del campo eléctrico en la topografía

Se estudió el efecto del campo eléctrico en la obtención de una topografía alineada en las tubuladuras de PLLA. En una primera instancia se utilizó un colector de dos placas paralelas en matrices planas para estudiar la influencia de los parámetros en la alineación de las nanofibras. Para ello, se usó la solución de PLLA optimizada para el colector plano (10% p/v DMF/DCM 40/60), y se variaron los parámetros de procesamiento como velocidad de infusión, distancia boquilla-colector, tensión aplicada y distancia entre las placas colectoras. El grado de alineación se estudió a partir de mediciones de procesamiento de imágenes manual (IPM) y a partir de un algoritmo matemático basado en técnicas de morfología matemática (MA) (Sección 2.2.3.2.). La velocidad de infusión resultó ser el parámetro con un efecto más significativo en la topografía nanofibrosa. Una velocidad de infusión de 1 mL/h produjo fibras con orientación aleatoria, mientras que para $f = 0,5$ mL/h todas las muestras presentaron fibras alineadas en menor o mayor medida. Otros parámetros, como la tensión o la distancia entre las placas influyeron en el grado de alineación de las nanofibras.

La figura 2.5. a-b muestra las líneas del campo eléctrico resultantes del modelado por elementos finitos para los colectores usados. Se puede apreciar que el campo se divide en dos cuando se utiliza un colector de placas paralelas. La figura 2.5. c-d muestra las diferentes topografías (aleatoria y alineada) resultantes a partir de cada colector.

El proceso de electrohilado con $f = 0,5$ mL/h, $d = 15$ cm, $V = 13$ kV y d -*placas* = 2,5 cm produjo una matriz nanofibrosa altamente alineada con un ángulo medio de fibra de $75 \pm 14,21^\circ$ (IPM) y $82,87 \pm 27,59^\circ$ (MA). La muestra de la figura 2.5. c presentó un ángulo medio de fibra de $79 \pm 53,05^\circ$ (IPM) y $96 \pm 35,08^\circ$ (MA). Los histogramas de ángulo de las matrices presentadas en la figura 2.5. c-d se muestran en la figura 2.6. A pesar de

observar una diferencia de hasta 20° en el ángulo medio (Gonzalez, 2012), más marcada en la topografía aleatoria, los histogramas demuestran una buena concordancia entre las dos técnicas de caracterización de la orientación de las fibras. El software se presenta como un instrumento más veloz para medir la topografía de las matrices, manteniendo valores de ángulo coincidentes con los obtenidos de las medidas tediosas a mano.

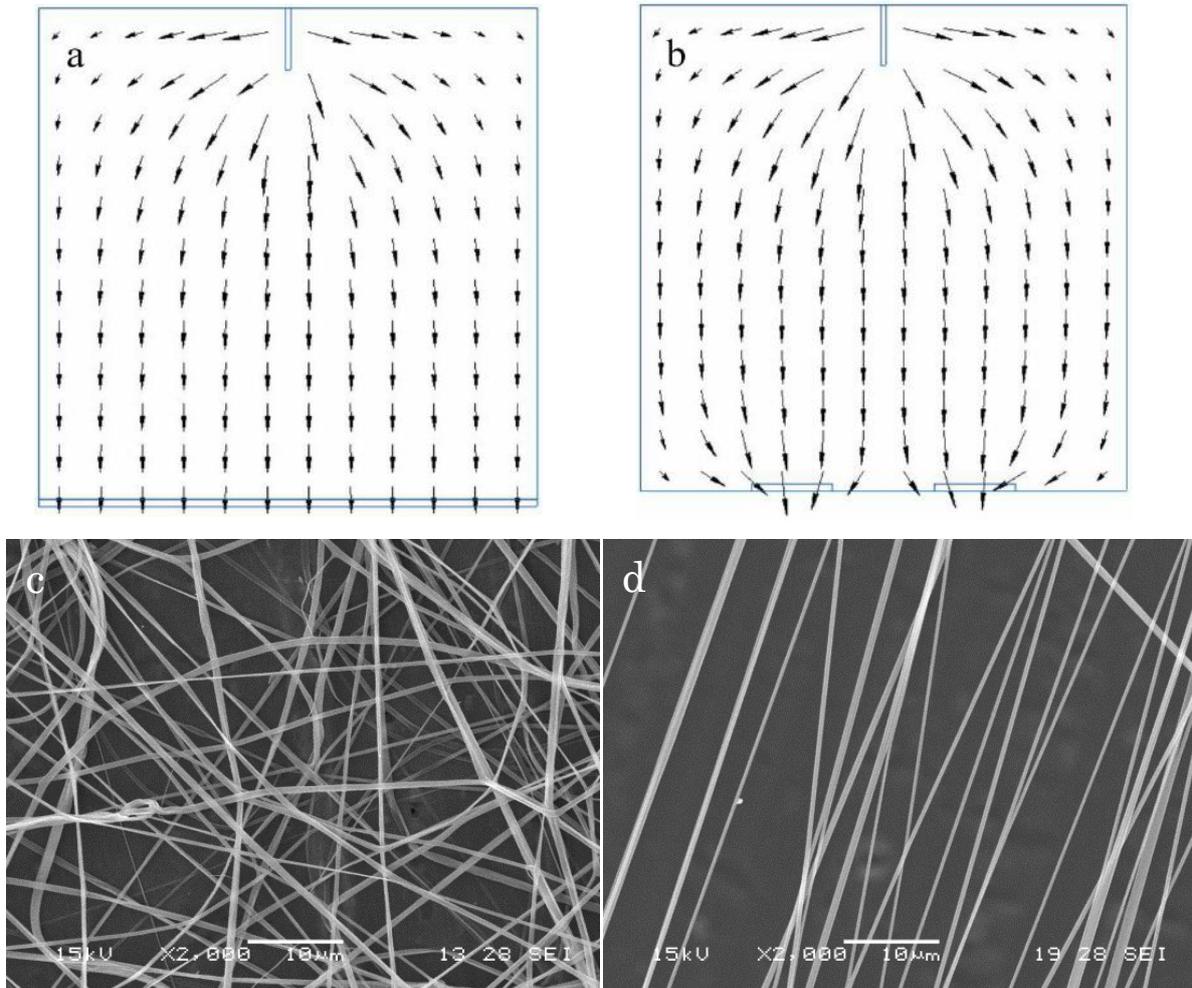


Figura 2.5. Líneas de campo eléctrico modeladas por elementos finitos para: a) placa colectora y b) colector de placas paralelas. c) Micrografías SEM de las matrices obtenidas empleando un colector plano y d) colector de placa paralelas.

El cambio de los parámetros de electrohilado para favorecer la topografía alineada no alteró el diámetro medio de las nanofibras de PLLA significativamente ($514,34 \pm 163,10$ nm) ($p < 0,05$).

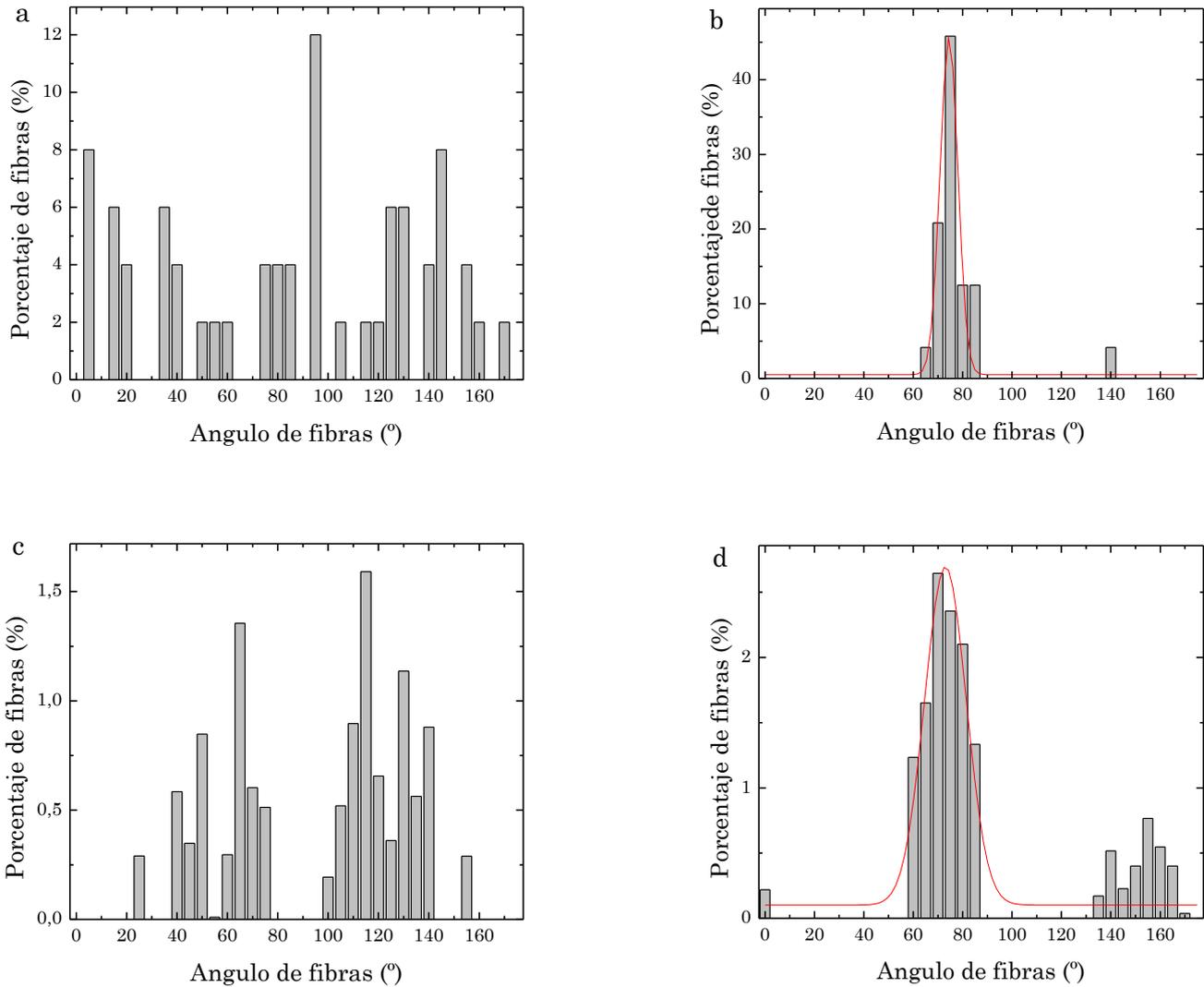


Figura 2.6. Histogramas correspondientes a las matrices aleatoria (a, c) y alineada (b, d) obtenidos por las técnicas de procesamiento de imágenes IPM (a, b); y MA (c, d).

Posteriormente, se empleó un colector rotatorio de 5 mm de diámetro en conjunto con un colector auxiliar plano o de placas paralelas para obtener estructuras tubulares con distinta topografía. Se estudió el efecto del tipo de colector auxiliar en la orientación de las nanofibras obtenidas. Se mantuvieron las condiciones de procesamiento ya estudiadas ($f = 0,5$ mL/h; $V = 13$ kV; $d = 15$ cm; $r = 1000$ rpm).

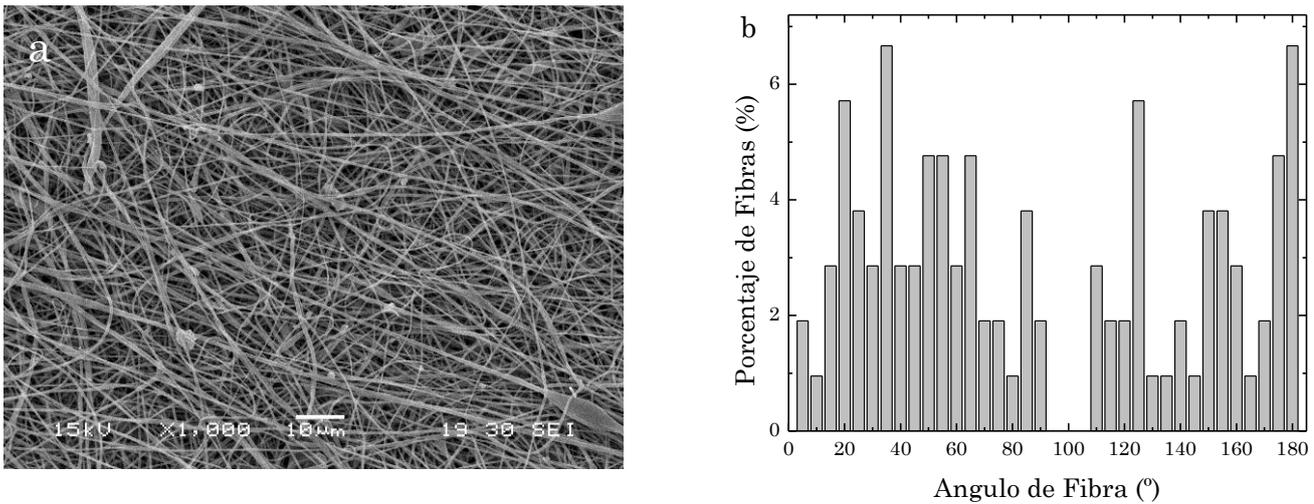


Figura 2.7. a) Micrografía SEM de la estructura nanofibrosa obtenida y b) histograma de distribución de ángulos de orientación de las nanofibras.

La morfología de las nanofibras de PLLA no se modificó al utilizar el colector rotatorio. Las tubuladuras procesadas utilizando el colector plano como auxiliar presentaron una topografía de fibras aleatorias (Figura 2.7.). Las muestras presentaron un diámetro medio de 360 ± 76 nm y un ángulo medio de $90 \pm 58^\circ$ (IPM). Los injertos obtenidos con el colector auxiliar de placas paralelas presentaron una morfología nanofibrosa uniforme, con un diámetro medio de 383 ± 103 nm. La figura 2.8. presenta la topografía de la estructura tubular y los histogramas de distribución de diámetro y de ángulos obtenidos por ambas técnicas. Los injertos presentaron un grado de alineación aceptable, como se observa en la micrografía SEM. La orientación de las fibras se midió por las técnicas de procesamiento de imágenes IPM y MA. Se obtuvieron ángulos medios de $114 \pm 26,2^\circ$ (IPM) y $109 \pm 34,2^\circ$ (MA). Debido al tamaño de la desviación estándar no se puede denominar la topografía obtenida como altamente alineada, sin embargo, la micrografía SEM revela un grado leve de orientación de las nanofibras. Ambas técnicas coinciden en determinar un alto porcentaje de fibras alrededor de 110° , el cual se corresponde con la dirección de la leve orientación presente en la figura 2.8.a. La partición del campo eléctrico permitió lograr un cierto grado

de alineación superficial en los injertos de PLLA, en acuerdo con la literatura (Wu, 2010).

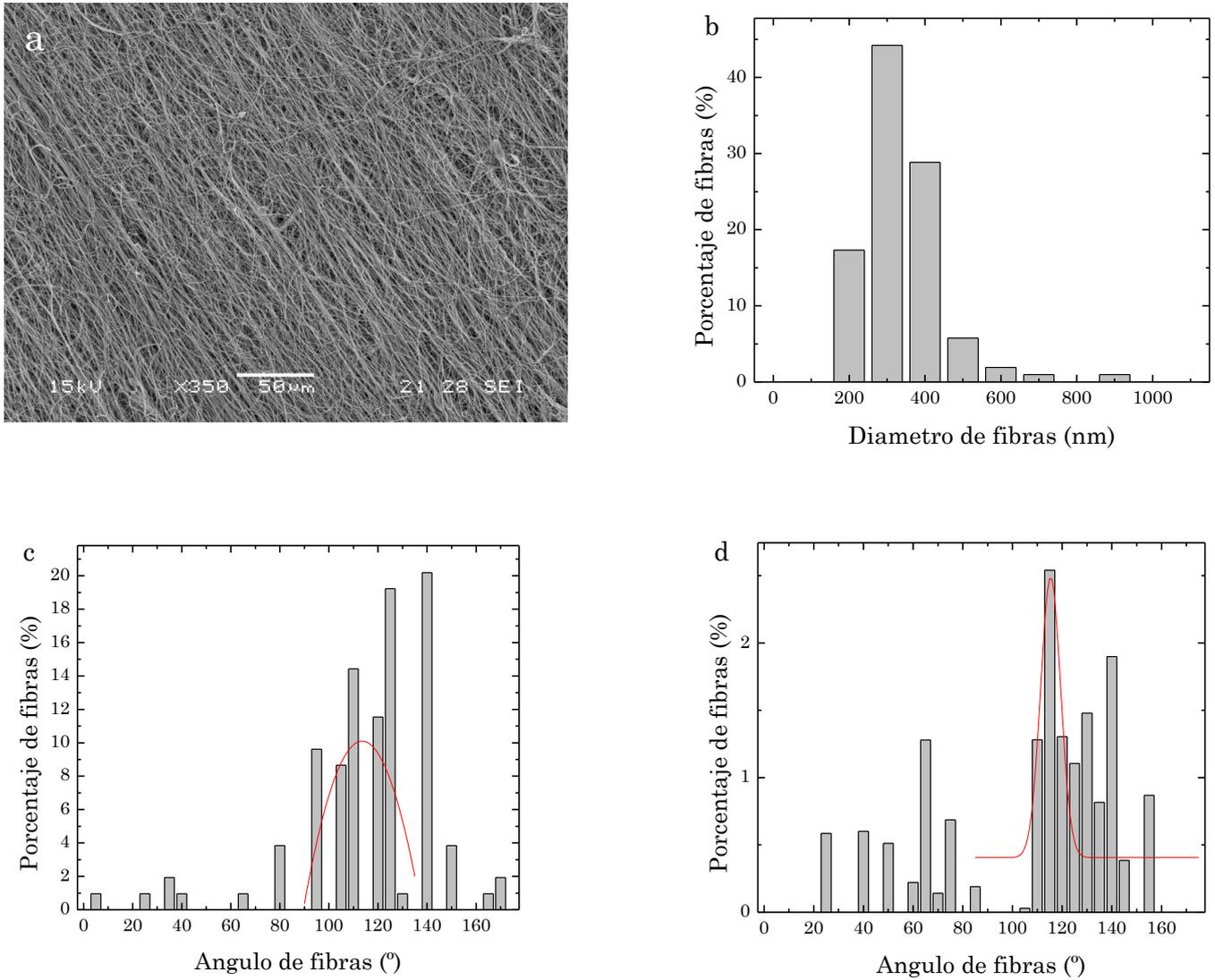


Figura 2.8. a) Micrografía SEM de la superficie de la estructura nanofibrosa tubular de PLLA, b) histograma de distribución de diámetros, y sus histogramas de distribución de ángulos medidos por c) IPM y d) MA.

2.3.2. Injertos vasculares de PHD

2.3.2.1. Optimización de propiedades intrínsecas y parámetros de procesamiento

Se obtuvieron matrices con diferentes morfologías a partir de diversas soluciones poliuretánicas. Los parámetros más significativos en el procesamiento por electrohilado fueron las propiedades de la solución, la concentración del polímero y los solventes, por lo que estas fueron las estudiadas. La tabla 2.3. resume los resultados obtenidos. En primer lugar se emplearon los solventes comúnmente usados en la preparación de soluciones de SPEU. El DMF es un buen solvente para PHD, sin embargo, su elevado punto de ebullición ($T_{eb \text{ DMF}} = 153 \text{ }^\circ\text{C}$) no favorece su completa evaporación durante el electrohilado. C.J. Luo *et al.* reportaron que la mezcla de un buen solvente y un no solvente, o de dos solventes que presentan una solubilidad parcial permite la obtención de una estructura fibrosa por electrohilado (Luo, 2010). En este trabajo se seleccionaron sistemas binarios de solventes que tienen parámetros cercanos a un buen solvente para el procesamiento por electrohilado de la solución polimérica. Los solventes que exhiben alta solubilidad del polímero no necesariamente producen soluciones apropiadas para electrohilado. Por esta razón, se eligieron el THF y el DCM como no solventes para lograr esta condición y obtener así una morfología fibrosa. Sin embargo, no se produjeron resultados satisfactorios. La viscosidad de la solución resultó elevada para una concentración de PHD por debajo del valor crítico para obtener fibras libres de gotas a partir de estas mezclas de solventes. Se obtuvo una morfología de perlas fusionadas conectadas con fibras pequeñas para estas soluciones (Figura 2.9. a-b).

Los trabajos reportados en la literatura establecen que el empleo de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) resulta apropiado para la preparación de matrices electrohiladas de polímeros altamente asociados por interacciones tipo puente de hidrógeno (Caracciolo, 2009b; Stankus,

2004; Courtney, 2006). El HFP es un solvente orgánico polar que presenta una fuerte capacidad de establecer enlaces vía puente de hidrógeno con grupos carbonilo aceptores. Esta característica le permite disolver una amplia variedad de sistemas poliméricos, incluyendo muchos que no son solubles en solventes orgánicos comunes, como por ejemplo poliamidas, poliuretanos, poli(uretano ureas), poliacetales, poliacrilonitrilos, policetonas, poliésteres, colágeno, gelatina y elastina. Las interacciones puente de hidrógeno proporcionan una alta energía cohesiva que contribuye a la presencia de un parámetro de solubilidad elevado. En consecuencia, la solubilidad de estos polímeros es posible solamente en solventes orgánicos altamente polares, tales como DMF, DMAc y HFP. La manipulación del HFP requiere mucho cuidado, ya que posee una elevada toxicidad y es considerablemente costoso. Por lo tanto, para el electrohilado de PHD, se empleó otro solvente fluorado, el trifluoroetanol (TFE). La solución con C = 20% p/v permitió la formación de una matriz con morfología de perlas y algunas fibras (Figura 2.9. c). Al incrementar la concentración del polímero a C = 25% p/v se obtuvo una morfología nanofibrosa uniforme sin presencia de perlas (Figura 2.9. d). Finalmente esta concentración se eligió para la preparación de estructuras tubulares.

Tabla 2.3. Soluciones de PHD estudiadas y su morfología resultante

Muestra	Concentración y solventes de la solución	Morfología de las fibras
1	30% p/v en DMF:THF = 50:50 v/v	Sin fibras, perlas fusionadas unidas por fibras pequeñas
2	30% p/v en DMF:THF = 40:60 v/v	Sin fibras, perlas fusionadas con fibras gruesas y partículas
3	30% p/v en DMF:THF = 60:40 v/v	Sin fibras, perlas fusionadas unidas por fibras pequeñas
4	40% p/v en DMF:THF = 60:40 v/v	Sin fibras, perlas dispersas unidas por fibras pequeñas
5	20% p/v en DMF:THF = 40:60 v/v	Sin fibras, perlas unidas por unas pocas fibras pequeñas
6	20% p/v en DMF:DCM = 40:60 v/v	Sin fibras, perlas fusionadas unidas por fibras pequeñas
7	20% p/v en DMF:DCM = 30:70 v/v	Sin fibras, perlas fusionadas unidas por fibras pequeñas
8	20% p/v en TFE	Fibras y perlas
9	25% p/v en TFE	Fibras al azar

Además, se estudió la influencia de algunos parámetros de procesamiento (f , d , V). La velocidad de infusión resultó ser el parámetro más significativo, afectando la morfología de las fibras obtenidas. Se obtuvieron fibras más uniformes para una mayor velocidad de infusión. El diámetro medio de fibra de las matrices de PHD fue 581 ± 379 nm para una solución al 25% p/v en TFE a $f = 1$ mL/h, $V = 13$ kV, y $d = 15$ cm.

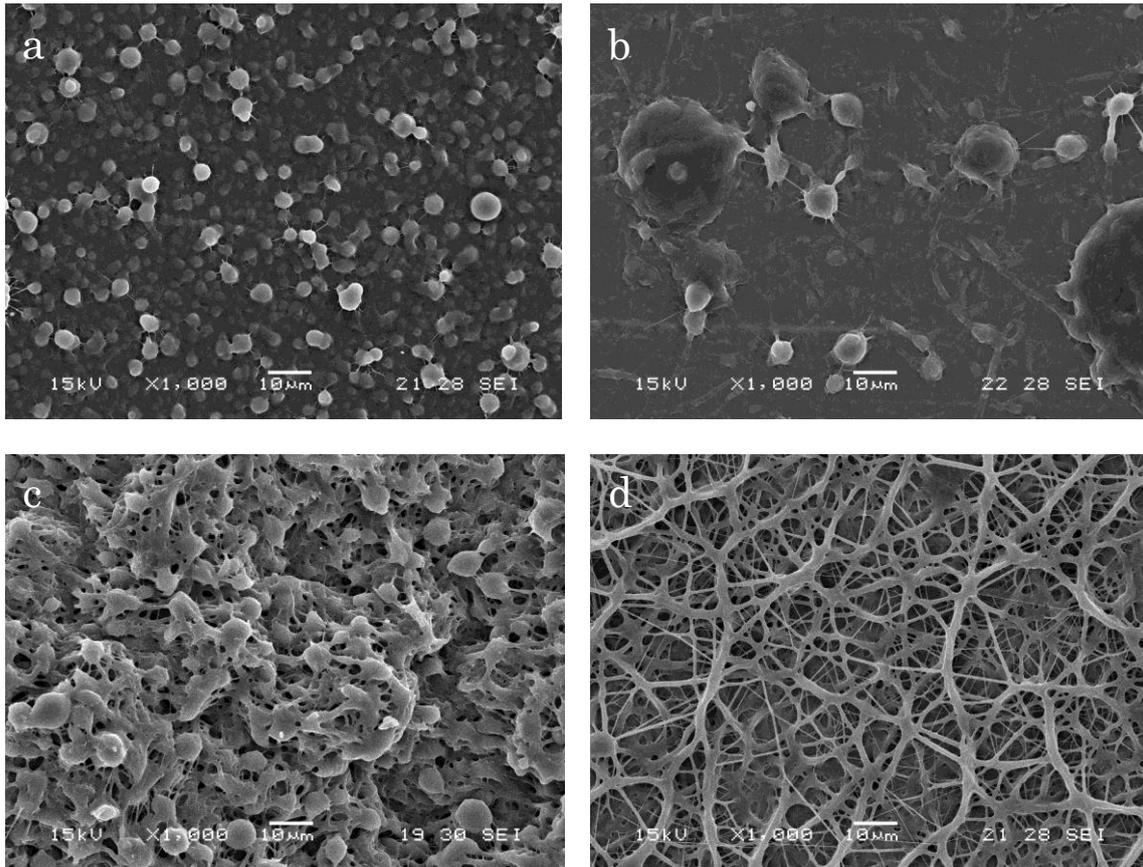


Figura 2.9. Micrografías SEM de las muestras de PHD a) 3, b) 2, c) 8 y d) 9.

2.3.2.2. Tubuladuras de pequeño diámetro

Los injertos vasculares se obtuvieron empleando un colector rotatorio con un mandril de 5 mm de diámetro. Las nanofibras de PHD se adhirieron fuertemente a la superficie del mandril colector por lo que la operación de desmolde de los injertos de PHD requirió una modificación respecto de la técnica empleada para el desmolde de los injertos de PLLA. Para evitar el contacto de PHD con el mandril metálico se depositó una capa delgada de

nanofibras electrohiladas de poli(óxido de etileno) (PEO) ($M_w = 100000 \text{ kg mol}^{-1}$) sobre el mandril antes del electrohilado de PHD. Para el electrohilado de PEO se exploraron tres soluciones: PEO 15% p/v en agua destilada, 10% p/v en etanol y 6% p/v en cloroformo. La solución en cloroformo resultó la más apropiada para electrohilar en forma uniforme la capa de nanofibras de PEO de sacrificio. La remoción del injerto del mandril se efectuó disolviendo el PEO en agua destilada durante 1 hora. La morfología nanofibrosa de PHD no se modificó con el cambio del sistema colector. Las nanofibras presentaron un diámetro medio de $687 \pm 290 \text{ nm}$ ($p < 0,05$). La figura 2.10. muestra la estructura tubular obtenida y un detalle de la pared de la misma con mayor magnificación, así como los histogramas de diámetro y ángulo de fibra. El procesamiento de PHD por electrohilado sobre un colector rotatorio produjo estructuras tubulares de 5 mm de diámetro uniformes.

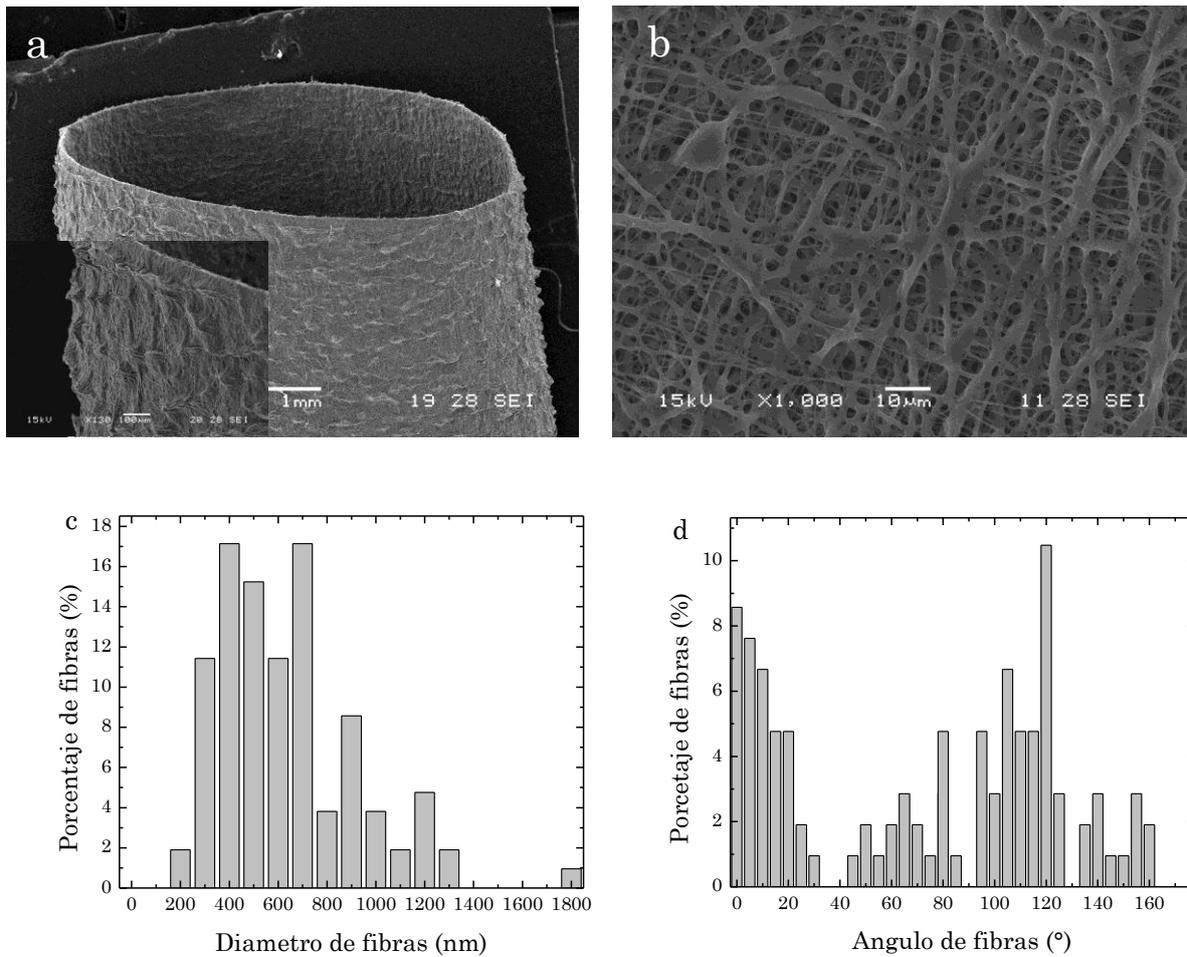


Figura 2.10. a) Micrografías SEM de un injerto vascular electrohilado de PHD y detalle de su pared, b) morfología nanofibrosa de la pared, c) histogramas del diámetro de fibra y d) ángulo de la muestra.

2.3.3. Injertos vasculares multicapa PHD/PLLA

Luego de optimizar las condiciones experimentales para la producción de nanofibras a partir de los polímeros puros, se estudiaron las mejores condiciones para el procesamiento de sus mezclas. Nuevamente, se optimizó la formación de fibras libres de gotas en colector plano. En una primera etapa se prepararon soluciones de PHD 25% p/v en TFE y PLLA 10% p/v en TFE, se tomó un porcentaje de cada solución en volumen y se mezclaron. Para la capa interna se utilizó una mezcla PLLA/PHD 50/50 v/v, mientras que para la capa externa se utilizó 90/10 v/v (Figura 2.11. a, b). Se usó una

concentración total de 17,3 p/v y 11,5 %p/v para la capa interna y externa respectivamente. Las micrografías SEM presentaron una morfología de fibras en rosario, siendo la capa externa la que presenta un mayor porcentaje de perlas. Esta morfología resulta del uso de una solución con concentración inferior al valor crítico para la formación de fibras sin perlas. Se puede inferir que la concentración crítica para la formación de fibras del PLLA en TFE es superior al 10%p/v, dado que esta última se corresponde con la concentración crítica correspondiente a la mezcla de solventes DMF/DMC. Esto concuerda con el hecho que la mezcla con mayor proporción de PLLA (capa externa) es la que presenta mayor cantidad de perlas. Se aumentó entonces la concentración total de polímeros de 11,5% p/v y 17,5% p/v a 15% p/v y 20% p/v para las capa interna y externa respectivamente, de forma de obtener una estructura nanofibrosas. Las mezclas se prepararon a partir de proporciones en peso, manteniendo la misma relación fijada anteriormente. El aumento en la concentración global produjo una morfología de nanofibras sin perlas (Figura 2.11. c, d). Este análisis confirma que la concentración del polímero en la solución y los solventes usados son las variables de electrohilado más significativas para estos sistemas poliméricos. La velocidad de infusión presentó una influencia relevante, dentro de los parámetros de procesamiento analizados. En particular, la solución de la capa externa resultó en una estructura con perlas al utilizar una mayor velocidad de flujo.

Las condiciones óptimas de electrohilado para las mezclas fueron 20% p/v PLLA/PHD 50/50 p/p electrohilada a $f = 1$ mL/h, $V = 13$ kV, y $d = 15$ cm y 15% p/v PLLA/PHD 90/10 p/p electrohilada a $f = 0,5$ mL/h, $V = 13$ kV, y $d = 15$ cm, para la capa interna y externa respectivamente. Estas condiciones produjeron nanofibras sin perlas con una distribución de tamaños unimodal y un diámetro medio de 327 ± 116 nm para la capa externa y 570 ± 162 nm para la capa interna.

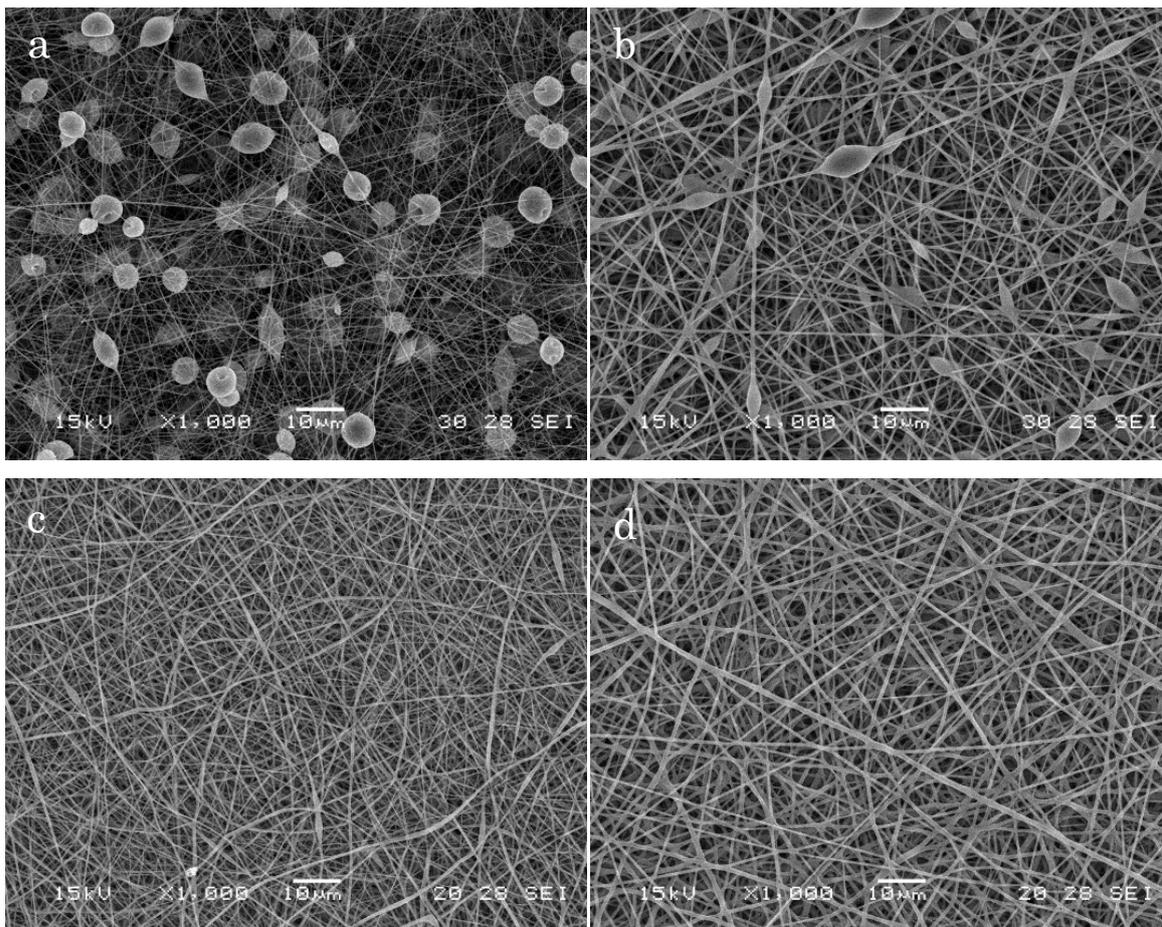


Figura 2.11. Micrografías SEM a) de la capa externa y b) la capa interna, obtenidas a partir de la mezcla basada en proporciones en volumen, y c) capa externa y d) la capa interna, obtenidas a partir de la mezcla basada en proporciones en peso.

Posteriormente se obtuvieron tubuladuras de pequeño diámetro a partir de las condiciones optimizadas en el colector plano. Las tubuladuras presentaron un diámetro medio levemente mayor ($p < 0,05$) que el observado en las matrices planas con un valor de 410 ± 124 nm y 754 ± 210 nm para la capa externa e interna respectivamente. En la figura 2.12. se presentan las micrografías de las superficies nanofibrosas de las tubuladuras obtenidas.

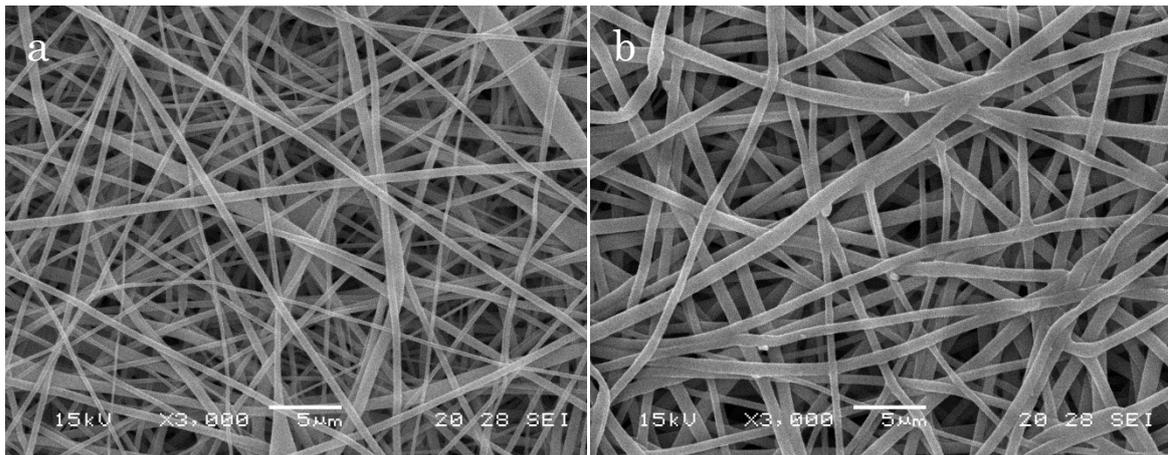


Figura 2.12. Micrografías SEM de la pared de tubuladuras electrohiladas a partir de las mezclas a) externa e b) interna.

Por último, se empleó el electrohilado secuencial para obtener un injerto vascular de pequeño diámetro bicapa. Se electrohiló la solución de la capa interna sobre el mandril rotatorio, seguida de la formación de la capa externa también por electrohilado. El injerto final presentó una separación entre las dos capas que se encuentra en entre 100 y 200 μm (Figura 2.13.). Este espacio no afecta la integridad del injerto, y favorece la obtención de una respuesta mecánica deseada como se describirá en el capítulo 4.

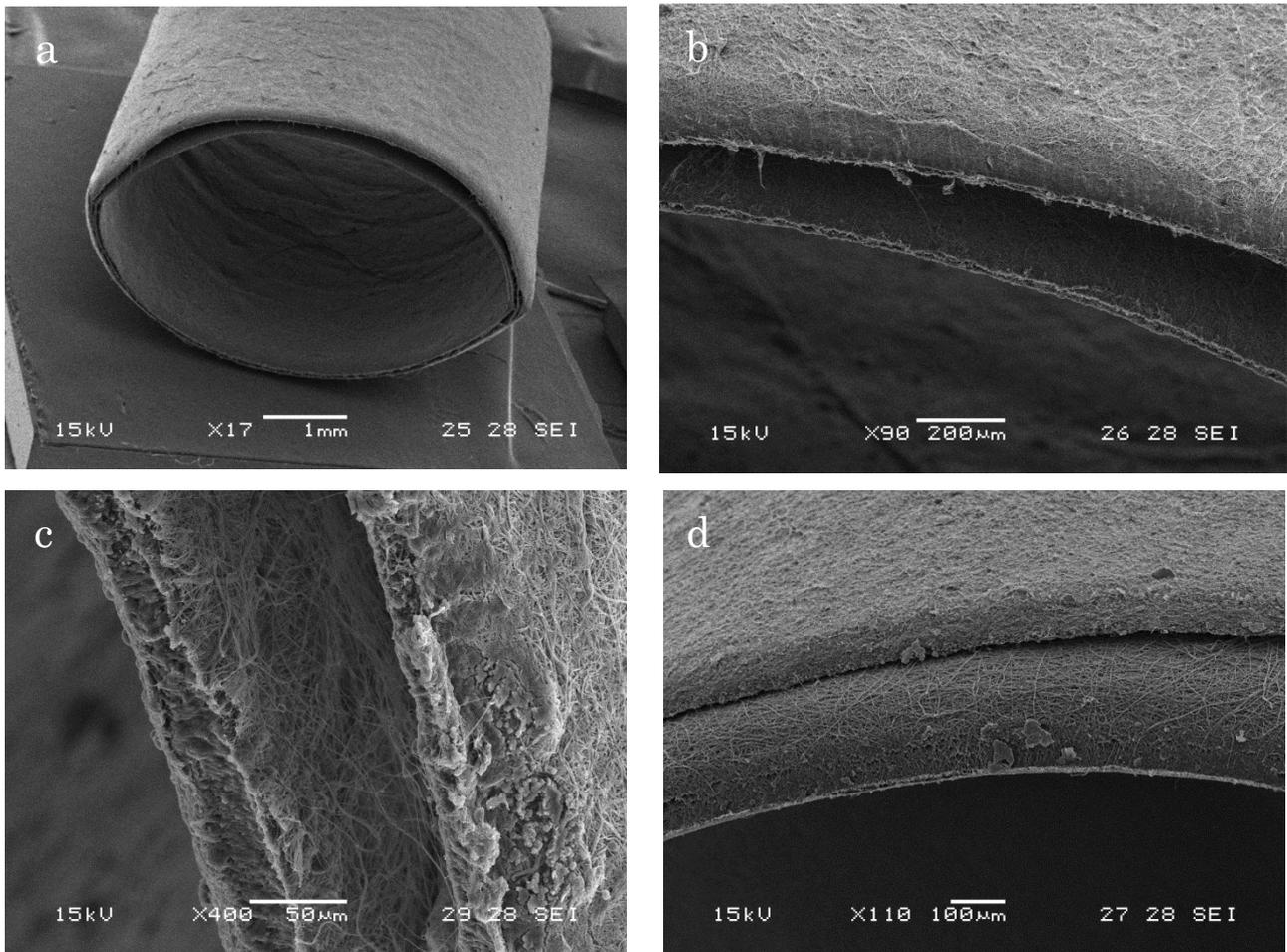


Figura 2.13. Micrografías SEM del injerto nanofibroso bicapa.

2.4. Conclusiones parciales

Los parámetros de electrohilado y propiedades intrínsecas de la solución se optimizaron para el PLLA, PHD y sus mezclas 90/10 y 50/50. Se obtuvieron nanofibras uniformes sin perlas. La topografía de las matrices se modificó mediante la separación del campo eléctrico, optimizando también las condiciones de electrohilado para el colector de placas paralelas. La topografía de las matrices resultó en fibras aleatorias o alineadas dependiendo del colector utilizado. Mediante el empleo de colector rotatorio se produjeron estructuras nanofibrosas tubulares. Se obtuvo un injerto vascular bicapa nanofibroso mediante el electrohilado secuencial de soluciones de mezclas poliméricas. Las estructuras tubulares bicapa preparadas poseen un alto interés para la ingeniería de tejidos vasculares como injertos vasculares degradables de pequeño diámetro. El estudio del

comportamiento degradativo, mecánico y biológico de los mismos se aborda en los capítulos siguientes.

2.5. Bibliografía

- Bergmeister H., Schreiber C., Grasl C., Walter I., Plasenzotti R., Stoiber M., Bernhard D., Schima H., 2013. Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities, *Acta Biomaterialia*, 9: 6032-6040.
- Caracciolo P.C., Buffa F., Abraham G.A., 2009a. Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes), *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20: 145-155.
- Caracciolo P.C., Thomas V., Vohra Y.K., Buffa F., Abraham G.A., 2009b. Electrospinning of novel biodegradable poly(ester urethane)s and poly(ester urethane urea)s for soft tissue-engineering applications, *Journal of Material Science: Material in Medicine*, 20: 2129-2137.
- Cha Y., Pitt C.G., 1990. The biodegradability of polyester blends, *Biomaterials*, 11: 108-112.
- Courtney T., Sacks M.S., Stankus J., Guan J., Wagner W.R., 2006. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy, *Biomaterials*, 27: 3631-3638.
- Crapo P.M., Wang Y., 2010. Physiologic compliance in engineered small-diameter arterial constructs based on an elastomeric substrate, *Biomaterials*, 31: 1626-1635
- de Valence S., Tille J.-C., Giliberto J.-P., Mrowczynski W., Gurny R., Walpoth B.H., Möller M., 2012. Advantages of bilayered vascular grafts for surgical applicability and tissue regeneration, *Acta Biomaterialia*, 8: 3914-3920.
- Drilling S., Gaumer J., Lannutti J., 2009. Fabrication of burst pressure competent vascular grafts via electrospinning: Effects of microstructure, *Journal of Biomedical Materials Research*, 88A: 923-934.

- Fisher G.M., Llauro J.G., 1966. Collagen and elastin content in canine arteries selected from functionally different vascular beds, *Circulation Research*, 19: 394-399.
- Gao J., Crapo P., Nerem R., Wang Y., 2008. Co-expression of elastin and collagen leads to highly compliant engineered blood vessels, *Journal of Biomedical Materials Research*, 85A:1120-1128.
 - Ghezzi C.E., Marelli B., Muja N., Nazhat S.N., 2012. Immediate production of a tubular dense collagen construct with bioinspired mechanical properties, *Acta Biomaterialia*, 8: 1813-1825.
 - Gonzalez M.A., Montini Ballarin F., Brun M., Abraham G., Ballarin V.L., 2012. Morphological quantification of polymer nanofibers in tissue engineering images, *Latin American Applied Research*, 42: 89-95.
 - Grasl C., Bergmeister H., Stoiber M., Schima H., Weigel G., 2010. Electrospun polyurethane vascular grafts: In vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression, *Journal of Biomedical Materials Research*, 93A: 716-723.
 - Han J., Cao R.-W., Chen B., Ye L., Zhang A.-Y., Zhang J., Feng Z.-G., 2011. Electrospinning and biocompatibility evaluation of biodegradable polyurethanes based on L-lysine diisocyanate and L-lysine chain extender, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A: 705-714.
 - Han F., Jia X., Dai D., Yang X., Zhao J., Zhao Y., Fan Y., Yuan X., 2013a. Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF, *Biomaterials*, 34: 7302-7313.
 - Han J., Farah S., Domb A.J., Lelkes P.I., 2013b. Electrospun Rapamycin-Eluting Polyurethane Fibers for Vascular Grafts, *Pharmaceutical Research*, 30: 1735-1748.
 - Hasan A., Memic A., Annabi N., Hossain M., Paul A., Dokmeci M.R., Dehghani F., Khademhosseini A., 2014. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, 10: 11-25.

- He W., Ma Z., Teo W.E., Dong Y.X., Robless P.A., Lim T.C., Ramakrishna S., 2009. Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts, *Journal of Biomedical Materials Research*, 90A: 205-216.
- He W., Hu Z., Xu A., Liu R., Yin H., Wang J., Wang S., 2013. The Preparation and Performance of a New Polyurethane Vascular Prosthesis, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66: 855-866.
 - Hiljanen-Vainio M., Varpomaa P., Seppala J., Tormala P., 1996. Modification of poly(L-lactides) by blending: mechanical and hydrolytic behavior, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 197: 1503-1523.
 - How T.V., Annis D., 1961. Viscoelastic behavior of polyurethane vascular prostheses, *Journal of Physiology*, 156: 458-469.
 - Huang C., Wang S., Qiu L., Ke Q., Zhai W., Mo X., 2013. Heparin Loading and Pre-endothelialization in Enhancing the Patency Rate of Electrospun Small-Diameter Vascular Grafts in a Canine Model, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5: 2220-2226.
 - Inoguchi H., Kwon I.K., Inoue E., Takamizawa K., Maehara Y., Matsuda T., 2006. Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co-e-caprolactone) small-diameter vascular graft, *Biomaterials*, 27: 1470-1478.
 - Inoguchi H., Tanaka T., Maehara Y., Matsuda T., 2007. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft, *Biomaterials*, 28: 486-495.
 - Jia L., Prabhakaran M.P., Qin X., Ramakrishna S., 2013. Stem cell differentiation on electrospun nanofibrous substrates for vascular tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 33: 4640-4650.
 - Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T., 2005. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, *Biomaterials*, 26: 37-46.

- Lee S.J., Yoo J.J., Lim G.J., Atala A., Stitzel J., 2007. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application, *Journal of Biomedical Materials Research*, 83A: 999-1008.
- Lee S.J., Liu J., Oh S.H., Soker S., Atala A., Yoo J.J., 2008. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions, *Biomaterials*, 29: 2891-2898.
 - Li M., Mondrinos M.J., Gandhi M.R., Ko F.K., Weiss A.S., Lelkes P.I., 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials*, 26: 5999-6008.
 - Liu S., Dong C., Lu G., Lu Q., Li Z., Kaplan D.L., Zhu H., 2013. Bilayered vascular grafts based on silk proteins, *Acta Biomaterialia*, 9: 8991-9003.
- Lu G., Cui S.-J., Geng X., Ye L., Chen B., Feng Z.-G., Zhang J., Li Z.-Z., 2013. Design and preparation of polyurethane-collagen/heparin-conjugated polycaprolactone double-layer bionic small-diameter vascular graft and its preliminary animal tests, *Chinese Medical Journal*, 126: 1310-1316.
- Luo C.J., Nangrejo M., Edirisinghe M., 2010. A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning, *Polymer*, 51: 1654-1662.
 - Marelli B., Alessandrino A., Farè S., Freddi G., Mantovani D., Tanzi M.C., 2010. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting, *Acta Biomaterialia*, 6: 4019-4026.
 - Matsuda T., Ihara M., Inoguchi H., Kwon I.K., Takamizawa K., Kidoaki S., 2005. Mechano-active scaffold design of small-diameter artificial graft made of electrospun segmented polyurethane fabrics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 73A: 125-131.
 - McClure M.J., Sell S.A., Simpson D.G., Walpoth B.H., Bowlin G.L., 2010. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study, *Acta Biomaterialia*, 6: 2422-2433.

- McClure M.J., Simpson D.G., Bowlin G.L., 2012. Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10: 48-61.
- McKenna K.A., Hinds M.T., Sarao R.C., Wu P.-C., Maslen C.L., Glanville R.W., Babcock D., Gregory K.W., 2012. Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials, *Acta Biomaterialia*, 8: 225-233.
 - Miyazu K., Kawahara D., Ohtake H., Watanabe G., Matsuda T., 2010. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at in situ capture of endothelial progenitor cell, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94B: 53-63.
 - Mugnai D., Tille J.-C., Mrówczyński W., de Valence S., Montet X., Möller M., Walpoth B.H., 2013. Experimental noninferiority trial of synthetic small-caliber biodegradable versus stable vascular grafts, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 146: 400-407.
 - Nieponice A., Soletti L., Guan J., Deasy B.M., Huard J., Wagner W.R., Vorp D.A., 2008. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique, *Biomaterials*, 29: 825-833.
 - Nottelet B., Pektok E., Mandracchia D., Tille J.-C., Walpoth B., Gurny R., Möller M., 2009. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ϵ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts, *Journal of Biomedical Materials Research*, 89A: 865-875.
 - Punnakitikashem P., Truong D., Menon J.U., Nguyen K.T., Hong Y., 2014. Electrospun biodegradable elastic polyurethane scaffolds with dipyridamole release for small diameter vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, 10: 4618-4628.
 - Rapoport H.S., Fish J., Basu J., Campbell J., Genheimer C., Payne R., Jain D., 2012. Construction of a tubular scaffold that mimics J-Shaped

stress/strain mechanics using an innovative electrospinning technique, *Tissue Engineering: Part C*, 18: 567-574.

- Rhodin J.A.G., 2014. Architecture of the Vessel Wall in *Comprehensive Physiology, Supplement 7: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Vascular Smooth Muscle*: 1-31. First published in print 1980. doi: 10.1002/cphy.cp020201.
- Sell S.A., Wolfe P.S., Garg K., McCool J.M., Rodriguez I.A., Bowlin G.L., 2010. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues, *Polymers*, 2: 522-553.
- Soletti L., Hong Y., Guan J., Stankus J.J., El-Kurdi M.S., Wagner W.R., Vorp D.A., 2010. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, 6: 110-122.
- Stankus J.J., Guan J., Wagner W.R., 2004. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 70: 603-614.
- Stitzel J., Liua J., Lee S.J., Komura M., Berry J., Soker S., Lim G., Van Dyke M., Czerw R., Yoo J.J., Atala A., 2006. Controlled fabrication of a biological vascular substitute, *Biomaterials*, 27: 1088-1094.
- Thomas V., Zhang X., Catledge S.A., Vohra Y.K., 2007. Functionally graded electrospun scaffolds with tunable mechanical properties for vascular tissue regeneration, *Biomedical Materials*, 2: 224-232.
- Tillman B.W., Yazdani S.K., Lee S.J., Geary R.L., Atala A., Yoo J.J., 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction, *Biomaterials*, 30: 583-588.
- Vindigni V., Abatangelo G., Bassetto F., 2011. New developments in tissue engineering microvascular prostheses in: *Biomaterials Science and Engineering*, Pignatello R. (Editor), Intech, Croatia, pp. 423–436.
- Wang H., Feng Y., An B., Zhang W., Sun M., Fang Z., Yuan W., Khan M., 2012. Fabrication of PU/PEGMA crosslinked hybrid scaffolds by in situ UV photopolymerization favoring human endothelial cells growth

- for vascular tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23: 1499-1510.
- Wang H., Feng Y., Fang Z., Yuan W., Khan M., 2012b. Co-electrospun blends of PU and PEG as potential biocompatible scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 32: 2306-2315.
 - Wang S., Mo X.M., Jiang B.J., Gao C.J., Wang H.S., Zhuang Y.G., Qiu L.J., 2013. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency, *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2131-2139.
 - Williamson M.R., Black R., Kielty C., 2006. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: Attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells, *Biomaterials*, 27: 3608-3616.
 - Wise S.G., Byrom M.J., Waterhouse A., Bannon P.G., Ng M.K.C., Weiss A.S., 2011. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties, *Acta Biomaterialia*, 7: 295-303.
 - Wu H., Fan J., Chu C.-C., Wu J., 2010. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 3207-3215.
 - Yin A., Zhang K., McClure M.J., Huang C., Wu J., Fang J., Mo X., Bowlin G.L., Al-Deyab S.S., El-Newehy M., 2013. Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co-e-caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A: 1292-1301.
 - Yu J., Wang A., Tang Z., Henry J., Lee B.L.-P., Zhu Y., Yuan F., Huang F., Li S., 2012. The effect of stromal cell-derived factor-1 α /heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration, *Biomaterials*, 33: 8062-8074.

Zhang X., Thomas V., Vohra Y.K., 2010. Two ply tubular scaffolds comprised of proteins/poliglecaprone/polycaprolactone fibers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 541-549.

- Zhang X., Thomas V., Xu Y., Bellis S.L., Vohra Y.K., 2010b. An in vitro regenerated functional human endothelium on a nanofibrous electrospun scaffold, *Biomaterials*, 31: 4376-4381.
- Zhang X., Xu Y., Thomas V., Bellis S.L., Vohra Y.K., 2011. Engineering an antiplatelet adhesion layer on an electrospun scaffold using porcine endothelial progenitor cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97A: 145.151.

Capítulo 3

**Caracterización y estudio del comportamiento
degradativo *in vitro* de injertos vasculares
electrohilados**

3.1. Introducción

Las matrices extracelulares artificiales, como se mencionó en el capítulo 1, deben ser biorreabsorbibles, es decir cumplen una función temporal, permitiendo a las células la producción de su propia matriz extracelular. La velocidad de degradación y la evolución de las propiedades de los materiales durante su degradación son de crucial importancia en la ingeniería de tejidos, ya que influyen el comportamiento celular, el crecimiento de tejido, la homeostasis del medio local y el microambiente biomecánico. Idealmente la velocidad de degradación del implante debe sincronizarse con la velocidad de regeneración del tejido, es decir acompañar el proceso de crecimiento de tejidos.

El proceso de degradación de poliésteres alifáticos ocurre mediante una reacción hidrolítica que se produce cuando el agua ataca las uniones éster en las cadenas poliméricas, disminuyendo la longitud promedio de las macromoléculas (Figura 3.1.). El mecanismo de degradación hidrolítica de los poliésteres puede dividirse en tres etapas. En la primera etapa la degradación comienza en las regiones amorfas del material, donde los segmentos macromoleculares son más flexibles y fácilmente atacables por el agua. La escisión de las cadenas aumenta la movilidad de las cadenas no ordenadas, lo cual induce su cristalización, formando usualmente lamelas cristalinas defectuosas de tamaños menores. En la segunda etapa, se produce un aumento de la velocidad de degradación debido a la formación de oligómeros que quedan atrapados en el interior de la muestra dado que poseen un peso molecular relativo elevado que dificulta su difusión a través de la misma. En consecuencia, los grupos ácidos terminales presentes disminuyen el pH a nivel local produciendo una reacción de degradación autocatalizada. Las regiones amorfas desaparecen más rápido que las cristalinas, resultando en muestras fragmentadas con muy alta cristalinidad. En este punto la muestra degradada incrementa su hidrofiliidad con respecto a la muestra sin degradar. Por último, en la etapa final comienza la degradación de las regiones cristalinas del material,

las cuales son menos susceptibles al ataque debido a su estructura ordenada (Zong, 2003; Kima, 2003; Araque-Monrós, 2013).

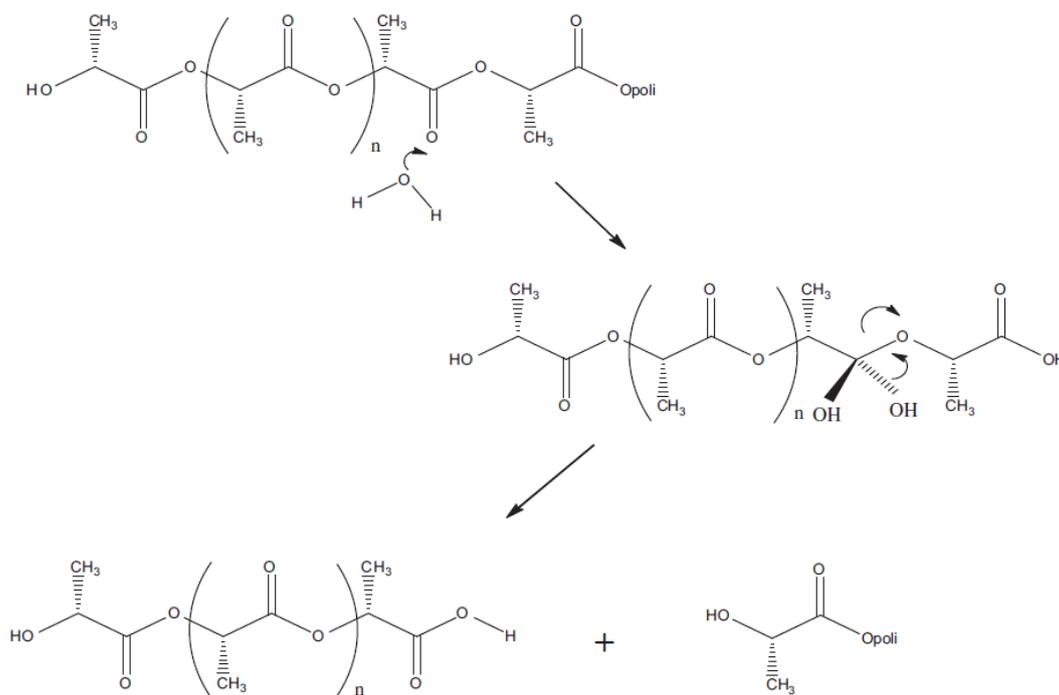


Figura 3.1. Esquema del mecanismo de escisión hidrolítica de cadenas de PLA (Dias, 2012).

Por otra parte, los poliuretanos biorreabsorbibles pueden diseñarse con una composición y estructura molecular tal que permitan modular los procesos de degradación hidrolítica y la velocidad con que ocurren las reacciones de hidrólisis (Santerre, 2005). Los SPUs, tal como se describieron en el capítulo 1, sección 1.2., son copolímeros en bloque. Los segmentos blandos usualmente se emplean para introducir enlaces químicos susceptibles a degradación y de este modo modifican la velocidad de degradación del material. Se han sintetizado poliuretanos biorreabsorbibles a partir de una variedad de segmentos blandos, que incluyen poliésteres como PLA, PGA y PCL, sus copolímeros, policarbonatos, polihidroxialcanoatos, poliéteres como el PEO, y copolímeros poliéster-poliéter, entre muchos otros. Los segmentos duros normalmente pueden degradarse mediante mecanismos enzimáticos. Los mecanismos de degradación hidrolítica, en consecuencia, dependen de la composición de los

segmentos blandos y duros. Sin embargo, hay ciertos mecanismos comunes a la mayoría de los poliuretanos biorreabsorbibles. Las uniones éster se hidrolizan produciendo oligómeros de α -hidroxiácidos como productos de degradación, así como también fragmentos conteniendo uretano o urea con grupos terminales ácidos. La composición del poliéster y/o poliol del polímero ha mostrado controlar la velocidad de degradación *in vitro*. Se ha observado que los poliuretanos elastoméricos con segmentos blandos amorfos se degradan más rápido que los polímeros con segmentos blandos semicristalinos. Dependiendo del diisocianato usado la degradación adicional de fragmentos urea y uretanos a poliamidas libres puede tener lugar con diferente cinética. La hidrólisis del grupo éster en los ésteres de diisocianato de lisina produce grupos ácidos carboxílicos en el polímero, los cuales catalizan la degradación más aún (Guelcher, 2008). La figura 3.2. ilustra los mecanismos posibles para el poli(éster uretano) segmentado utilizado (PHD).

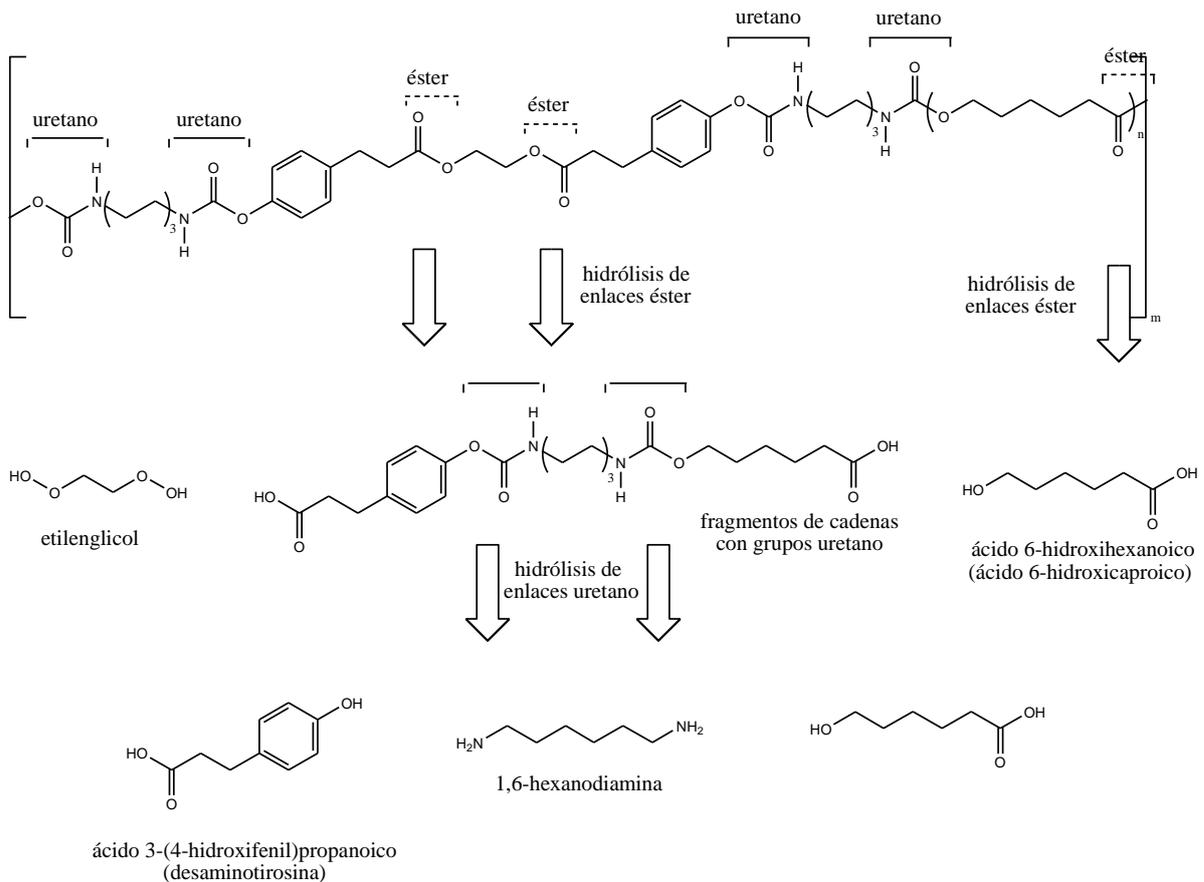


Figura 3.2. Esquema del mecanismo de degradación hidrolítica propuesto para PHD (adaptada de Guelcher, 2008).

La velocidad de degradación de los polímeros depende de varios parámetros que están íntimamente relacionados con los mecanismos de degradación descriptos. En primer lugar, el peso molecular del polímero y polidispersidad. Es evidente que un polímero con menor peso molecular tendrá una degradación más rápida. Más aún, en el caso de polímeros de naturaleza hidrofóbica, éstos suelen presentar comportamientos más hidrofílicos cuando poseen un peso molecular bajo, y por lo tanto degradan más rápido. El grado de cristalinidad, la morfología y orientación de los cristales también influyen en la velocidad de degradación hidrolítica (Ginde, 1987; Mochizuki, 1997; Chu, 1981). Se ha demostrado que la degradación comienza a través de las regiones amorfas del polímero, debido a la mayor movilidad y menor ordenamiento de estas cadenas. En consecuencia, una menor cristalinidad acelera el proceso degradativo. A su vez, teniendo en

cuenta que las regiones cristalinas también sufren degradación hidrolítica, aunque en último lugar, la presencia de cristales pequeños y defectuosos acelera la velocidad de degradación frente a cristales de mayor tamaño y con gran orden. La temperatura de transición vítrea (T_g) también afecta la degradación. Si la T_g se encuentra por debajo de la temperatura de degradación *in vitro*, o incluso próxima, las cadenas poliméricas de la región amorfa poseen una mayor movilidad, lo cual facilita la difusión de agua y el ataque químico. Por el contrario, para polímeros con T_g superior a la temperatura del ensayo, la movilidad de las cadenas es menor y la velocidad de degradación resulta más lenta. Además, la morfología y configuración de las matrices afectan la degradación hidrolítica. Se ha reportado que en los materiales porosos o filmes de espesor delgado, la degradación es más lenta que en los de gran espesor. Esto se debe a la ausencia de productos de degradación con terminales ácidas, que inducen un efecto autocatalítico en muestras de gran espesor, debido a la mayor difusión de los mismos fuera de la muestra. Sin embargo, la velocidad de degradación de un nano-objeto, que consiste en unas pocas cadenas poliméricas, debería ser muy rápida. Se produce, por lo tanto, en el caso de materiales nanoestructurados, una competencia entre estos dos efectos (Dias, 2012; Gaona, 2012). El medio en donde la degradación ocurre también afecta la cinética de degradación, en particular parámetros como la resistencia iónica, el pH, la temperatura y la capacidad reguladora del medio (Schmitt, 1994).

La velocidad de degradación de un polímero puede modificarse ajustando los parámetros descriptos, así como también mediante la mezcla con polímeros de distinta velocidad de degradación. En el estudio de los parámetros que influyen en la velocidad de degradación, además se debe tener en cuenta la composición, la microestructura de las fases presentes, y la miscibilidad y compatibilidad de los componentes. En casos de existir incompatibilidad en las mezclas, la velocidad de escisión hidrolítica de cadenas de cada componente se afecta significativamente por la presencia de un segundo polímero. La degradación de mezclas de polímeros, mayormente poliésteres con distintas velocidades de degradación e igual mecanismo,

permite modificar la velocidad del sistema (Cha, 1990; Hiljanen-Vainio 1996). La copolimerización de poliuretanos biodegradables de la misma familia también suele emplearse con el mismo fin (Lendlein, 2001). Sin embargo, teniendo en cuenta las propiedades necesarias de una matriz porosa para ingeniería de tejidos, en muchos casos la mezcla se produce con la finalidad de ajustar otra propiedad. En consecuencia, se produce una modificación en la cinética de degradación como resultado de mejorar otra propiedad de la matriz, como por ejemplo su comportamiento mecánico. Para nuestro conocimiento, no se ha estudiado el comportamiento degradativo de mezclas de poliésteres y poli(éster uretanos).

En el presente capítulo se presenta la caracterización de los injertos vasculares electrohilados, y se estudia el comportamiento degradativo *in vitro* de estructuras nanofibras de PLLA, PHD y las mezclas de ambos utilizadas para conformar las capas de los injertos obtenidos por electrohilado secuencial.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

Se utilizaron tubuladuras nanofibras de PLLA, PHD, y sus mezclas, denominadas capa interna y externa, obtenidas mediante la técnica de electrohilado con las condiciones detalladas en el capítulo 2, sección 2.2.2.3.

3.2.2. Ensayo degradativo *in vitro*

El estudio de la degradación hidrolítica de los injertos electrohilados de PLLA, PHD y sus mezclas (PLLA/PHD 50/50 y 90/10) se efectuó *in vitro* durante 34 semanas. Se decidió efectuar el seguimiento de la degradación durante 6 meses, y se reservó una muestra para su análisis a un tiempo posterior dependiendo del avance observado a las 24 semanas. Finalmente, ésta se caracterizó a las 34 semanas. Para el ensayo se emplearon muestras

de los injertos de aproximadamente 10 mg y se colocaron en viales de 5 ml de volumen. Los viales se llenaron con solución reguladora de fosfato (PBS) de pH 7,4, preparada a partir de NaCl 0,137 mol l⁻¹, KCl 0.0027 mol l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,01 mol l⁻¹, KH₂PO₄ 0,0018 mol l⁻¹ y NaN₃ 0,05% p/v. Las muestras se mantuvieron en una estufa incubadora a 37° ± 1°C y se extrajeron a las 1, 2, 3, 5, 8, 16, 24 y 34 semanas de ensayo. El pH se midió en cada extracción y se verificó que se mantuviera entre 7,4 ± 0,5. Las muestras degradadas se caracterizaron por GPC, DSC, CA y SEM (solo a 1, 16 y 34 semanas), técnicas que se describen en las siguientes secciones.

3.2.3. Caracterización fisicoquímica

3.2.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

La composición se estudió mediante espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) empleando reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente usando el equipo Nicolet 6700 (Nicolet Instruments Inc., WI, USA). Los espectros de FTIR se obtuvieron en el intervalo 450-4000 cm⁻¹, efectuando 64 barridos con una resolución de 2 cm⁻¹.

3.2.3.2. Cromatografía de permeación de geles (GPC)

Los pesos moleculares promedio (M_w , M_n), su distribución y la polidispersidad (IP) del PLLA, PHD y las capas interna y externa de estructuras tubulares nanofibrosas se determinaron mediante cromatografía de permeación de geles (GPC). Se utilizó un equipo de Waters (Waters: Special Solvents (DMA) Empower Software), con un detector de índice-refractivo (RI) (2414 Waters), equipado con tres columnas en serie (Polymer Standards Services GPC: 1 X GRAM Analytical 30 Å, 10 µm and 2 x GRAM Analytical 1000 Å, 10 µm) a 35 °C. Se utilizaron estándares de poli(metil

metacrilato) (PMMA) para la calibración y DMAc con LiBr (0,42 g/mL) como solvente de elución, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, una concentración de 2,5 mg/ml y un volumen total de 100 μ l.

3.2.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La caracterización de las matrices electrohiladas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevó a cabo con un equipo Perkin-Elmer Pyris 1 (Perkin-Elmer, USA), a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde -60 a 200 °C bajo atmosfera de nitrógeno. Se evaluaron las temperaturas de transición vítrea (T_g), de cristalización (T_c), y fusión (T_m), las entalpías de cristalización (ΔH_c) y fusión (ΔH_m), el porcentaje de cristalinidad (X_c) y los posibles cambios en estos eventos térmicos debido al procesamiento.

3.2.3.4. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se midió con un goniómetro (ramé-hart Co; USA.) empleando gotas de agua destilada (5 μ L) sobre matrices secas. Se efectuaron 15 medidas en 300 segundos, luego de 1 minuto de espera para estabilizar la gota. Los resultados se analizaron utilizando el software de ramé-hart.

3.2.4. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica de las estructuras tubulares de PLLA, PHD y las mezclas de PLLA/PHD (capas interna y externa) a 0 (resultados mostrados en las secciones 2.3.1.2., 2.3.2.2. y 2.3.3., respectivamente), 1, 16 y 34 semanas de degradación hidrolítica se realizó a partir de imágenes SEM, obtenidas empleando un microscopio y las condiciones descriptas en la sección 2.2.3.1.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterización de los injertos de PLLA, PHD y sus mezclas sin degradar

3.3.1.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

La composición de la superficie de las estructuras tubulares de PLLA, PHD y sus mezclas se analizó por FTIR empleando la técnica ATR para examinar la muestra directamente en estado sólido sin ninguna preparación adicional. (Figura 3.3.). Las bandas características del PLLA se pueden observar en la figura 3.3. d) (metilo, éster carbonilo, y metino). En el caso del PHD, se observó la presencia de los grupos uretano en la señal a 3368 cm^{-1} (banda N-H) y como un hombro a $1680\text{-}1686\text{ cm}^{-1}$ (banda carboniluretano amida I). Estos grupos uretano conectan los segmentos duros con los blandos. Los espectros de las mezclas (Figura 3.3. a, b) muestran, como era de esperar, la presencia de ambos polímeros. La capa externa (PLLA/PHD 90/10) presentó las bandas comunes a ambos polímeros, siendo más intensas las del PLLA. El extremo derecho más ancho de la banda a 1686 cm^{-1} , así como la banda débil de metileno a 2865 cm^{-1} , ambos ausentes en el PLLA, se asociaron a la presencia del PHD. El espectro de la capa interna (PLLA/PHD 50/50) muestra con más claridad las bandas características de los dos polímeros. Se observaron la banda N-H a 3368 cm^{-1} , en conjunto con las bandas más pronunciadas a 1686 cm^{-1} y 2865 cm^{-1} , características del PHD. Además, se observaron las dos bandas del éster carbonilo (para el PLLA y PHD).

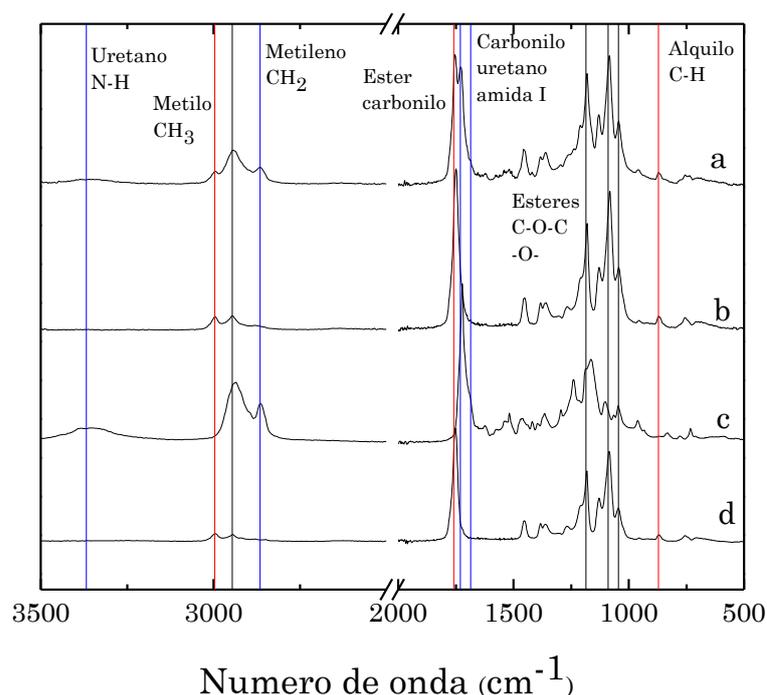


Figura 3.3. Espectro ATR-FTIR para la a) capa interna, b) externa, c) PHD, y d) PLLA.

3.3.1.2. Cromatografía de permeación de geles (GPC)

La tabla 3.1. presenta los M_n s y M_w s e IPs (M_w/M_n) de los injertos electrohilados de PLLA, PHD y sus mezclas obtenidos por GPC.

Tabla 3.1. M_n , M_w e IP de los injertos electrohilados de PLLA, PHD y sus mezclas.

Muestra	M_n (kg mol ⁻¹)	M_w (kg mol ⁻¹)	IP
PLLA	78,02	129,91	1,67
PHD	25,16	58,47	2,32
Externa	54,60	108,09	1,98
Interna	30,56	74,89	2,45

El PLLA presentó el peso molecular mayor con un valor de $M_n = 78,02$ kg mol⁻¹, mientras que el M_n del PHD fue de 25,16 kg mol⁻¹. Para el caso de las mezclas, los picos de elución de ambos polímeros se encontraban solapados y, por lo tanto, no es posible su deconvolución e identificación

individual. En consecuencia se analizó el pico que representa la señal completa de PLLA y PHD. Estos valores fueron intermedios a los del PLLA y PHD.

3.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de las muestras electrohiladas se estudiaron por DSC. La figura 3.4. muestra los termogramas obtenidos, y permiten efectuar un análisis de dos efectos: la influencia del procesamiento por electrohilado y la influencia de mezclar los polímeros en las propiedades térmicas de la muestras.

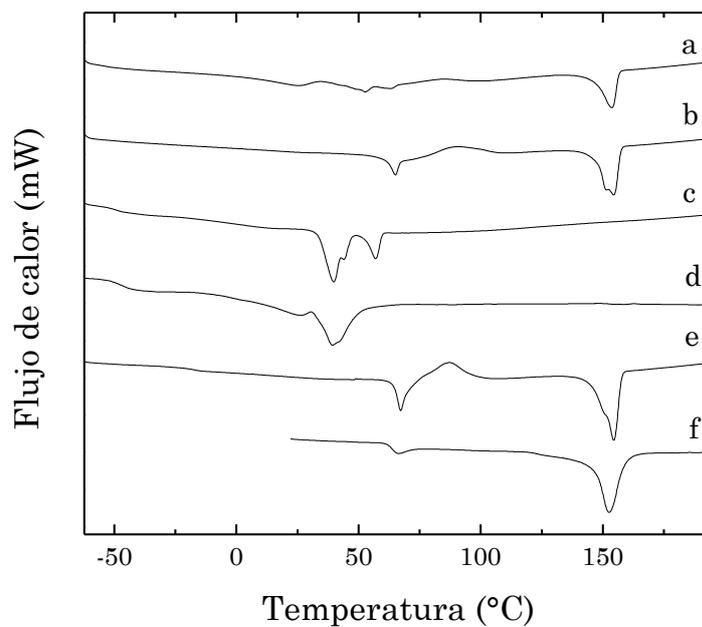


Figura 3.4. Termogramas de DSC de a) la capa interna, b) capa externa, c) PHD y e) PLLA electrohilados, y los polímeros sin procesar d) PHD y f) PLLA.

La tabla 3.2. presenta la T_g , T_c , T_m , las ΔH_c y ΔH_m y el X_c de los polímeros sin procesar, PLLA y PHD, y de estructuras fibrosas electrohiladas de PLLA, PHD, capa externa e interna. El subíndice “s” en los eventos térmicos del PHD se refiere a las propiedades de los segmentos

blandos; las transiciones térmicas de los segmentos duros no fueron detectadas por el DSC.

Tabla 3.2. Propiedades térmicas del PLLA y PHD sin procesar, y del PLLA, PHD, capa interna y externa electrohilados

Muestra	T _g	T _{g,s}	T _c	ΔH _c	T _m	ΔH _m	X _c	T _{m,s}	ΔH _{m,s}	X _c
	PLLA (°C)	PHD (°C)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA ^a (%)	PHD (°C)	PHD (J g ⁻¹)	PHD ^b (%)
PLLA pellet	61,4	--	--	--	152,5	35	37,6	--	--	--
PHD film		-53,2	--	--	--	--	--	26,6; 39,3	29,8	26,4
PLLA	63,6	--	87,2	16,06	154,5	34,3	19,6	--	--	--
PHD	--	-51,6	--	--	--	--	--	39,9; 43,9; 57,0	53,5	36,2
Capa externa	61	--	90,2	14,1	151,6; 154,4	31,2	18,3	--	--	--
Capa interna	55	-59	83,4	9,1	153,7	33,6	26,4	25,0; 49,2; 52,7	18,5	16,4

^a X_c para el PLLA se calculó considerando 93 J g⁻¹ como la ΔH_m para el PLLA 100% cristalino (Fischer, 1973);

^b X_c para el PHD se calculó considerando 148,05 J g⁻¹ como la ΔH_m de la PCL pura de alto peso molecular (los segmentos blandos del PHD) (Van Krevelen, 2009).

Las propiedades térmicas del PLLA sin procesar y electrohilado, muestran que ni la T_g ni T_m sufrieron modificaciones asociadas al proceso de electrohilado. Estos valores son cercanos a los encontrados en la literatura. El mayor cambio introducido por el procesamiento del PLLA es la disminución de la cristalinidad del polímero. Esto se debe a que durante el electrohilado se inhibe el ordenamiento de las cadenas poliméricas debido a la rápida solidificación del polímero, formando así una mayor fracción de fase amorfa (Zong, 2002). El análisis térmico de los filmes de PHD obtenidos por colado de soluciones fue publicado por Caracciolo *et al.* (Caracciolo, 2009). La comparación del comportamiento térmico del film y del material electrohilado indica que el valor de la T_{g,s} no tiene cambios significativos. El

material electrohilado mostró tres picos asociados a la fusión de los dominios blandos a temperaturas más altas que las reportadas para el film, mientras que el X_c evidenció un incremento con respecto al valor encontrado en el film. La presencia de una mayor fracción de cristales con un mayor grado de orden, rara vez reportado en la literatura para el proceso de electrohilado, es difícil de explicar en términos de interacciones intermoleculares. H. Zhuo *et al.* (Zhuo, 2008) también observaron una mayor cristalinidad en nanofibras de SPEU con memoria de forma, y atribuyeron este hecho a un tropismo positivo de los segmentos blandos. El polímero no presenta eventos térmicos asociados a los segmentos duros, y esto puede deberse al hecho que los extendedores de cadena grandes dificultan el ordenamiento que lleva a la cristalización de los segmentos duros. Por lo tanto, no sólo el método de procesamiento tiene un efecto significativo en el comportamiento térmico sino también la composición y la estructura de los extendedores de cadena. El termograma correspondiente a la mezcla de la capa externa sólo mostró los eventos térmicos del PLLA, debido al pequeño porcentaje de PHD presente (sólo 10% p/p). Los parámetros térmicos no parecen mostrar una modificación sustancial con respecto a los encontrados en el PLLA electrohilado. El termograma de la capa interna mostró eventos superpuestos debido a la proximidad de la T_g del PLLA a la T_m de los segmentos blandos del PHD. Se realizó un segundo calentamiento para separar los eventos térmicos (Figura 3.5.). Como se puede apreciar la T_g del PLLA se encuentra superpuesta con los picos de fusión de los segmentos blandos del PHD. Entonces, se obtuvo el valor de la T_g del PLLA a partir de la curva del segundo calentamiento, mientras que la cristalinidad de los segmentos blandos del PHD y del PLLA se calculó a partir del primer calentamiento dado que estos eventos se modifican en el segundo calentamiento. La mezcla de ambos polímeros influyó en la respuesta térmica del PHD y PLLA. Se ha reportado que la adición de componentes blandos al PLLA, como PEO, pueden actuar como un agente plastificante (Liu, 2013). El PHD podría entonces actuar como plastificante para el PLLA, y ser la causa de la disminución de la T_g de este último. La $T_{g,s}$ del PHD no

se visualizó con claridad, aunque la caída observada a $-59\text{ }^{\circ}\text{C}$ podría atribuirse a dicho evento. Tanto la T_m como la T_c no presentaron cambios con la mezcla. Sin embargo, el X_c resultó diferente al encontrado en los polímeros electrohilados puros. En el caso de PLLA, se observó un aumento en la cristalinidad. Un aumento en el X_c del PLLA fue reportado para mezclas con poli(ϵ -caprolactona), el cual es el componente de los segmentos blandos del PHD (Chen, 2003). Por otro lado, el PHD presentó una disminución en el X_c de sus segmentos blandos. Este efecto puede ser causado por la longitud de las cadenas de PLLA, que dificultan el movimiento de las cadenas de PHD y hacen más difícil que sus segmentos blandos cristalicen.

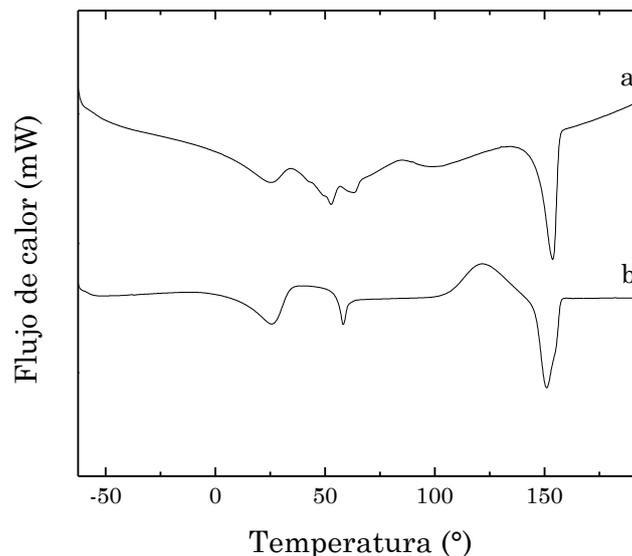


Figura 3.5. Termogramas de DSC de la capa interna, a) en un primer, y b) segundo calentamiento.

En resumen, en las matrices electrohiladas compuestas por mezclas de PLLA y PHD, ambos polímeros presentaron un X_c inferior al de los polímeros sin procesar. Esto podría favorecer su comportamiento elástico y degradación hidrolítica, lo cual conduciría a injertos más atractivos para ingeniería de tejidos. El comportamiento térmico de las mezclas mostró que los polímeros no son completamente miscibles entre sí, sin embargo, la parte amorfa de ambos podría ser parcialmente miscible.

3.3.1.4. Ángulo de contacto

La figura 3.6. muestra el valor del ángulo en función del tiempo para las matrices nanofibrosas. El PLLA presentó un comportamiento hidrofóbico típico, evidenciado por un ángulo de contacto alrededor de los 140°. El PHD mostró un ángulo de contacto variable en el tiempo, disminuyó de 106° a 76° después de 5 minutos. Sin embargo, luego de 5 minutos adicionales la gota de agua es absorbida por completo. Por lo tanto, el PHD electrohilado presentó un comportamiento hidrofílico. Los valores de las mezclas fueron los esperados. La capa externa, que es en su mayoría PLLA, presentó un ángulo de contacto levemente menor a 140°. La capa interna mostró un valor de ángulo de contacto intermedio entre los polímeros individuales. Estos resultados muestran que el comportamiento hidrofóbico del PLLA se reduce al mezclarlo con PHD. Este incremento en la hidrofiliidad es favorable para el cultivo de células endoteliales que se espera realizar en la capa íntima.

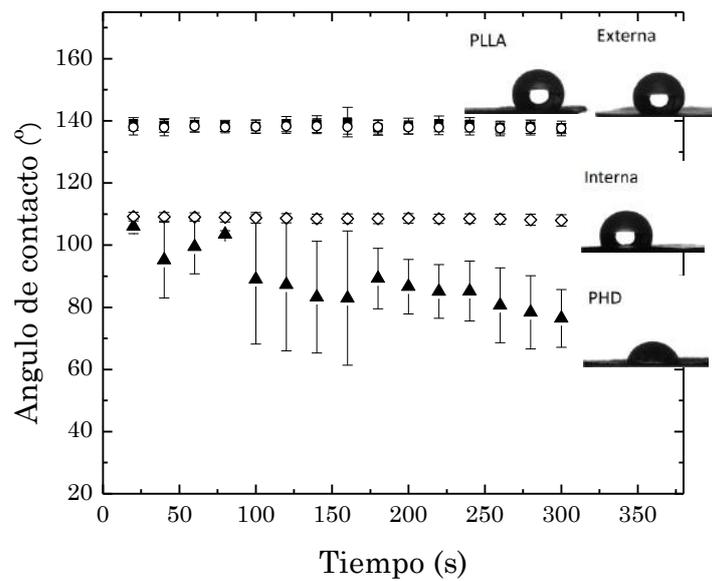


Figura 3.6. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para las matrices electrohiladas de PLLA (■), la capa externa (○), la capa interna (◊) y PHD (▲)

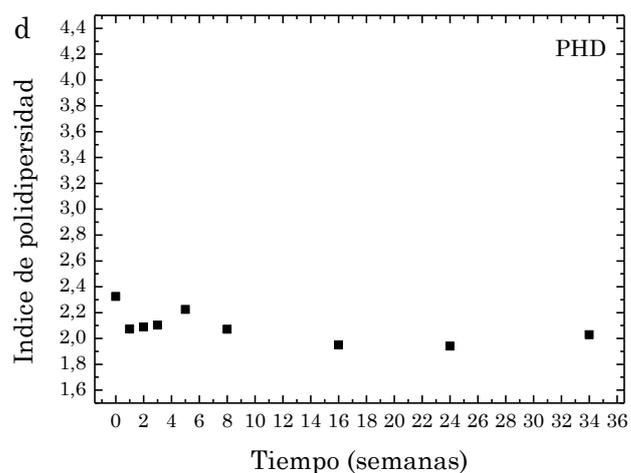
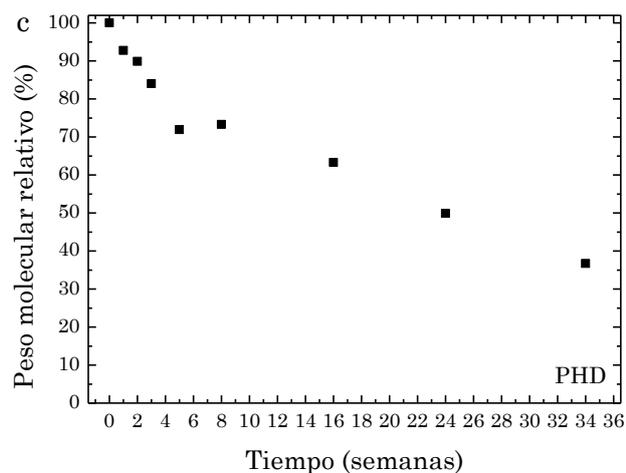
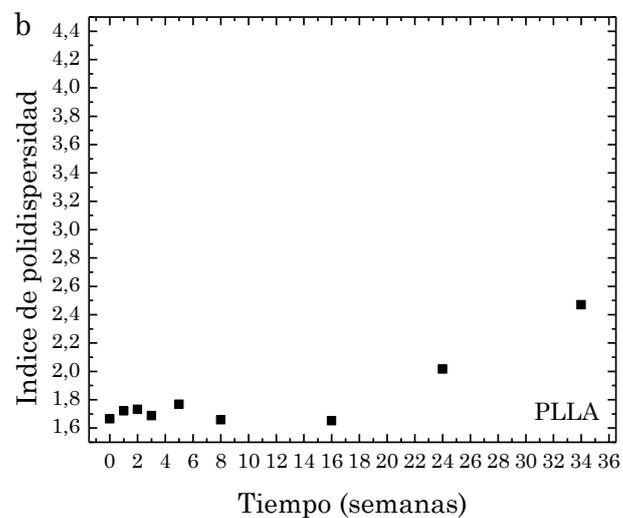
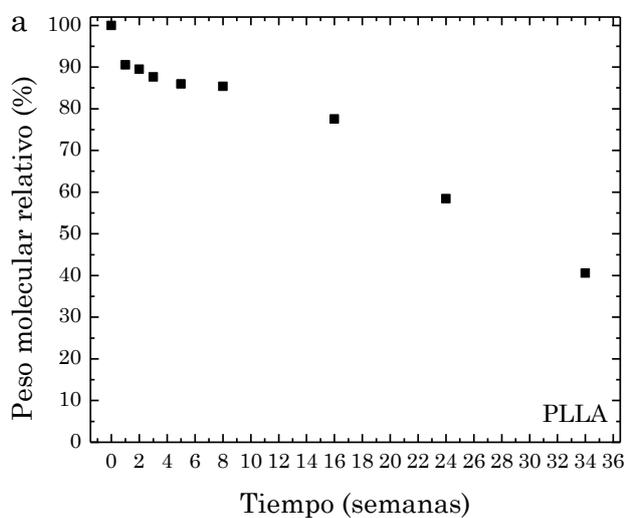
3.3.2. Estudio de la degradación *in vitro*

3.3.2.1. Estudio de la degradación *in vitro* mediante GPC

Los pesos moleculares promedio, su distribución y el IP de los injertos electrohilados de PLLA, PHD y sus mezclas en función del tiempo de degradación fueron caracterizados por GPC. La figura 3.7. a-b) muestra los resultados obtenidos para PLLA expresados como peso molecular relativo ($1 - [(M_n - M_{n \text{ inicial}}) / M_{n \text{ inicial}}] \cdot 100$). Como se puede observar el M_n disminuye con el tiempo de degradación, sufriendo una disminución del 59% en 34 semanas. Por otro lado, el IP se mantiene alrededor de 1,7 en las primeras 16 semanas de degradación y luego comienza a aumentar en las últimas semanas.

Se logró un porcentaje similar de disminución del M_n a las 34 semanas de degradación para el PHD (63%) (Figura 3.7. c-d). No obstante su velocidad de degradación parece ser ligeramente mayor. Por otro lado, se

observó un comportamiento diferente con el IP, el cual se mantiene alrededor de 2 durante todo el tiempo de degradación.



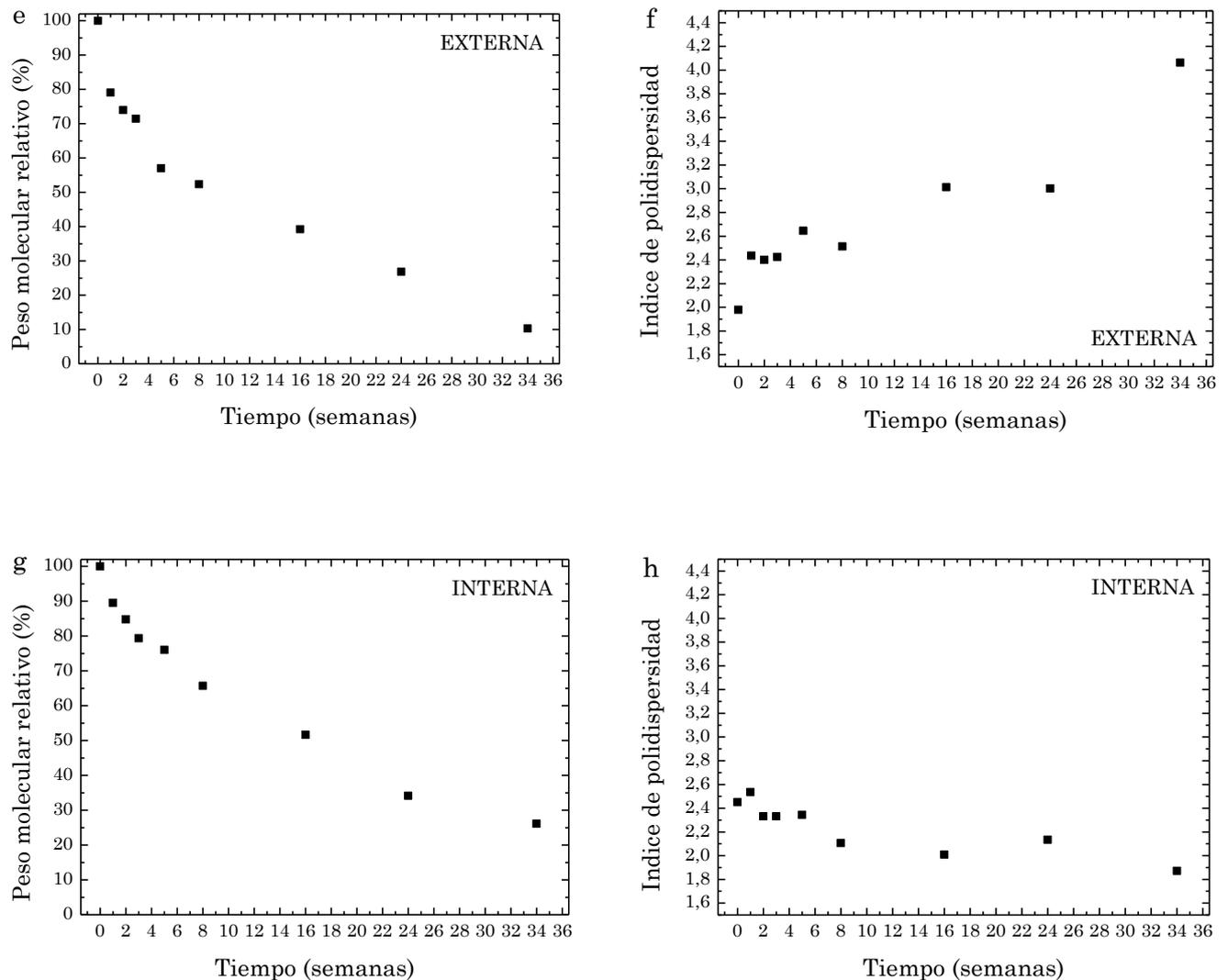


Figura 3.7. Peso molecular relativo de los injertos electrohilados de PLLA, PHD, capa externa e interna (a, c, e, g), e IP (b, d, f, h) a distintos tiempos de degradación hidrolítica.

Se analizó el pico que representa la señal completa del PLLA y PHD para las mezclas, y se estudió la variación del peso molecular del mismo. Las figura 3.7. e-h presentan los resultados obtenidos y se observa una mayor disminución del M_n , de un 74% y 90% para la capa interna y externa respectivamente, que para los componentes electrohilados puros. Se ha reportado que la velocidad de degradación de cada componente se modifica en presencia del otro cuando se estudian mezclas de poliésteres. El polímero

que degrada más lento aumenta su velocidad al mezclarlo con un material de mayor velocidad de degradación, mientras que el de mayor velocidad de degradación, ahora se degrada más lentamente por efecto del otro (Cha, 1990). Este efecto no se puede determinar al tomar el pico de elución de las mezclas como un polímero puro. En este caso, es posible que en el resultado observado predomine la influencia del componente que acelera su velocidad de degradación. Además, hay que tener en cuenta los cambios observados en la cristalinidad e hidrofiliidad de las mezclas (Secciones 3.3.1.3. y 3.3.1.4.) que pueden afectar el comportamiento degradativo de cada componente. Se considera entonces, que el pequeño aumento en la velocidad de degradación de la capa interna con respecto a las observadas por sus componentes puros (59% para el PLLA, 63% para el PHD y 74% para la capa interna) se debe a que predomina el efecto de aceleración de la degradación del PLLA. La capa externa, sorprendentemente, se degrada a mayor velocidad aún que la capa interna (90%). Sin embargo, se puede observar que el pico de elución correspondiente a las 34 semanas de degradación es muy ancho (Figura 3.8.). Se supone que efectivamente hay una mayor degradación de una de las partes que corre el valor del M_n hacia valores bajos. Efectivamente, la menor cristalinidad del PLLA en la capa externa con respecto a la capa interna (Sección 3.3.1.3.), acelera el proceso de degradación del mismo. Se observa, entonces una mayor pérdida del M_n para la capa externa que para la capa interna, aunque en el mismo orden.

Además, los M_{ns} de ambas mezclas a las 34 semanas (7,98 y 5,62 kg mol⁻¹) se encuentran en el mismo orden. Estos resultados indican que el injerto en su totalidad se degrada a una velocidad bastante uniforme, lo cual es ideal para su potencial aplicación. Se observa un gran aumento del IP para la capa externa, presentando un valor alrededor de 4 a las 34 semanas de degradación. La capa interna presenta un comportamiento opuesto, en donde el IP baja de 2,5 a 1,9 al final del tiempo de degradación estudiado.

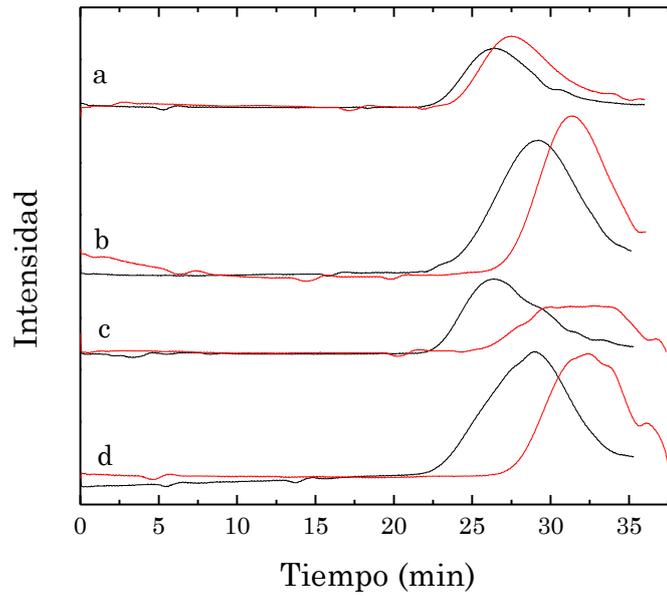


Figura 3.8. Picos de elución de los injertos electrohilados de a) PLLA, b) PHD, c) capa externa e d) interna sin degradar (negro) y luego de 34 semanas (rojo) de degradación.

3.3.2.2. Estudio de la degradación *in vitro* mediante DSC

La figura 3.9. presenta los termogramas de injertos electrohilados de PLLA sin degradar y a 16 y 34 semanas de degradación hidrolítica. En las curvas no se aprecian cambios drásticos en el comportamiento térmico de las muestras. Sin embargo, los valores de la T_g , T_c , T_m , ΔH_c , ΔH_m y X_c (Tabla 3.3.) reflejan los cambios producidos por la degradación hidrolítica.

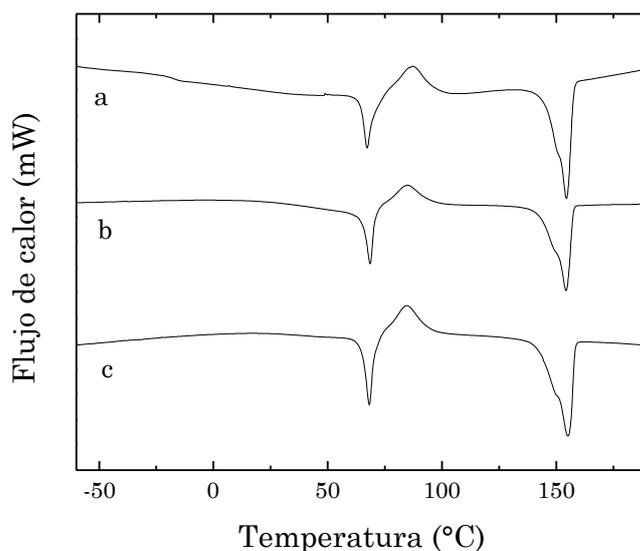


Figura 3.9. Termogramas de DSC del PLLA a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.

Tabla 3.3. Propiedades térmicas del PLLA a distintos tiempos de degradación.

Tiempo (semanas)	T _g (°C)	T _c (°C)	ΔH _c (J g ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH _m (J g ⁻¹)	X _c ^a (%)
0	63,6	87,2	16,1	154,5	34,3	19,6
1	64,4	86,1	12,3	154,5	34,0	23,3
2	64,5	85,9	11,3	154,3	32,7	23,0
3	63,5	85,5	11,5	154,6	33,9	24,0
5	63,9	86,1	10,2	155,2	32,6	24,1
8	63,6	85,5	11,9	154,8	33,3	23,0
16	62,8	85,0	11,5	154,2	34,1	24,3
24	64,0	85,3	11,5	155,0	33,9	24,0
34	62,3	84,6	8,2	155,0	31,8	25,4

^a X_c para el PLLA se calculó considerando 93 J g⁻¹ como la ΔH_m para el PLLA 100% cristalino (Fischer, 1973).

El cambio más significativo e inmediato se observa en la cristalinidad de los injertos, con un temprano aumento ya en la primera semana de degradación. El mecanismo de degradación de los poliésteres comienza en la rotura de cadenas de la región amorfa, aumentando su movilidad y por lo tanto favoreciendo la cristalización de las mismas. Sin embargo, es poco probable que en tan corto tiempo de degradación se hayan formado nuevos

crisales. Las ΔH_c y ΔH_m , muestran que el aumento de la cristalinidad se debe a una menor cristalización durante la etapa de calentamiento (desde el estado vítreo, *cold crystallization*), indicando que parte de las cadenas de la región amorfa propensas a cristalizar durante el ensayo, ya cristalizaron durante la degradación. X. Zong *et. al* proponen una etapa anterior en el mecanismo de degradación del PLGA electrohilado. Se propone una primera cristalización inducida térmicamente, ya que la T_g del polímero es muy próxima a la temperatura de degradación *in vitro* y aumenta la movilidad de las cadenas (Zong, 2003). En nuestro caso, la T_g del PLLA esta unos grados por encima de la temperatura de degradación *in vitro*, sin embargo, se considera que este primer aumento de la cristalinidad se debe a una cristalización inducida térmicamente. Luego se entra en las siguientes etapas de degradación, en donde se produce el corte de cadenas de la región amorfa. En la semana 34, se observa que la ΔH_m disminuye, lo que indicaría que se comenzaron a degradar las fases cristalinas del PLLA, pero dado que la X_c aumenta, también existe una contribución debido al reordenamiento de regiones amorfas parcialmente degradadas. Las T_g , T_c y T_m no presentaron cambios significativos con la degradación.

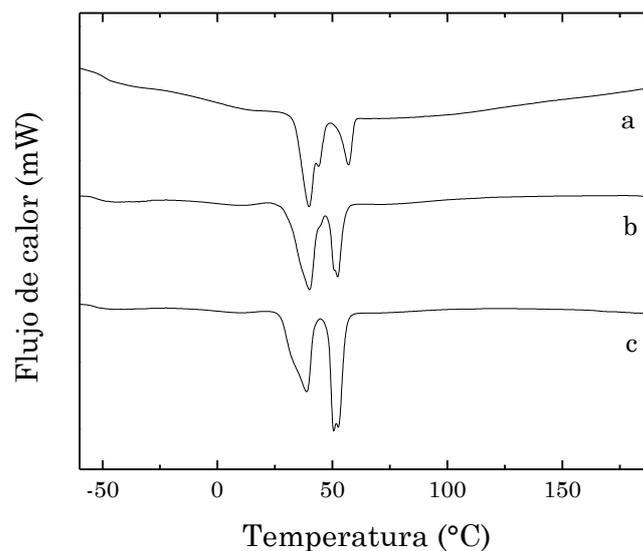


Figura 3.10. Termogramas de DSC del PHD a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.

La figura 3.10. muestra los termogramas correspondientes al PHD sin degradar y a las 16 y 34 semanas de degradación. Nuevamente no se observa ningún cambio térmico significativo de las curvas.

Tabla 3.4. Propiedades térmicas del PHD a distintos tiempos de degradación

Tiempo (semanas)	T _{g,s} (°C)	T _{m,s} (°C)	ΔH _{m,s} (J g ⁻¹)	X _{c,s} ^a (%)
0	-51,6	39,9; 43,9; 57,0	53,5	36,2
1	-55,2	40,3; 48,8	58,7	39,7
2	-53,8	40,6; 47,6; 49,3	47,1	31,8
3	-54,4	40,8; 48,8; 50,5	50,8	34,3
5	-53,7	41,3; 48,8; 50,6	49,8	33,6
8	-54,5	41,3; 49,8; 51,8	55,7	37,6
16	-55,3	40,0; 52,3	58,9	39,8
24	-54,8	39,3; 50,7; 52,5	66,7	45,0
34	-55,4	39,8; 50,7; 52,5	70,0	47,3

^a X_c del PHD se calculó considerando 148,05 J g⁻¹ como la ΔH_m de la PCL pura de alto peso molecular (los segmentos blandos del PHD) (Van Krevelen, 2009).

Luego de analizar los eventos térmicos en detalle (Tabla 3.4.), se observa que la cristalinidad es la propiedad más afectada. Se observa un aumento en la cristalinidad de los segmentos blandos, formados por PCL diol (M_n = 2,250 kg mol⁻¹), con el aumento del tiempo de degradación. La degradación sufrida por el segmento blando se produce a través de los mecanismos típicos mencionados anteriormente para los poliésteres. En consecuencia, el aumento de la cristalinidad se debe a la degradación preferencial de las cadenas amorfas, lo cual aumenta su movilidad y produce la cristalización de las mismas. No se puede establecer una tendencia en el cambio de los valores de la T_{g,s} y la T_{m,s} con el tiempo de degradación.

La figura 3.11. muestra los termogramas para la capa externa. El bajo contenido de PHD (10% p/p) presente en la mezcla no permitió observar los eventos térmicos de este componente, al igual que en el caso de la capa externa sin degradar (Sección 3.3.1.3.). El termograma correspondiente a las 34 semanas de degradación muestra que disminuye la cristalización de las

cadena de PLLA durante el ensayo. La T_g del PLLA también parece disminuir con el tiempo de degradación.

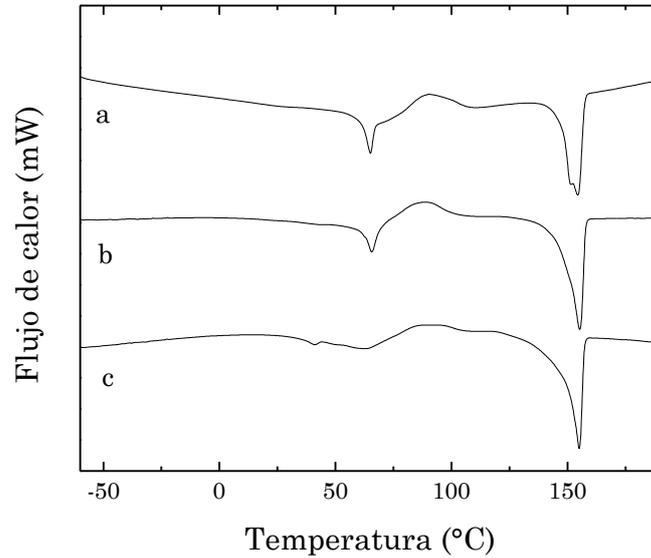


Figura 3.11. Termogramas de DSC de la capa externa a) sin degradar, b) luego de 16 semanas y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.

Tabla 3.5. Propiedades térmicas de la capa externa a distintos tiempos de degradación.

Tiempo (semanas)	T_g	$T_{g,s}$	T_c	ΔH_c	T_m	ΔH_m	X_c	$T_{m,s}$	$\Delta H_{m,s}$	X_c
	PLLA (°C)	PHD (°C)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA ^a (%)	PHD (°C)	PHD (J g ⁻¹)	PHD ^b (%)
0	61	---	90,2	14,1	151,6; 154,4	31,2	18,3	---	---	---
1	61,5	---	97,3	12,0	155,3	35,0	24,8	---	---	---
2	62,4	---	91,0	13,5	154,7	39,3	27,8	---	---	---
3	61,4	---	90,9	10,4	154,9	34,1	25,5	---	---	---
5	61,0	---	92,6	11,9	155,8	34,8	24,7	---	---	---
8	59,5	---	92,9	10,7	155,8	35,4	26,6	---	---	---
16	58,7	---	88,6	10,6	155,2	38,7	30,2	---	---	---
24	54,5	---	87,3	12,4	155,4	46,1	36,3	---	---	---
34	44,4	---	87,6	6,7	155,0	38,3	34,0	---	---	---

^a X_c para el PLLA se calculó considerando 93 J g⁻¹ como la ΔH_m para el PLLA 100% cristalino (Fischer, 1973).

Los eventos térmicos de la capa externa (Tabla 3.5.) evidencian un aumento de la cristalinidad así como una disminución en la T_g del PLLA. La

cristalinidad del PLLA en la capa externa aumenta en la primera semana de degradación, al igual que en el caso de los injertos de PLLA. Este aumento se observa dado que la muestra cristaliza en menor extensión durante el ciclo de calentamiento porque ya es más cristalina (menor ΔH_c). A partir de la semana 16, se observa un segundo aumento de la cristalinidad, asociado a una disminución de la T_g . Esto se debe al comienzo de la etapa siguiente de la degradación hidrolítica, donde se aumenta dramáticamente la movilidad de las cadenas poliméricas en la región amorfa debido al corte de las mismas (Zong, 2003). Este cambio se ve reflejado también en un aumento de la ΔH_m , indicando que dichas cadenas con mayor movilidad cristalizan. Finalmente, en la semana 34 se observa una pequeña disminución en el X_c , asociado al ingreso en la última etapa de degradación donde la región cristalina comienza a hidrolizarse. No se aprecian cambios en la T_m durante el proceso de degradación.

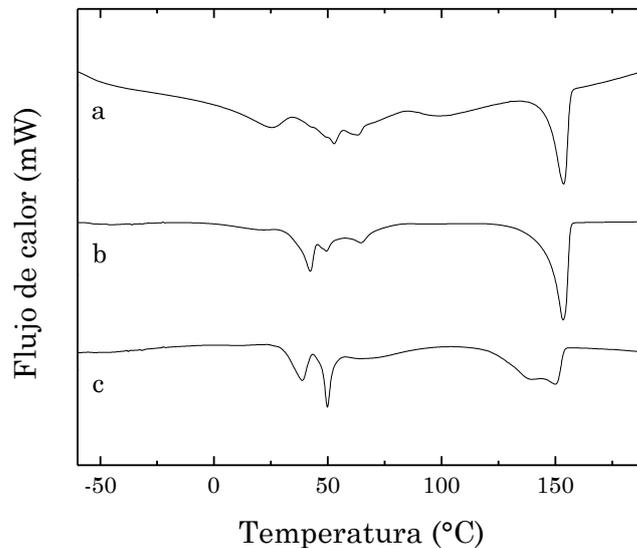


Figura 3.12. Termogramas de DSC de la capa interna a) sin degradar, b) luego de 16 y c) 34 semanas de degradación hidrolítica.

La figura 3.12. presenta los termogramas para la capa interna. Estos reflejan una disminución y desaparición del pico de cristalización del PLLA. En cuanto a la T_g del mismo, esta se ve superpuesta por los picos de fusión de los segmentos blandos del PHD, cuyos eventos térmicos ahora si son

evidentes en el termograma de la mezcla. Se observa también, un aumento en la ΔH_m de los segmentos blandos y un cambio en el pico de fusión del PLLA.

Tabla 3.6. Propiedades térmicas de la capa interna a distintos tiempos de degradación.

Tiempo (semanas)	T_g	$T_{g,s}$	T_c	ΔH_c	T_m	ΔH_m	X_c	$T_{m,s}$	$\Delta H_{m,s}$	X_c
	PLLA (°C)	PHD (°C)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA (°C)	PLLA (J g ⁻¹)	PLLA ^a (%)	PHD (°C)	PHD (J g ⁻¹)	PHD ^b (%)
0	55	-59	83,4	9,1	153,7	33,6	26,4	25,4; 49,2; 52,7	18,5	16,4
1	---	-56,1	80,0; 82,0	2,8	153,5	44,6	45,0	43,3; 56,1; 58,6	31,6	21,4
2	---	-55,3	80,0; 81,9	2,6	154,0	43,3	43,7	42,4; 46,3	27,8	18,8
3	---	---	86,6	7,0	154,9	40,5	36,0	42,8; 51,7	36,9	24,9
5	---	-54,8	81,0; 82,2; 83,2	2,0	154,3	43,9	45,0	42,3; 48,9	36,6	24,7
8	---	---	79,8	1,3	154,6	46,5	48,6	42,0; 48,0	33,0	22,3
16	---	---	84,9	0,3	153,6	50,1	53,6	42,3; 49,5	51,1	34,5
24	---	---	---	---	152,7	52,4	56,4	38,8; 47,7	79,3	53,6
34	---	---	---	---	139,6; 149,9	45,0	48,4	38,8; 49,8	75,4	50,9

^a X_c para el PLLA se calculó considerando 93 J g⁻¹ como la ΔH_m para el PLLA 100% cristalino (Fischer, 1973);

^b X_c para el PHD se calculó considerando 148,05 J g⁻¹ como la ΔH_m de la PCL pura de alto peso molecular (los segmentos blandos del PHD) (Van Krevelen, 2009).

La cristalinidad de ambos polímeros en la mezcla exhibe un incremento con el tiempo de degradación (Tabla 3.6.). El aumento es inmediato luego de la primera semana de degradación para el PLLA, consistente con los resultados observados para los injertos de PLLA y la capa externa. En este caso, el aumento de la cristalinidad se debe a un

aumento en la ΔH_m , así como también a la disminución de la ΔH_c con respecto a la capa interna sin degradar. Estos cambios reflejarían el efecto de la cristalización inducida térmicamente en conjunto con el corte de cadenas poliméricas de la región amorfa. La cristalinidad del PHD presenta un menor aumento, produciéndose un mayor incremento en la semana 16 de degradación. Este aumento refleja la degradación preferencial de la región amorfa, en concordancia con la cristalinidad baja de los segmentos blandos en la mezcla y la mayor velocidad de degradación observada en la sección 3.3.2.1., para la capa interna con respecto al PHD. Las T_g de ambos polímeros no se han podido detectar por efectos de superposición (PLLA) o debido a la dificultad del equipamiento para alcanzar temperaturas menores (PHD). Finalmente, las $T_{m,s}$ no presentaron una tendencia clara.

Luego de comparar los resultados de los cuatro injertos estudiados se observa que X_c , a altos tiempos de degradación, presenta un comportamiento diferente para los injertos a partir de los polímeros puros que para las mezclas. Los polímeros puros presentan siempre un aumento de X_c con el tiempo, pero tanto en las capas interna como externa, este valor disminuye a tiempos de degradación avanzados. Este efecto es más marcado para PLLA. Esto podría sugerir que la degradación se acelera para los polímeros en la mezcla, lo cual concuerda con la mayor velocidad de degradación evidenciada por GPC (Sección 3.3.2.1.).

3.3.2.3. Estudio de la degradación *in vitro* mediante ángulo de contacto y SEM

Por último se analizó el cambio en la hidrofobicidad de las muestras y en su microestructura con el tiempo de degradación. La figura 3.13. muestra el ángulo de contacto de los injertos de PLLA para cada tiempo de degradación y su variación con el tiempo. Los injertos se mantienen hidrofóbicos hasta la semana 16, con un valor de ángulo de contacto levemente menor al observado en la muestras sin degradar (Sección 3.3.1.4.). En la semana 24 la dispersión se incrementa notablemente, y se

considera que a partir de ese momento se comienzan a formar cadenas cortas e hidrofílicas. En la semana 34 la muestra se torna completamente hidrofílica indicando la presencia de oligómeros de bajo peso molecular.

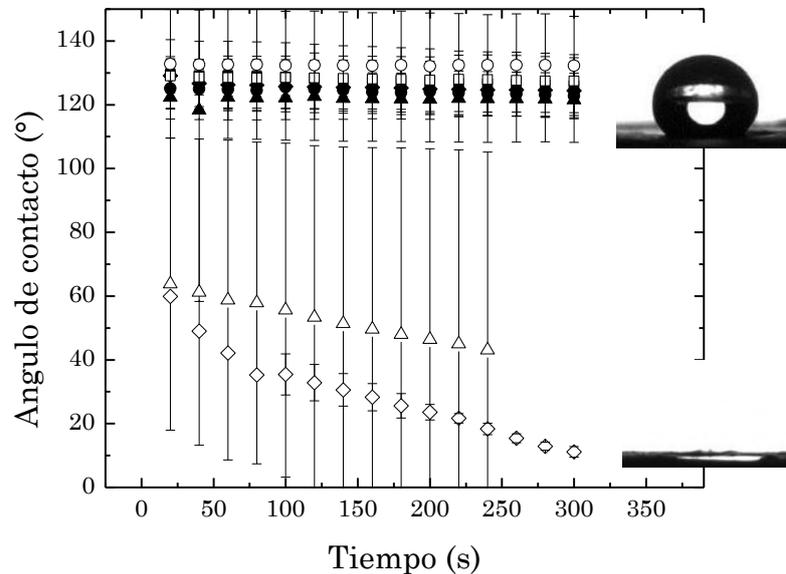


Figura 3.13. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de PLLA en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□), 16 (○), 24 (Δ) y 34 (◇) semanas.

La figura 3.14. muestra los resultados para los injertos de PHD. Se observa un comportamiento hidrofílico durante todo el proceso de degradación. Se observa una desviación considerable en el valor del ángulo de contacto, al igual que en el caso del PHD sin degradar. El ángulo de contacto se mantiene cercano a 40° hasta la semana 34 de degradación. Se podría concluir que el valor del mismo no varía ni sigue una tendencia clara en función del tiempo de degradación. Se considera que la variación observada en el ángulo de contacto está relacionada a la difusión hacia el medio de degradación de los oligómeros hidrofílicos formados a través de sus poros interconectados. El ángulo de contacto de las muestras degradadas a 34 semanas no pudo medirse debido a su fragmentación y falta de integridad mecánica.

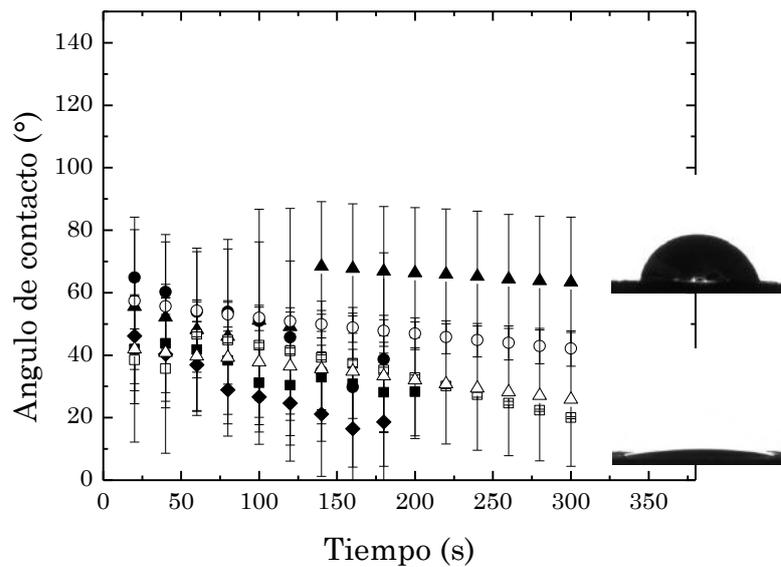


Figura 3.14. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de PHD en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□), 16 (○) y 24 (△) semanas.

La capa externa presentó un comportamiento muy hidrofílico en todos los tiempos de degradación (Figura 3.15.). Más aún, a partir de la 8-16ava semana de degradación la gota de agua se absorbió antes del minuto de espera para comenzar las medidas. Por esta razón los resultados presentados para la semana 8 no presentan valores de desviación estándar. El cambio drástico de hidrofiliidad luego de tan sólo una semana de degradación sorprende (Sección 3.3.1.4.). Este resultado no obstante está en concordancia con la mayor pérdida de M_n observada en la sección 3.3.2.1., la cual puede ser favorecida además de por los motivos ya establecidos, por una mayor hidrofiliidad y mejor penetración del PBS dentro de los injertos.

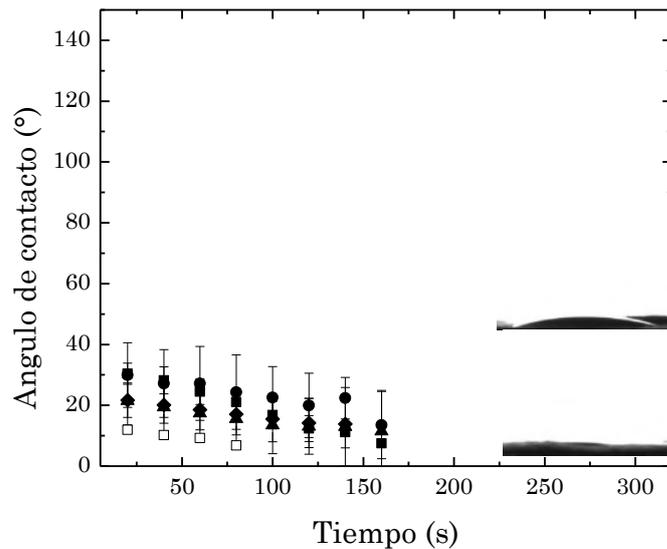


Figura 3.15. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de capa externa en función del tiempo de degradación: 1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆) y 8 (□) semanas.

La figura 3.16. muestra los valores obtenidos para la capa interna. Nuevamente, los injertos muestran un comportamiento hidrofílico en todos los tiempos de degradación. Se observa como el ángulo de contacto disminuye con el tiempo de degradación hasta mantenerse alrededor de un valor de 30° a partir de la tercera semana de degradación. Además, en todos los casos ensayados la gota de agua se absorbe luego de 1-5 minutos, mostrando una alta hidrofiliidad debido a la presencia de cadenas de bajo peso molecular hidrofílicas. La oscilación del ángulo con el tiempo de degradación puede estar relacionada, al igual que en el caso del PHD, a la difusión de dichas cadenas hacia el exterior de la muestra a través de sus poros interconectados. No se presentan valores de la semana 24 en adelante ya que la gota de agua se absorbió antes del minuto de espera para comenzar las medidas.

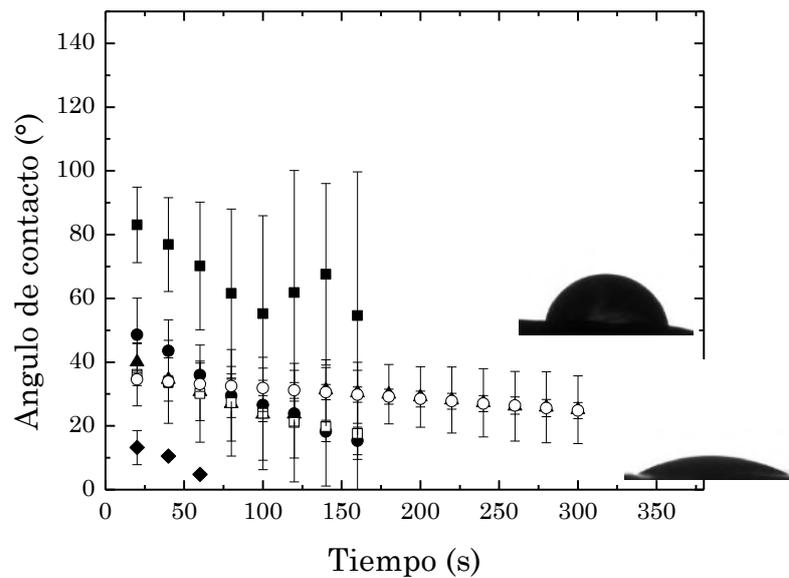


Figura 3.16. Medidas del ángulo de contacto en función del tiempo para los injertos electrohilados de capa interna en función del tiempo de degradación:

1 semana (■), 2 (●), 3 (▲), 5 (◆), 8 (□) y 16 (○) semanas.

La morfología de las muestras estudiada por SEM no revela cambios significativos en la morfología nanofibrosa en función del tiempo de degradación (Figura 3.17.).

La tabla 3.7. presenta los diámetros medios de las nanofibras luego de 1, 16 y 34 semanas de degradación. En todos los casos no se presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre las muestras a 1 semana de degradación y las medidas a 34 semanas. Sin embargo, en algunos casos se observaron diferencias entre la muestras a 1 semana y 16 semanas (*) y 16 semanas y 34 semanas (#).

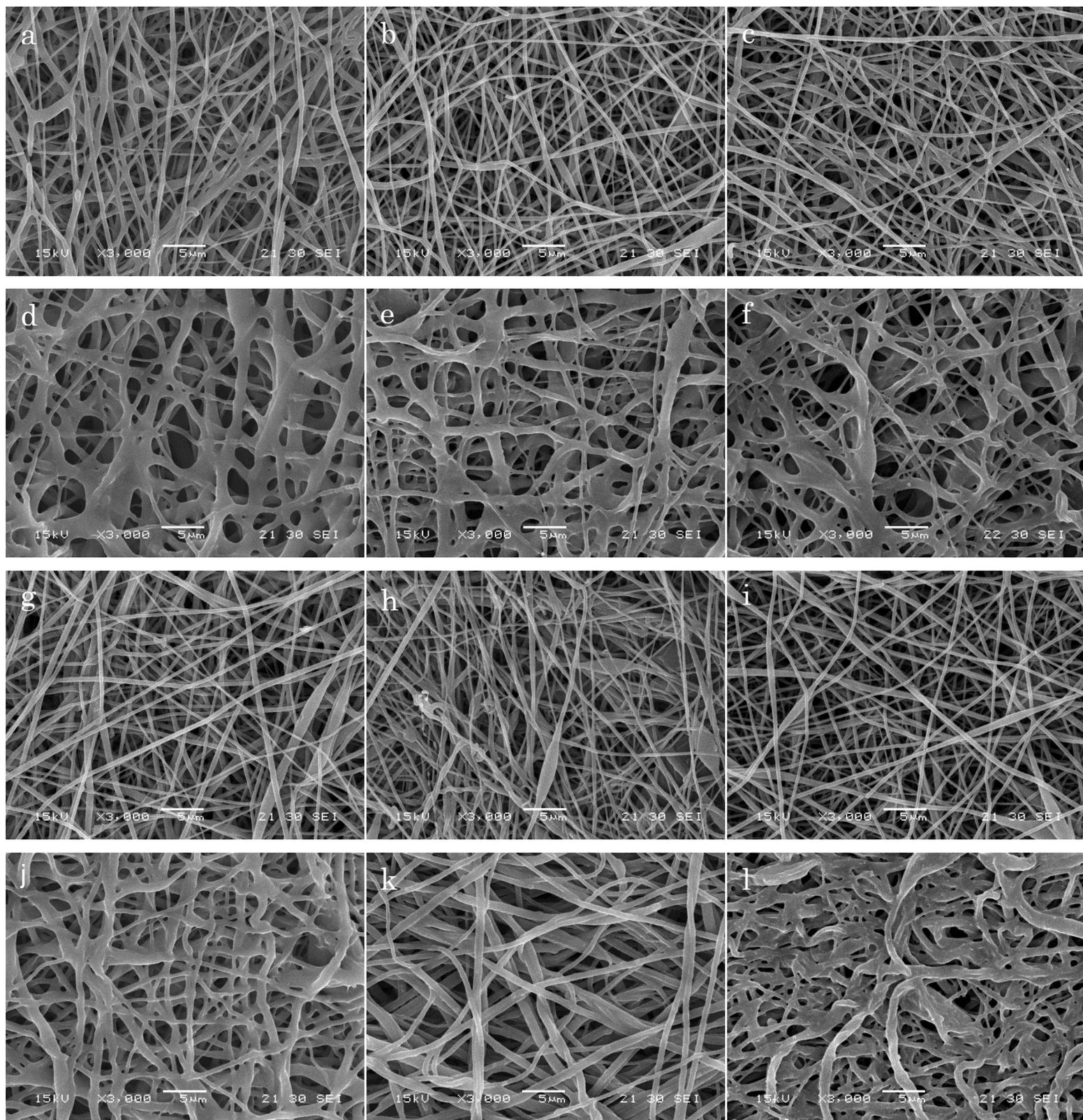


Figura 3.17. Micrografías SEM de los injertos electrohilados de PLLA (a, b, c), PHD (d, e, f), la capa externa (g, h, i) e interna (j, k, l) en función del tiempo degradación a 1 semana (a, d, g, j), 16 (b, e, h, k) y 34 (c, f, i, l) semanas.

Tabla 3.7. Diámetro medio para las muestras de los injertos luego de 1, 16 y 34 semanas de degradación.

Muestras	Diámetro medio (nm)		
	1 semana	16 semanas	34 semanas
PLLA	375 ± 138	390 ± 119	407 ± 118
PHD	641 ± 413	515 ± 252	558 ± 284
Externa	463 ± 170	359 ± 122 [#]	425 ± 129
Interna	590 ± 232 [*]	619 ± 199 [#]	532 ± 235

* diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el diámetro medido para 1 semana con 16 semanas;

diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el diámetro medido para 16 semanas con 34 semanas.

Estos resultados indican que si bien los injertos sufren una degradación considerable evidenciada por el cambio en su peso molecular, se conserva la morfología nanofibrosa e incluso el tamaño medio de las mismas. Más aún los diámetros medios fueron similares ($p < 0,05$) a los de los injertos sin degradar (PLLA = 383 ± 103 nm, PHD = 687 ± 290 nm, externa = 410 ± 124 nm e interna = 754 ± 210 nm), excepto para la mezcla interna, no obstante esta presenta una alta desviación.

3.4. Conclusiones parciales

Este capítulo presenta la caracterización de injertos electrohilados de los dos polímeros utilizados, así como también de las dos mezclas que forman las capas del injerto bicapa, y el estudio de su degradación hidrolítica. Se observa que el procesamiento por la técnica de electrohilado de la mezcla PLLA/PHD mejora sus propiedades térmicas, disminuyendo la cristalinidad de ambos polímeros en relación a la obtenida para los mismos

sin procesar. Por otro lado, la hidrofiliidad de los injertos se incrementa, en particular en la capa interna. Estos resultados indican que las mezclas electrohiladas tendrán una degradación hidrolítica más veloz, lo cual se ve reflejado en la disminución relativa del peso molecular.

El análisis de la degradación de los injertos de PLLA, PHD y las capas interna y externa, mostró que en la semana 34 de degradación el peso molecular disminuye entre un 60-90%. En particular para el caso de las mezclas utilizadas en el injerto bicapa se obtiene una pérdida del peso molecular del mismo orden (75-90%). Además, los M_n de las cadenas degradadas a las 34 semanas también se encuentran próximos (7,98 y 5,62 kg mol⁻¹). La cristalinidad de las cadenas poliméricas aumenta durante el proceso de degradación, tal como se observa en DSC. Las medidas de ángulo de contacto muestran el incremento de hidrofiliidad debido a la presencia de oligómeros con grupos terminales hidrofílicos. En base a los resultados obtenidos, se infiere que los injertos se degradan principalmente debido al corte de las cadenas poliméricas de la región amorfa de ambos.

Como es sabido, normalmente la velocidad de degradación *in vitro* no es igual a la velocidad que tiene lugar en las condiciones *in vivo*, y por lo tanto no se puede comparar un estudio *in vitro* con la regeneración de tejido *in vivo*. El tiempo de regeneración de tejidos vasculares, entonces, puede aproximarse al tiempo de cultivo *in vitro* necesario para producir un injerto vascular mediante la técnica de láminas celulares, el que se estima en aproximadamente 8 semanas (Fernandez, 2014). Las capas interna y externa sufren una pérdida considerable del peso molecular en 34 semanas. Por otra parte, al tratarse de una estructura sometida a esfuerzos mecánicos, el mantenimiento de la integridad de la misma mientras el tejido se regenera es fundamental. Los injertos electrohilados se rigidizan y fracturan en las semanas 16 a 24, fenómeno que puede atribuirse a la elevada cristalinidad determinada por DSC. Se puede concluir entonces que el tiempo de regeneración del tejido *in vitro* concuerda con el tiempo de degradación en el cual se mantiene la integridad del injerto.

El estudio de la variación de las propiedades mecánicas del injerto en función del tiempo de degradación resulta de interés para abordar en un trabajo posterior. No obstante, los resultados obtenidos presentan una muy buena predicción de la relación entre los procesos de regeneración/degradación, y son muy alentadores para futuros estudios *in vivo*.

3.5. Bibliografía

- Araque-Monrós M.C., Vidaurre A., Gil-Santos L., Gironés Bernabé S., Monleón-Pradas M., Más-Estellés J., 2013. Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments, *Polymer Degradation and Stability*, 98: 1563-1570.
- Caracciolo P.C., Buffa F., Abraham G.A., 2009. Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes), *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20: 145-155.
- Cha Y., Pitt C.G., 1990. The biodegradability of polyester blends, *Biomaterials*, 11: 108-112.
- Chen C.-C., Chueh J.-Y., Tseng H., Huang H.-M., Lee S.-Y., 2003. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends, *Biomaterials*, 24: 1167-1173.
- Chu C.C., 1981. An in-vitro study of the effect of buffer on the degradation of poly(glycolic acid) sutures, *Journal of Biomedical Materials Research*, 15: 19-27.
- Dias J.C., Ribeiro C., Sencadas V., Botelho G., Gómez Ribelles J.L., Lanceros-Mendez S., 2012. Influence of fiber diameter and crystallinity on the stability of electrospun poly(L-lactic acid) membranes to hydrolytic degradation, *Polymer Testing*, 31: 770-776.
- Fernandez C.E., Achneck H.E., Reichert W.M., Truskey G.A., 2014. Biological and engineering design considerations for vascular tissue

engineered blood vessels (TEBVs), *Current Opinion in Chemical Engineering*, 3: 83-90.

- Fischer E.W., Sterzel H.J., Wegner G., 1973. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions, *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 251: 980-990.
- Gaona L.A., Gómez Ribelles J.L., Perilla J.E., Lebourg M., 2012. Hydrolytic degradation of PLLA/PCL microporous membranes prepared by freeze extraction, *Polymer Degradation and Stability*, 97: 1621-1632.
- Ginde R.M., Gupta R.K., 1987. In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 33: 2411-2429.
- Guelcher S.A., 2008. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine, *Tissue Engineering: Part B*, 14: 3-17.
- Hiljanen-Vainio M., Varpomaa P., Seppala J., Tormala P., 1996. Modification of poly(L-lactides) by blending: mechanical and hydrolytic behavior, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 197: 1503-1523.
- Kima K., Yu M., Zong X., Chiu J., Fang D., Seo Y.-S., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., 2003. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(d,l-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications, *Biomaterials*, 24: 4977-4985.
- Lendlein A., Colussi M., Neuenschwander P., Suter U.W., 2001. Hydrolytic Degradation of Phase-Segregated Multiblock Copoly(ester urethane)s Containing Weak Links, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 202: 2702-2711.
- Liu L., Ren Y., Li Y., Liang Y., 2013. Effects of hard and soft components on the structure formation, crystallization behavior and mechanical properties of electrospun poly(Llactic acid) nanofibers, *Polymer*, 54: 5250-5256.
- Mochizuki M., Hiramami M., 1997. Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters, *Polymers for Advanced Technologies*, 8: 203-209.

- Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S., 2005. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26: 7457-7470.
- Schmitt E.A., Flanagan D.R., Linhardt R., 1994. Importance of distinct water environments in the hydrolysis of poly(DL-lactide-co-glycolide), *Macromolecules*, 27: 743-748.
 - Van Krevelen D.W., 2009. *Calorimetric Properties in Properties of Polymers*, 4th ed., Van Krevelen D.W., te Nijenhuis K. (Editors), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 121.
 - Zhuo H., Hu J., Chen S., 2008. Electrospun polyurethane nanofibres having shape memory effect, *Materials Letters*, 62: 2074-2076.
 - Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B.S., Chu B., 2002. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer*, 43: 4403-4412.
 - Zong X., Ran S., Kim K.-S., Fang D., Hsiao B.S., Chu B., 2003. Structure and Morphology Changes during in Vitro Degradation of Electrospun Poly(glycolide-co-lactide) Nanofiber Membrane, *Biomacromolecules*, 4: 416-423.

Capítulo 4

**Estudio del desempeño mecánico de injertos
vasculares electrohilados**

4.1. Introducción

Las arterias naturales presentan una estructura jerárquica en capas, compuestas por distintas proporciones de colágeno, elastina, células de músculo liso, proteoglicanos y células endoteliales (Rhodin, 2014). Esta compleja estructura multicapa les confiere un desempeño mecánico propio. El carácter viscoelástico de la pared arterial, en conjunto con la viscosidad sanguínea, proporciona al sistema biológico una función de amortiguamiento. Por este motivo, la propagación de energía desde el corazón a la periferia del organismo se lleva a cabo sin que se produzca un fenómeno de resonancia en el sistema arterial tal como ocurriría si el sistema circulatorio fuera perfectamente elástico (O'Rourke, 1982; Shadwick, 1999).

Las arterias se encuentran sometidas a una presión interna de naturaleza pulsátil. Las propiedades de la pared arterial dependen del rol mecánico que desempeñan sus componentes pasivos (fibras de elastina y colágeno) y los componentes activos (células de músculo liso). Estos componentes determinan las propiedades elásticas, viscosas e inerciales del vaso, siendo la componente inercial despreciable (Armentano, 1995). En consecuencia, es posible identificar la contribución de cada componente a la respuesta elástica total. Los valores del módulo de Young de las fibras de colágeno y elastina son extremadamente distintos, y contribuyen individualmente a la elasticidad total de la arteria. Además, se observan cambios en la elasticidad bajo la activación de las células de músculo liso y el reclutamiento de las fibras de colágeno que soportan las tensiones de la pared arterial (Roach, 1957; O'Rourke, 1982; Armentano, 1991; Fung, 1993; Barra, 1993; Shadwick, 1999). La elastina es el principal protagonista de la función de amortiguamiento en el sistema circulatorio. Las fibras de colágeno están dispuestas de tal forma que actúan protegiendo al vaso de la ruptura por grandes deformaciones, limitando su expansión circunferencial. Esta configuración de las fibras de colágeno y elastina resulta en una respuesta elástica no lineal de la pared arterial (Bergel, 1961; Bergel 1961b;

Fung, 1993; Barra, 1993). Cuando las arterias son sometidas a presiones bajas, se observa una alta distensibilidad y baja rigidez, fenómeno atribuido fundamentalmente a las fibras de elastina. A medida que la presión aumenta, las fibras de colágeno se alinean y orientan, disminuyendo la distensibilidad de la arteria. Finalmente a presiones altas la respuesta mecánica se debe principalmente al colágeno presente, observando una alta rigidez en las arterias. Este comportamiento no lineal es conocido como curva “J” (Roach, 1957; Armentano, 1995; Sonoda, 2001). La figura 4.1. presenta la curva de la respuesta presión-diámetro típica para arterias coronarias de distintas edades.

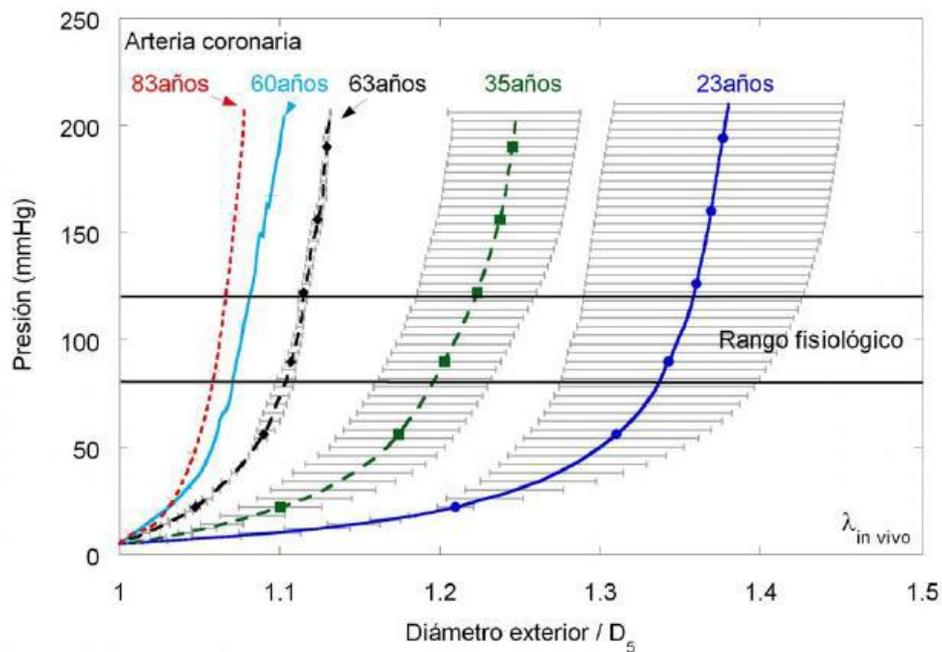


Figura 4.1. Curvas de presión-diámetro tipo “J” para arterias coronarias de seres humanos de distinta edad (Claes, 2010).

Los reemplazos de las arterias naturales, al igual que éstas, se encuentran sometidos a una presión cíclica y constante impuesta por el corazón que influye en el comportamiento de las células y los tejidos. Por lo tanto, el desempeño mecánico y consecuentemente las propiedades mecánicas de los materiales que constituyen los injertos vasculares son un factor

transcendental en su diseño para ingeniería de tejidos (Lee, 2010). La implantación de injertos o prótesis interrumpe la hemodinámica local y la distribución de tensiones en la pared arterial en la zona de anastomosis, causando restricciones mecánicas en las deformaciones de la arteria receptora durante el ciclo cardíaco (Rachev, 2011). Actualmente, los injertos sintéticos aprobados clínicamente presentan una alta probabilidad de falla *in vivo*, debido en la mayoría de los casos a una discrepancia mecánica con la arteria nativa (Lee, 2010). La discrepancia en la zona de anastomosis causa hiperplasia intimal y una reducción en la tasa de permeabilidad (Abbott, 1987). En particular, la discrepancia entre la *compliance* del injerto vascular y la arteria nativa conduce a una falla para periodos prolongados de implantación, especialmente para conductos de pequeño diámetro (Sonoda, 2001). Como resultado, no se logra un acuerdo geométrico, de tensiones y de deformaciones durante todo el ciclo pulsátil (Abbott, 1987). Teniendo en cuenta esto, la caracterización del desempeño mecánico de los injertos electrohilados juega un papel clave en el diseño y desarrollo de los mismos. En términos del comportamiento biomimético, los requerimientos principales de un injerto vascular incluyen tensión a la rotura, *compliance* mecánica y resistencia a la sutura, todos ellos comparados con los valores fisiológicos (Nerem, 2003).

En particular, las medidas simultáneas de la presión y el diámetro de los vasos sanguíneos y/o los injertos sintéticos poseen una gran relevancia en la investigación cardiovascular. El conocimiento de la respuesta del diámetro del injerto a las ondas de presión internas constituye la base de la construcción de los lazos tensión-deformación (Barra, 1993; Armentano, 1995; Gamero, 2001). En este sentido, las propiedades biomecánicas se pueden obtener *in vitro*, por medio de un diseño experimental, en donde se pueden reproducir condiciones hemodinámicas cercanas a las observadas en el intervalo fisiológico (Brum, 2010; Suárez-Bagnasco, 2013).

En este capítulo, se estudia el comportamiento mecánico de injertos vasculares monocapa y bicapa de polímeros sintéticos. Se estudian las propiedades del material en ensayos de tracción uniaxial en cámara

fisiológica (módulo elástico, resistencia y deformación a la rotura), la resistencia a la sutura, y el comportamiento del componente a través de la medición de *compliance*, módulo elástico y presión de reventado en ensayos *in vitro* en ambiente fisiológico de presión-diámetro.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

Se utilizaron matrices porosas de PLLA, PHD y sus mezclas PLLA/PHD (90/10, 50/50), obtenidas a partir de los parámetros descritos en las secciones 2.2.2.1. y 2.2.2.3. del capítulo 2, para los ensayos en tracción uniaxial. Se utilizaron los injertos bicapa descritos en la sección 2.2.2.3., con tres espesores de pared diferentes, para los ensayos de tracción, ensayos de sutura, ensayos de presión vs. diámetro a distintos L/L_0 , y ensayos de reventado. Los distintos espesores se obtuvieron en función del tiempo de electrohilado, utilizando un tiempo de 1,5 h para el espesor #1 ($0,11 \pm 0,03$ mm), de 3h para el #2 ($0,17 \pm 0,03$ mm) y de 4,5 h para el #3 ($0,23 \pm 0,04$ mm). A su vez se usaron injertos electrohilados de PLLA, PHD y bicapa PLLA/PHD para los ensayos de presión vs. diámetro en biorreactor. La composición y obtención de los mismos fue descrita en detalle en el capítulo 2 (Sección 2.2.2.3.).

4.2.2. Ensayos de tracción

Los ensayos de tracción uniaxial se realizaron en una máquina de ensayos universales (Instron 5866), equipada con un dispositivo diseñado especialmente para poder realizar los ensayos en ambiente fisiológico. Este dispositivo consta de una cámara de PMMA transparente que permite la visualización del ensayo, la cual se llena de suero fisiológico (suero fisiológico vitulia 0,9%, Laboratorios ERN, S.A., Barcelona, España) cuya temperatura se mantiene estable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante un baño termostático.

Se utilizó una celda de carga de 5 N y una velocidad de extensión de 0,03 mm/s. Se colocaron dos puntos en las probetas para seguir la evolución de la deformación de las mismas. Se registró el ensayo con una cámara digital y por medio del software Image J (National Institutes of Health, USA) se obtuvo la deformación axial de las probetas. La figura 4.2. muestra la máquina de ensayos universales utilizada y una probeta montada en la misma.

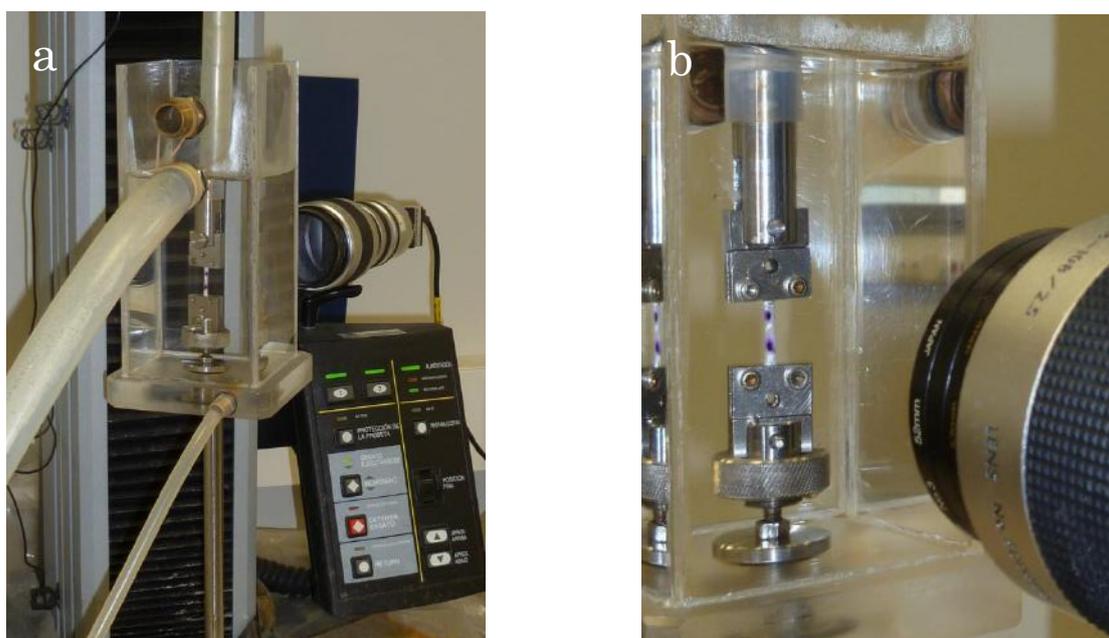


Figura 4.2. a) Máquina de ensayos universales utilizada para los ensayos de tracción, b) y probeta de injerto bicapa montada en la misma.

Se ensayaron matrices porosas de PLLA, PHD y sus mezclas PLLA/PHD (90/10, 50/50), e injertos bicapa en la dirección axial y circunferencial. Se utilizó un troquel en forma de hueso para obtener las muestras de las capas individuales ($n > 5$). La tracción de los injertos vasculares bicapa en la dirección axial y circunferencial, se realizó a partir de probetas rectangulares de 3x10 mm, dado que el tamaño del injerto impidió la utilización del troquel en la dirección circunferencial ($n > 5$). Se calcularon el módulo de Young, la resistencia y deformación a la rotura a partir de los resultados.

4.2.3. Ensayos de resistencia a la sutura

Se realizaron ensayos de sutura en injertos vasculares bicapa de 3 espesores distintos ($n = 6$). Los ensayos se efectuaron de acuerdo a la norma para injertos vasculares ISO 7198 (ANSI/AAMI/ISO, 2010). Se utilizó la máquina de ensayos universales (Instron 5866) utilizada en la sección 4.2.2., para realizar los ensayos en ambiente fisiológico. Se usó un hilo de sutura prolene® 5-0 (Ethicon, Inc., Johnson & Johnson). Los ensayos se realizaron en suero fisiológico a temperatura controlada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Se utilizó una celda de carga de 5 N y una velocidad de la travesa de 150 mm/min. Se realizaron dos tipos de suturas, una con nudo de lazo simple (Figura 4.3. a) y otra de lazo pasante (Figura 4.3. b). Se tiró del hilo de sutura hasta que la sutura desliza a través del injerto o causa el desgarro de la pared del injerto. Se reportó el valor de la carga máxima.

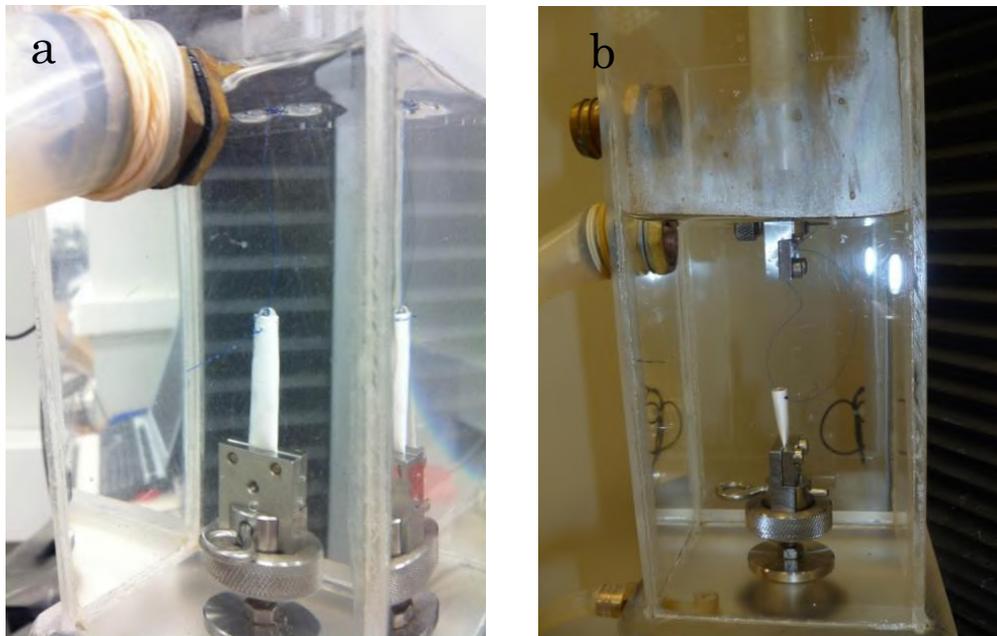


Figura 4.3. Ensayos de sutura, a) con nudo de lazo simple y b) con lazo pasante.

4.2.4. Determinación de la variación de diámetro con la presión aplicada

El comportamiento elástico de los conductos arteriales normalmente se estudia mediante la aplicación de la teoría elástica lineal, a pesar de la relación no-lineal de la presión-deformación y la anisotropía de pared (Armentano, 1995). Cuando la presión varía de sístole a diástole, la deformación es relativamente pequeña (menor al 5%), y la relación presión-diámetro es virtualmente lineal (Armentano, 1994). Entonces, las propiedades mecánicas se pueden analizar cuantitativamente a través de registros instantáneos de presión-diámetro. En este contexto, la determinación de los lazos de presión-diámetro constituye la técnica más apropiada para evaluar el comportamiento dinámico tanto *in vivo*, como *ex vivo*.

4.2.4.1. Ensayos dinámicos en biorreactor

Se utilizó un arreglo experimental que incluye un lazo circulatorio para la medición de la presión instantánea en los injertos vasculares. El simulador está formado por una bomba programable especialmente diseñada para impulsar el fluido hacia un circuito hidráulico cerrado, y un reservorio de fluido con un sistema de fijación de muestra ajustable (Balay, 2010). El circuito se compone de tubos de silicona, el injerto vascular y el reservorio de fluido (Figura 4.4. a). Se usan constricciones variables para ajustar la resistencia periférica y las ondas de presión reflejadas (Suárez-Bagnasco, 2013). La frecuencia del pulso se puede ajustar de modo que imite el pulso sanguíneo de un humano adulto normal, generalmente comprendido entre 60 y 80 latidos por minuto, en condición basal. Las muestras se colocaron en el sistema de fijación ajustable que forma parte del reservorio de fluido. El reservorio se llenó con solución fisiológica (solución de Tyrode), con $\text{pH} = 7,4$ y burbujeo de oxígeno. La temperatura se mantuvo en $37 \pm 2^\circ\text{C}$. La presión se midió con un sensor de presión en estado sólido de

respuesta a alta frecuencia (Konigsberg P2.5S, 1200 Hz) suturado en el centro del injerto. El diámetro externo de la muestra se obtuvo mediante la técnica *gold-standard* de sonomicrometría (unidad central System 6 con el módulo sonomicrómetro, Triton Technology Inc., San Diego, CA, USA). Los cristales de ultrasonido (5 Mhz) se colocaron lo más cerca posible del sensor de presión de forma de evitar un comportamiento viscoso indeseable. El posicionamiento óptimo de los medidores dimensionales fue asistido por un osciloscopio. El espesor de la pared se midió a través de una punta A-scan (Panametrics Inc., Massachusetts, USA) (Figura 4.4. b) montada en un sistema de posicionamiento y técnicas de ultrasonido de alta resolución (Balay, 2010). Las señales de presión y diámetro se adquirieron a 2000 muestras por segundo usando un módulo de adquisición de datos de 12-bits (NI USB-6009) durante intervalos de 15 segundos. La adquisición y procesamiento de señales se llevó a cabo con una aplicación de Matlab (Mathworks Inc., San Diego, USA) especialmente desarrollada. Cada ensayo se repitió cuatro veces.

El análisis de presión-diámetro se desarrolló de acuerdo a la norma internacional norteamericana ISO 7198 (ANSI/AAMI/ISO, 2010). Los lazos presión-diámetro obtenidos se evaluaron en el intervalo de presiones de 80 a 120 mmHg, que corresponde al intervalo fisiológico. También se midieron en los intervalos 50 a 90 mmHg y 110 mmHg a 150 mmHg para completar la caracterización establecida en la norma. Se utilizaron injertos vasculares monocapa de PHD y PLLA, así como también injertos bicapa ($n > 3$).

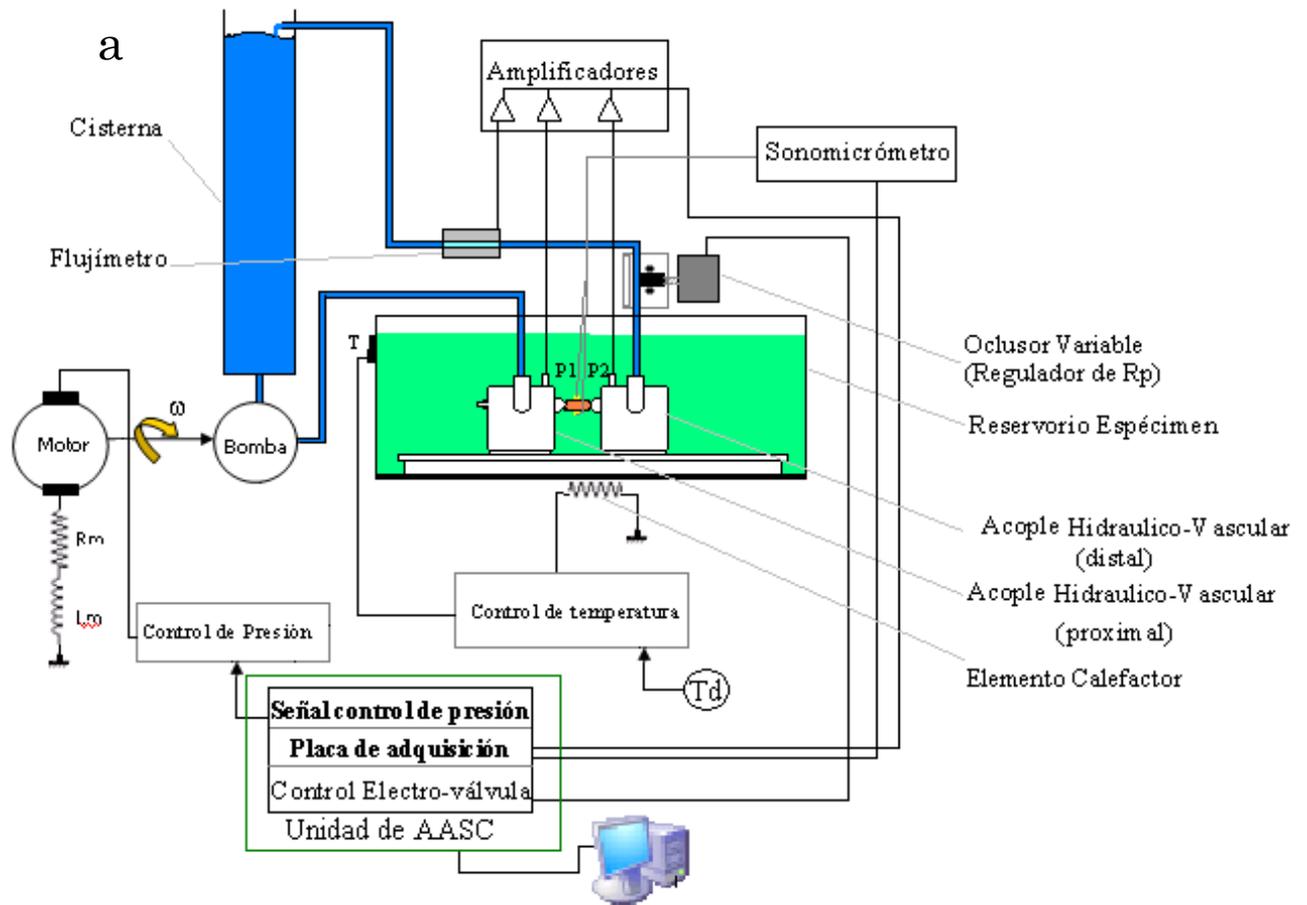




Figura 4.4. a) Esquema del montaje experimental usado (adaptado de Falasco, 2005). b) Fotografía del montaje utilizado para medir espesores mediante sistema A-scan: 1) reservorio de líquido, 2) sistema de posicionamiento gradual mecánico, y 3) muestra colocada en el sistema de posicionamiento durante la medición del espesor.

La respuesta elástica de los injertos se evaluó mediante dos parámetros, *compliance* dinámica (%C) y módulo elástico incremental (E_{pe}). Se calculó la %C definida según la norma ISO 7198 (ANSI/AAMI/ISO, 2010):

$$\%C = \frac{R_S}{P_S} \frac{R_D}{P_D} \sim 10^4 \quad (4.1.)$$

donde P_S es el valor de presión máxima (sístole, mmHg) y P_D es el valor de presión mínima (diástole, mmHg). R_S y R_D son los radios internos correspondientes (mm). La *compliance* dinámica circunferencial calculada según (4.1.) se expresa como un porcentaje de la variación del diámetro por 100 mmHg. Se asume que la pared es elástica e incompresible, y sigue la teoría lineal.

Se estimó el modulo elástico incremental (E_{PE}) a una presión media, para cada intervalo de presiones de acuerdo a trabajos previos (Armentano, 1994):

$$E_{PE} = \frac{dP}{dH_{pm}} \quad (4.2.)$$

$$H = \frac{D}{D_0} \quad (4.3.)$$

donde P constituye la presión transmural y ε es la deformación correspondiente, obtenida al dividir el diámetro dinámico (D) sobre el diámetro inicial sin tensiones (D_0); y p_m la presión media. Además, se calculó la tensión circunferencial de pared media (σ_m) mediante:

$$\sigma_m = P_m \frac{R_m}{h} \quad (4.4.)$$

donde P_m es la presión interna aplicada, R_m el radio medio correspondiente y h el espesor de pared. Se determinó la relación diámetro-presión para todas las muestras de injertos vasculares.

4.2.4.2. Ensayos de presión vs. diámetro a distintos L/L_0

Los injertos vasculares bicapa se sometieron a presión interna a distintos valores de alargamiento axial. El ensayo se realizó en un montaje diseñado especialmente para la caracterización de injertos vasculares y/o arterias (Figura 4.5). Este consta de una cámara de PMMA transparente que permite la visualización del ensayo, la cual se llena de suero fisiológico. La temperatura de la cámara fisiológica se mantiene estable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante un baño termostático. Todo el dispositivo está montado en una máquina de ensayos universales Instron 4411, la cual permite efectuar la tracción de los injertos en forma axial. La presión en el interior de los injertos se aplicó mediante un circuito auxiliar de suero fisiológico también a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, impulsado por aire comprimido. La presión se midió en la entrada al injerto con un transductor de alta precisión (Hirschmann PMP 4070, precisión 0,15 mmHg) cuya señal se envió al sistema de adquisición de datos. El alargamiento y la fuerza axial se midieron a través de la máquina de ensayos universales. El diámetro exterior del injerto se midió en la zona central mediante un extensómetro óptico (Keyence LS-7500, precisión 1 μm). El diámetro también se midió mediante video-extensometría con una cámara digital, el video resultante fue procesado con el software Image J (National Institutes of Health, USA) y la variación del diámetro se midió mediante un algoritmo programado en Matlab (Mathworks Inc., San Diego, USA). Los injertos se fijaron mecánicamente y con adhesivo a base de cianoacrilato por sus extremos en los cabezales diseñados a medida de la máquina de ensayos.

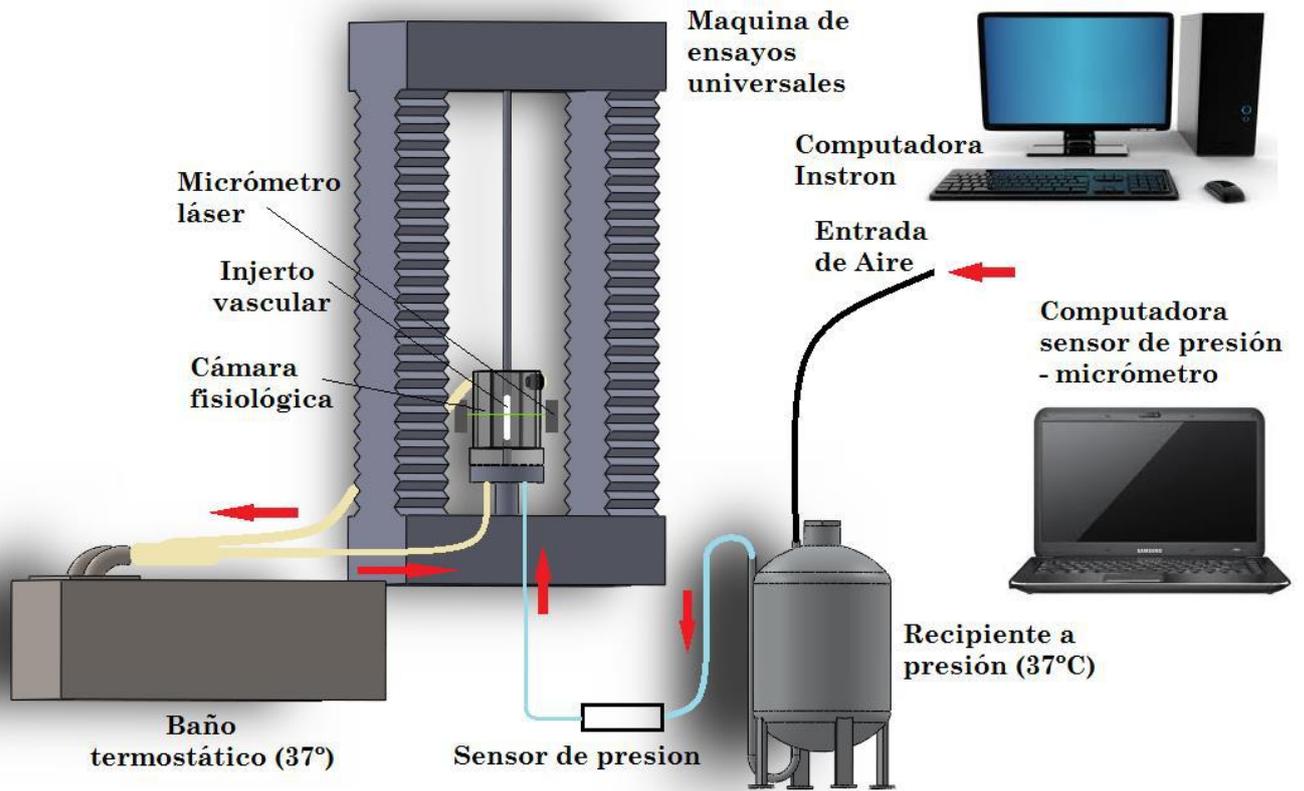


Figura 4.5. Esquema del montaje experimental usado. Aire (línea negra), suero fisiológico para interior del injerto (línea celeste), y suero fisiológico para mantener la cámara a temperatura controlada (línea amarilla).

Cada grupo de injertos (espesores #1-#3) se ensayó bajo diferentes niveles de alargamiento axial ($L/L_0 = 1, 1,05$ y $1,1$). Se realizaron ciclos de presión en el intervalo fisiológico extendido (50-200 mmHg) y se registró la presión y el diámetro externo. La figura 4.6. muestra el injerto montado en la máquina de ensayos. Se ensayaron injertos de distinto espesor #1-#3, siendo #1 el de menor espesor ($n > 4$).



Figura 4.6. Equipamiento utilizado para los ensayos de presión-diámetro.

4.2.5. Ensayos de presión de reventado

Utilizando el mismo equipamiento descrito en la sección 4.2.4.2., se ensayaron los injertos bicapa hasta la rotura. Se estudió la resistencia al reventado en función del espesor del injerto y del alargamiento axial de la muestra. Se utilizaron los espesores analizados en los ensayos de presión diámetro ($n > 5$), y $L/L_0 = 1$ y $1,1$.

4.3. Resultados

4.3.1. Ensayos de tracción

En la figura 4.7. se observan las curvas de tensión-deformación obtenidas para las matrices nanofibrosas de los polímeros puros, las mezclas presentes en las capas individuales y los injertos bicapa en la dirección axial y circunferencial.

Al analizar las curvas resultantes de PLLA, PHD y sus mezclas 90:10 y 50:50, se aprecia como las mezclas presentan un comportamiento intermedio al de los materiales que las conforman (Figura 4.7. a). Además, se graficaron las curvas de los componentes puros en las unidades necesarias (datos no presentados) para comparar con el comportamiento del colágeno y la elastina de bibliografía (Roach, 1957; Armentano, 1991). La curva de PHD, presentó una forma similar a la elastina presentando un comportamiento elástico hasta la rotura y ausencia de fluencia. El PLLA, en su zona elástica, presenta un comportamiento más rígido, con una pendiente más elevada similar a la observada por el colágeno.

Los módulos de Young obtenidos se presentan en la tabla 4.1. El PHD presenta un valor muy cercano al observado para la elastina en arterias naturales, $0,56 \pm 0,27$ MPa comparado con $0,49 \pm 0,18$ MPa (Armentano, 1991) y $0,1 - 0,15$ MPa (Salvucci, 2009). El módulo obtenido para el PLLA es un orden de magnitud menor que el presentado por el colágeno 131 ± 64 MPa (Armentano, 1991). Sin embargo, el valor es del orden del módulo de elasticidad observado en el intervalo de altas presiones para arterias naturales ($5 - 17$ MPa), asociado a la activación de las fibras de colágeno (Salvucci, 2009). Este resultado confirma su elección como componente rígido para resistir la presión sanguínea a altas presiones. Estos resultados corroboran la hipótesis que el PHD electrohilado presenta un comportamiento mecánico similar a la elastina y el PLLA electrohilado al colágeno.

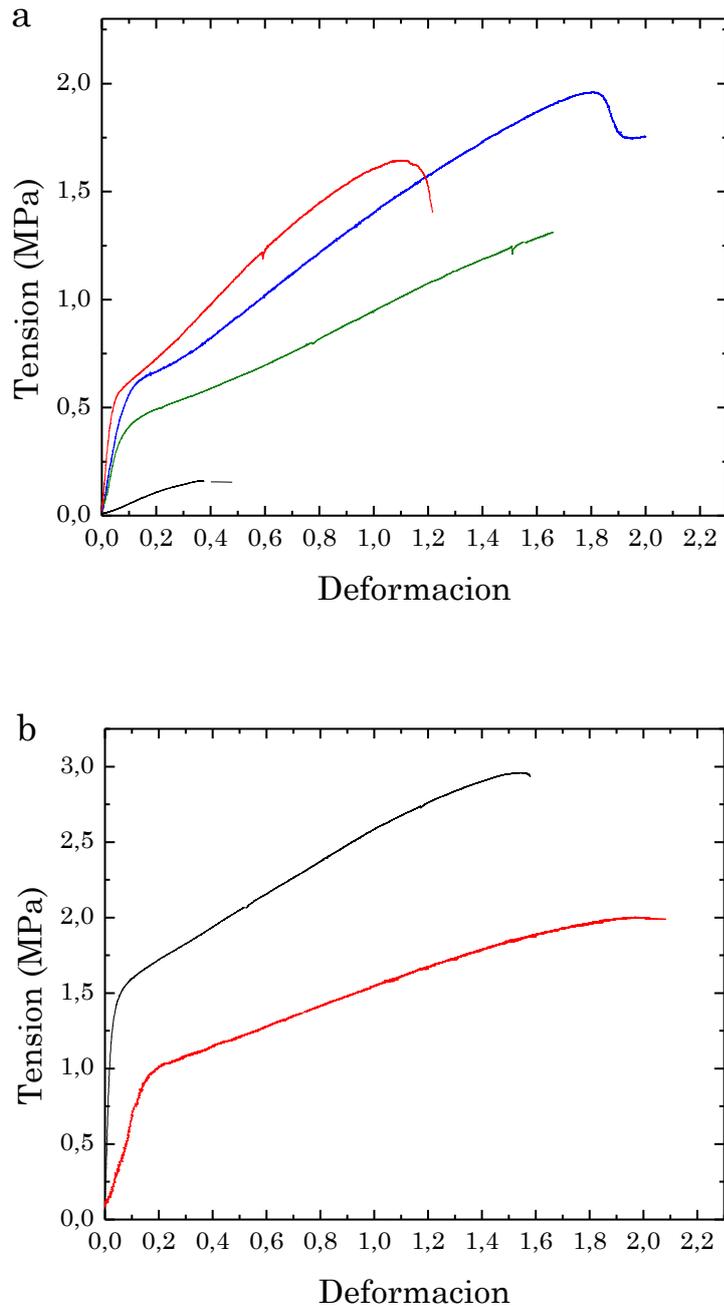


Figura 4.7. Curvas tensión deformación para a) las matrices nanofibras de los polímeros puros (PLLA rojo, PHD negro), y las mezclas presentes en las capas individuales (externa azul, interna verde), y b) los injertos vasculares bicapa en dirección axial (negro) y circunferencial (rojo).

Tabla 4.1. Módulo de Young de PLLA, PHD y sus mezclas formando las capas interna y externa.

	Módulo de Young (MPa)
PLLA	13,76 ± 2,71
Externa	7,34 ± 1,69
Interna	6,30 ± 1,20 [#]
PHD	0,56 ± 0,27

[#] igualdad estadística significativa ($p < 0,05$) con respecto a la capa externa.

El módulo de la capa externa, la cual posee 90% de PLLA, es mayor al de la capa interna, con menor cantidad de PLLA. A pesar de esta tendencia creciente, los valores no presentan diferencias significativas entre sí. Se esperaba obtener una mayor diferencia en la rigidez de las mezclas utilizadas, sin embargo en otros trabajos donde evalúan las propiedades mecánicas de matrices electrohiladas de mezclas se observa un comportamiento similar (McClure, 2010). Es evidente que el módulo elástico de la mezcla de los distintos polímeros no sigue una ley de mezclas. Se considera que este efecto se debe a la naturaleza nanofibrosa y aleatoria de las matrices ensayadas. Algunos grupos han estudiado como diferentes parámetros del material y las matrices nanofibrosas (diámetro de fibra, curvatura y alineación de la fibra, flexibilidad, rigidez del material, etc.) afectan la respuesta mecánica de las mismas (Pai, 2011; Rizvi, 2012). Al tratarse de un material donde las fibras no están todas en la dirección en la cual se aplica la carga, la respuesta dependerá de cuantas fibras se alinean y reclutan durante el ensayo de tracción. La respuesta es dependiente de la cantidad de fibras que efectivamente soportan la carga y difiere a la de una muestra sólida del mismo material. Por este mismo motivo el tamaño de las probetas influye en la respuesta mecánica. Por ejemplo, si se tiene una muestra de 2W de espesor y esta se corta en dos de espesor W, las fibras que atravesaban el espesor 2W de una esquina a la opuesta y soportaban carga, ahora probablemente no lo hagan.

Las curvas de tracción de los injertos bicapa, muestran una anisotropía en los mismos, siendo el módulo elástico menor en la dirección circunferencial que en la axial (Figura 4.7. b).

El módulo de elasticidad en la dirección circunferencial (Tabla 4.2.) obtenido para el injerto bicapa no presenta diferencias significativas con respecto a los módulos de las capas interna y externa ($p < 0,05$). Además, el valor obtenido al aplicar el modelo desarrollado por X. Lu *et al.*, que relaciona los módulos de ambas capas con el módulo total según la ecuación 4.5., tampoco presenta diferencias significativas con el valor medido experimentalmente ($p < 0,05$) (Lu, 2004).

$$E_{bicapa} = \frac{h_{int}}{h} E_{int} + \frac{h_{ext}}{h} E_{ext} \quad (4.5.)$$

donde E_{bicapa} , E_{int} y E_{ext} son los módulos del injerto bicapa, la capa interna y la externa respectivamente, h , h_{int} y h_{ext} son los espesores del injerto bicapa, la capa interna y la externa respectivamente.

Tabla 4.2. Módulo de Young, resistencia a la rotura y deformación a la rotura en las direcciones circunferencial y axial de los injertos bicapa.

	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la rotura (MPa)	Deformación a la rotura (%)
Circunferencial	8,14 ± 2,03 [#]	2,2 ± 0,30	135,57 ± 31,73
Axial	35,98 ± 10,63	2,64 ± 0,26	118,2 ± 22,29

[#] igualdad estadística significativa ($p < 0,05$) con respecto a la capa interna y externa.

La mayor rigidez observada en la dirección axial, si bien reportada para arterias y venas naturales, es superior a la del componente más rígido de la mezcla (PLLA). Las propiedades observadas para matrices nanofibras, si bien están relacionadas con las propiedades del material, no son estrictamente propiedad del material y dependen de la cantidad de fibras reclutadas durante el ensayo. De esta forma, se considera que en la

dirección axial más fibras se alinean y soportan la carga que en la dirección circunferencial, y más aún que en las matrices de los materiales puros ensayadas. Se han reportado módulos de Young de PLLA electrohilado de 45 - 90 MPa dependiendo de la cantidad de fibras alineadas en la dirección de la carga (Pu, 2014).

E. Claes *et al.* analizaron el comportamiento mecánico de arterias coronarias y de las arterias y venas utilizadas como *bypass* (en caso de afecciones coronarias) provenientes de cadáveres para donación de órganos y en consecuencia sin patología vascular, en colaboración con el Hospital Marqués de Valdecilla de Santander (Claes, 2010). Estos ensayos se realizaron con el mismo equipamiento utilizado para la caracterización de los injertos electrohilados bicapa en tracción y presión-diámetro, se dispuso de los datos obtenidos y se los utilizó a modo comparativo. Dentro de las arterias utilizadas se contó con arterias coronarias provenientes de pacientes de mediana edad (< 40 años), denominadas en los párrafos siguientes como arterias coronarias jóvenes, y otras provenientes de pacientes de edad avanzada (> 40 años), denominadas arterias coronarias envejecidas. En cuanto a las arterias mamarias, radiales y las venas safenas utilizadas, estas son procedentes de pacientes de edad avanzada (> 40 años) y por lo tanto denominadas como vasos sanguíneos envejecidos en los párrafos siguientes.

Las arterias coronarias caracterizadas presentaron un comportamiento similar a los injertos bicapa, en donde la dirección axial presenta mayor rigidez, no obstante la anisotropía en las arterias es mucho mayor que la observada con los injertos vasculares. Esta anisotropía se refleja preferentemente en la forma de la curva de tracción mas que en los valores de los módulos elásticos medidos ($E_{circ} = 1-2$ MPa, $E_{axial} = 4-6$ MPa). Las arterias y vasos sanguíneos no presentan una zona lineal, por lo tanto se adopta una convención para medir el módulo de Young a una deformación fija (Claes, 2010). Por el contrario, la curva de tensión en función de la deformación para los injertos electrohilados presenta un comportamiento típico de material polimérico sintético, con una zona de deformación elástica

bien definida seguida por otra de deformación plástica. En este caso no se obtiene un comportamiento tipo “J” tan pronunciado como el observado en las arterias. Sin embargo a muy bajas deformaciones puede apreciarse aún una “J” menos pronunciada, resultante del reclutamiento de las fibras en la dirección de la carga axial (Rizvi, 2012). Este comportamiento es más evidente en la configuración de los ensayos presión-diámetro. Esto se debe a la dirección de la sollicitación, como se explica más adelante.

El módulo elástico de los injertos bicapa presenta un valor superior a los presentados por las arterias coronarias naturales ($E_{\text{circ}} = 1\text{-}2$ MPa, $E_{\text{axial}} = 4\text{-}6$ MPa). Este valor también es mayor que los obtenidos para las arterias radiales, mamarias y venas safenas ($E_{\text{circ}} = 2,5\text{-}7,5$ MPa y $E_{\text{axial}} = 12\text{-}16$ MPa) aunque más próximo (Claes, 2010). Sin embargo, éstos valores se calcularon a una deformación fija por convención por lo tanto son comparables sólo cualitativamente. Donovan *et al.* publicaron valores mayores de módulo de Young para venas safenas de humanos, las cuales también mostraron anisotropía entre la dirección axial y circunferencial ($E_{\text{circ}} = 43$ MPa y $E_{\text{axial}} = 130$ MPa) (Donovan, 1990).

En cambio, los valores de resistencia y deformación a la rotura son valores comparables. Los injertos bicapa presentaron valores del orden de los obtenidos para arterias naturales. E. Claes *et al.* obtuvieron tensiones de rotura entre 0,5 y 2 MPa (salvo para las arterias coronarias jóvenes en la dirección axial, que se obtuvo un valor de 3 MPa) para arterias coronarias (Claes, 2010). Se observó una leve anisotropía siendo la dirección axial la que presentó una mayor resistencia. Las arterias radiales, mamarias y venas safenas presentaron mayor resistencia a la rotura y mayor anisotropía que las coronarias, con valores entre 1,5-4 MPa. La deformación a la rotura presentó valores similares para arterias coronarias, radiales, mamarias y venas safenas, encontrándose estos en el intervalo del 40-100 %. En este caso se obtuvo una anisotropía bastante menor y ausente en las venas safenas, siendo mayor la deformación en la dirección circunferencial.

Las propiedades obtenidas para los injertos bicapa muestran una menor rigidez con respecto a los injertos vasculares comerciales actuales

como el Dacron® y el ePTFE, los cuales fallan entre otros factores, debido a esta alta rigidez. El Dacron presentó un módulo elástico de 14000 MPa y una resistencia a la rotura entre 170 y 180 MPa (Kannan, 2005). El ePTFE posee una rigidez de 500 MPa y una resistencia en tensión de 14 MPa.

Al comparar los resultados obtenidos con otros injertos electrohilados, se observa que en general estos presentan un módulo, una tensión y una deformación a la rotura del mismo orden. Los injertos de una mezcla de PCL y colágeno mostraron un módulo de $2,7 \pm 1,2$ MPa, una resistencia de $4,0 \pm 0,4$ MPa y una deformación de 140 ± 13 % (Lee, 2008). El mismo grupo desarrolló un injerto a partir de una mezcla de colágeno, elastina y PDLGA, el cual presentó una menor deformación a la rotura (40%) y una respuesta isotrópica (Stitzel, 2006). S. Drilling *et al.* obtuvieron una alta dispersión en las propiedades de injertos electrohilados de PCL en función de los solventes utilizados. El módulo se encontró en el intervalo de 5-35 MPa, la resistencia entre 2-6 MPa y la deformación entre 100-250 % (Drilling, 2009). Se obtuvo una resistencia a la rotura de $5,2 \pm 0,7$ MPa, un módulo de $35,9 \pm 7,7$ MPa, y una deformación de $146,7 \pm 0,6\%$, para injertos multicapas electrohilados de varios poliésteres y gelatina (Han, 2013). El grupo de G.L. Bowling también desarrolló injertos electrohilados multicapas, sin embargo las propiedades en tracción fueron caracterizadas para cada capa por separado (McClure, 2010; McClure, 2012). Las capas de distintas mezclas de colágeno, elastina, fibrina de seda y PCL presentaron un módulo de 2-12 MPa, una resistencia en el intervalo de 0,5-6,5 MPa y una deformación entre 30 y 150%.

También se desarrollaron injertos híbridos de fibrina de seda electrohilada y colágeno, estos presentaron una resistencia a la rotura de $3,17 \pm 0,32$ MPa y una deformación de $58,96 \pm 4,07$ % (Marelli, 2012). Se obtuvieron valores similares de resistencia y deformación a la rotura, $1,03 \pm 0,07$ MPa - $0,34 \pm 0,12$ MPa y 30-50% respectivamente, para injertos no-electrohilados de polímeros naturales como el colágeno (Ghezzi, 2012).

Las arterias naturales poseen una respuesta mecánica característica cuyo comportamiento difícilmente se observa en un ensayo de tracción uniaxial de materiales sintéticos. Sin embargo, se obtuvieron valores de

módulo elástico en el orden de vasos sanguíneos humanos y mejores que los injertos sintéticos actualmente utilizados. Las propiedades a rotura obtenidas para los injertos bicapa son comparables y en algunos casos superiores a los injertos desarrollados por otros grupos.

4.3.2. Ensayos de resistencia a la sutura

Se prepararon dos tipos de suturas, una con nudo de lazo simple y otra de lazo pasante. Se observó que el nudo de lazo simple, en la mayoría de los casos, deslizaba al realizar el ensayo. De esta forma, el valor de resistencia obtenido presenta un límite inferior en la resistencia a la sutura de los injertos. Mediante los ensayos con lazo pasante, se aseguró obtener el valor de resistencia al rasgado del injerto por la sutura; obteniéndose un límite superior a la resistencia a la sutura. Los valores obtenidos para los injertos de los tres espesores estudiados se presentan en la tabla 4.3. La tendencia muestra como la resistencia a la sutura aumenta a medida que aumenta el espesor de los injertos. Los valores obtenidos para el espesor #1 con respecto al espesor #2 y el #3 son estadísticamente distintos ($p < 0,05$). No obstante, la resistencia a la sutura de los injertos de espesor #3 con respecto al #2 es estadísticamente igual. Esto se cumple para ambos tipos de sutura.

Tabla 4.3. Resistencia a la sutura de los injertos vasculares bicapa

	Resistencia a la sutura / nudo simple	Resistencia a la sutura / lazo pasante
espesor 1	$0,98 \pm 0,25^{a,b}$	$1,63 \pm 0,24^{a,b}$
espesor 2	$1,46 \pm 0,35^b$	$2,28 \pm 0,23^b$
espesor 3	$1,55 \pm 0,42^a$	$2,45 \pm 0,27^a$

^{a, b} indican diferencia estadística ($p < 0,05$) para los injertos de espesor 1 comparados con los de espesor 3 y con los de espesor 2, respectivamente

En este caso se compararon los resultados obtenidos con valores de arterias y venas de origen animal y humano encontrados en bibliografía.

Las arterias aorta y carótida porcinas presentaron valores de 2,5-3,3 N (Drilling, 2009), mientras que la arteria aorta murina mostró una

resistencia de $1,7 \pm 0,7$ N (Bergmeister, 2013). Por otro lado la arteria mamaria humana presenta una resistencia a la sutura de $1,4 \pm 0,01$ N, mientras que la vena safena tiene una resistencia de $1,81 \pm 0,02$ N (Konig, 2009). Estos valores de resistencia de los vasos sanguíneos son del orden de los obtenidos para los injertos bicapa.

S. Drilling *et al.* produjeron injertos electrohilados de PCL con resistencia a la sutura en el intervalo de 1-5 N (Drilling, 2009). Los injertos electrohilados de una mezcla de PCL y colágeno mostraron un valor de resistencia a la sutura de $3,0 \pm 1,1$ N (Lee, 2008). En el caso de injertos bicapa obtenidos por una combinación de TIPS y electrohilado se obtuvo un valor similar, de 3,5 N (Soletti, 2010). Sin embargo, injertos de PEUU producidos por TIPS presentaron un valor inferior, $1,37 \pm 0,3$ N (Nieponice, 2008). Se logró un valor de $2,5 \pm 0,6$ N, para injertos multicapas electrohilados de varios poliésteres y gelatina (Han, 2013). El grupo de G.L. Bowling también desarrolló injertos electrohilados multicapas con resistencias a la sutura de 1 a 2,5 N (McClure, 2010). Se obtuvieron resistencias a la sutura menores, para injertos no-electrohilados de polímeros naturales como el colágeno, siendo estas en el intervalo de 1,14-1,48 N (Ghezzi, 2012). Las tubuladuras de fibrina de seda mostraron resistencias superiores a los injertos electrohilados 4-5,6 N (Liu, 2013). Sin embargo, R.E. McMahon *et al.* produjeron injertos de PEUU, poliéster y fibrina con una resistencia a la sutura de $1,16 \pm 0,08$ N (McMahon, 2011). Se obtuvieron valores de $1,49 \pm 0,49$ N para injertos cultivados *in vitro* a partir de células humanas autólogas (Konig, 2009).

G. Koing *et al.* establecieron que han implantado vasos con resistencia a la sutura tan baja como 0,74 N y que en ese caso no se observaron complicaciones (Konig, 2009).

Los valores de resistencia a la sutura encontrados en la literatura muestran que en general, los poliésteres y poliuretanos presentan resistencias a la sutura mayores. Además, los injertos electrohilados presentan propiedades superiores frente a injertos producidos por otra técnica de obtención de matrices porosas. Estos valores son comparables con

las resistencias de los injertos bicapa obtenidos en esta tesis y del orden incluso de las tubuladuras de menor espesor. Más aún los valores obtenidos son muy superiores a la resistencia mínima establecida por G. Konig *et al.* Estos valores verifican que los injertos producidos poseen la resistencia a la sutura necesaria para ser suturados en el sitio de anastomosis sin sufrir daños.

4.3.3. Determinación de la variación de diámetro con la presión aplicada

4.3.3.1. Ensayos dinámicos en biorreactor para injertos de PLLA y PHD

Se caracterizaron injertos electrohilados de PLLA y PHD mediante ensayos dinámicos en biorreactor. Se midió el espesor de la pared de los injertos vasculares con el sistema A-scan, a baja presión intraluminal. Los resultados se presentan en la tabla 4.4. Luego, se impusieron ondas de presión programadas por el sistema circulatorio y se midieron la presión interna instantánea y el diámetro externo para las muestras en cada intervalo de presiones. Las ondas obtenidas se observan en la figura 4.8. para un caso particular de PLLA.

Tabla 4.4. Medidas de espesor de la pared (h) mediante ultrasonido (sistema A-Scan).

Muestra	h (μm)
PLLA #1	$39,3 \pm 1,5$
PLLA #2	$41,0 \pm 1,0$
PLLA #3	$38,5 \pm 2,2$
PLLA #4	$37,4 \pm 1,7$
PLLA #5	$37,5 \pm 3,0$
PHD #1	$143,7 \pm 16,2$
PHD #2	$106,2 \pm 49,8$
PHD #3	$106,3 \pm 22,5$

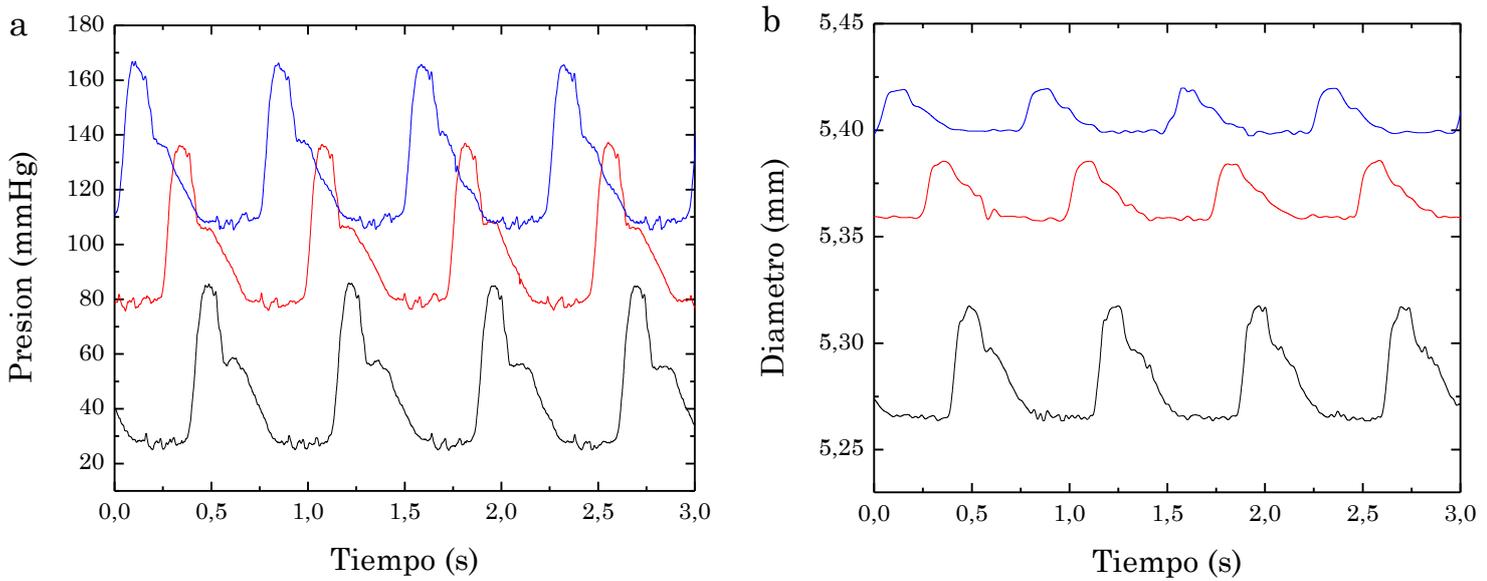


Figura 4.8. a) Ondas de presión aplicadas en los intervalos 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul). Frecuencia: 60 ± 5 latidos por minuto. b) Ondas de diámetro medido para los intervalos 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).

Los resultados de las medidas se presentan en la tabla 4.5. para los intervalos estudiados. La variación dinámica de la presión interna y del diámetro externo en sus valores máximos (sístole) y mínimos (diástole) se calcularon a partir de las señales obtenidas. También se calculó la σ_M .

La figura 4.9. presenta los lazos de presión versus diámetro medidos para el PLLA y el PHD.

Tabla 4.5. Medidas dinámicas para los intervalos de presión. PR: Intervalo de presión, P_s, P_D, D_S: diámetro externo en sístole, D_D: diámetro externo en diástole, y σ_M .

muestra	PR (mmHg)	P _s (mmHg)	P _D (mmHg)	D _S (mm)	D _D (mm)	σ_M (kPa)
PLLA #1	50-90	77,75 ± 0,49	49,75 ± 0,48	5,418 ± 0,001	5,396 ± 0,001	542 ± 4
	80-120	114,67 ± 0,45	83,41 ± 0,52	5,466 ± 0,001	5,449 ± 0,001	869 ± 5
	110-150	144,10 ± 0,77	111,64 ± 0,42	5,500 ± 0,001	5,482 ± 0,001	1141 ± 4
PLLA #2	50-90	104,18 ± 0,16	51,09 ± 0,22	5,360 ± 0,002	5,329 ± 0,001	598 ± 1
	80-120	127,22 ± 0,28	73,84 ± 0,26	5,378 ± 0,001	5,352 ± 0,001	799 ± 2
	110-150	154,41 ± 0,28	100,52 ± 0,32	5,379 ± 0,001	5,356 ± 0,001	1034 ± 2
PLLA #3	50-90	84,98 ± 0,43	24,96 ± 0,21	5,317 ± 0,001	5,264 ± 0,001	411 ± 2
	80-120	136,69 ± 0,41	76,43 ± 0,13	5,385 ± 0,001	5,358 ± 0,001	897 ± 2
	110-150	165,94 ± 0,47	105,53 ± 0,23	5,419 ± 0,001	5,398 ± 0,001	1177 ± 2
PLLA #4	50-90	103,53 ± 0,54	53,02 ± 0,69	5,410 ± 0,001	5,371 ± 0,001	671 ± 4
	80-120	138,06 ± 0,64	86,63 ± 0,70	5,513 ± 0,001	5,490 ± 0,001	1017 ± 5
	110-150	170,27 ± 0,49	119,47 ± 0,34	5,560 ± 0,001	5,542 ± 0,001	1350 ± 3
PLLA #5	50-90	99,20 ± 0,53	42,23 ± 1,04	5,346 ± 0,001	5,305 ± 0,001	579 ± 7
	80-120	127,92 ± 1,37	75,39 ± 0,22	5,393 ± 0,001	5,361 ± 0,001	888 ± 3
	110-150	160,89 ± 1,21	105,78 ± 0,55	5,435 ± 0,001	5,410 ± 0,001	1197 ± 6
PHD #1	50-90	82,72 ± 0,54	39,66 ± 0,52	4,714 ± 0,001	4,623 ± 0,001	116,6 ± 0,9
	80-120	107,98 ± 0,33	65,62 ± 0,33	4,802 ± 0,001	4,735 ± 0,001	176,0 ± 0,7
	110-150	142,84 ± 0,22	98,75 ± 0,20	4,939 ± 0,002	4,888 ± 0,002	258,2 ± 0,3
PHD #2	50-90	99,04 ± 0,73	38,35 ± 0,53	4,895 ± 0,001	4,804 ± 0,002	131,4 ± 1,0
	80-120	120,61 ± 1,31	61,18 ± 0,56	4,944 ± 0,002	4,873 ± 0,001	184,0 ± 1,2
	110-150	159,77 ± 1,42	98,02 ± 0,18	5,025 ± 0,001	4,974 ± 0,001	274,7 ± 1,1
PHD #3	50-90	92,38 ± 0,81	36,44 ± 0,23	4,984 ± 0,001	4,881 ± 0,001	125,6 ± 0,5
	80-120	119,75 ± 0,38	62,75 ± 0,34	5,074 ± 0,002	5,003 ± 0,001	190,7 ± 0,8
	110-150	169,42 ± 0,73	111,94 ± 0,56	5,213 ± 0,001	5,164 ± 0,001	315,1 ± 1,5
PLLA media ± SD	50-90	95,44 ± 10,02	43,69 ± 10,80	5,366 ± 0,038	5,327 ± 0,046	562 ± 91
	80-120	130,25 ± 7,63	78,74 ± 5,12	5,423 ± 0,055	5,398 ± 0,058	896 ± 75
	110-150	160,53 ± 8,47	108,30 ± 6,83	5,455 ± 0,066	5,433 ± 0,069	1183 ± 108
PHD media ± SD	50-90	91,38 ± 6,92	38,15 ± 1,43	4,864 ± 0,116	4,770 ± 0,111	124,6 ± 6,3
	80-120	116,11 ± 5,98	63,18 ± 1,93	4,940 ± 0,114	4,870 ± 0,113	183,6 ± 6,2
	110-150	157,34 ± 11,34	102,91 ± 6,59	5,059 ± 0,117	5,009 ± 0,119	282,7 ± 24,6

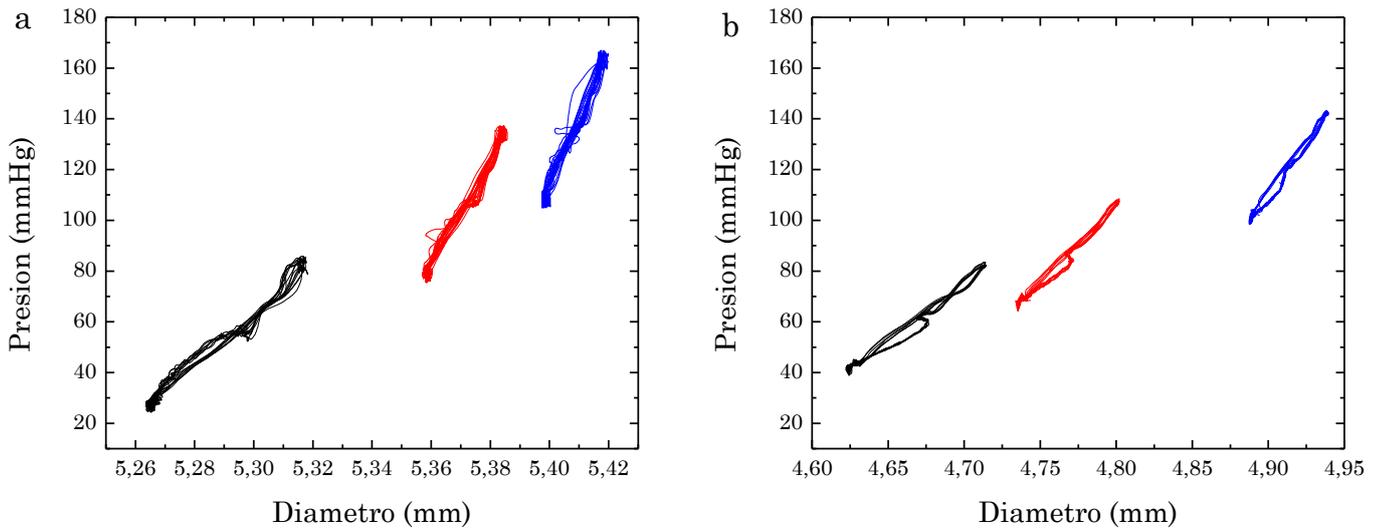


Figura 4.9. Lazo de presión versus diámetro para a) injertos vasculares de PLLA y b) PHD para 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).

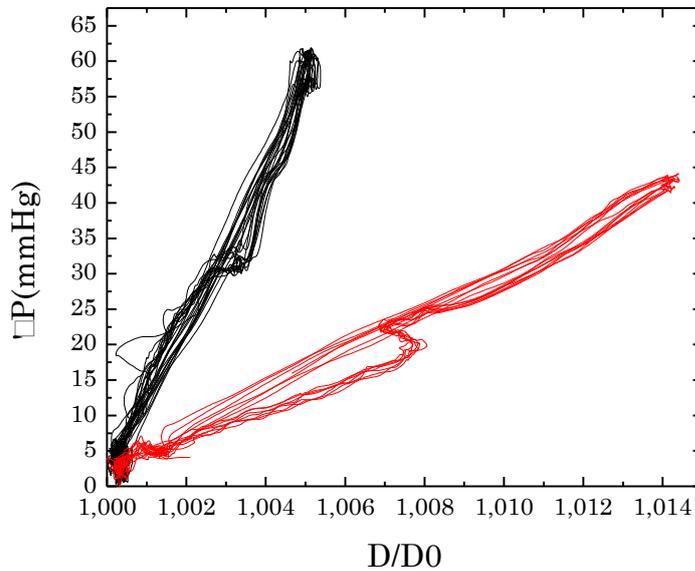


Figura 4.10. Variación de presión con respecto al valor mínimo de presión y el diámetro con respecto al valor mínimo para PLLA (negro) y PHD (rojo) en el intervalo fisiológico 80-120 mmHg.

Se graficaron los lazos de presión versus diámetro para el PLLA y el PHD entre 80-120 mmHg (Figura 4.10.) para comparar su desempeño en el

intervalo fisiológico de presiones. Se puede apreciar que el PLLA presenta una respuesta más rígida que el PHD.

Tabla 4.6. Propiedades mecánicas de los injertos vasculares: %C y $E_{P\Box}$

muestra	PR (mmHg)	%C (10^{-2} mmHg)	E_{Pe} (MPa)
PLLA #1	50-90	1,44 ± 0,08	1,04 ± 0,06
	80-120	0,99 ± 0,06	1,39 ± 0,08
	110-150	1,06 ± 0,05	1,30 ± 0,07
PLLA #2	50-90	1,09 ± 0,05	1,16 ± 0,05
	80-120	0,90 ± 0,01	1,50 ± 0,02
	110-150	0,80 ± 0,02	1,73 ± 0,05
PLLA #3	50-90	1,70 ± 0,01	1,12 ± 0,01
	80-120	0,85 ± 0,02	1,52 ± 0,04
	110-150	0,65 ± 0,03	2,00 ± 0,09
PLLA #4	50-90	1,36 ± 0,06	0,91 ± 0,04
	80-120	0,78 ± 0,03	1,55 ± 0,05
	110-150	0,61 ± 0,04	2,00 ± 0,04
PLLA #5	50-90	1,33 ± 0,01	1,05 ± 0,02
	80-120	1,13 ± 0,06	1,19 ± 0,06
	110-150	0,83 ± 0,05	1,59 ± 0,08
PHD #1	50-90	4,56 ± 0,08	0,35 ± 0,01
	80-120	3,35 ± 0,04	0,47 ± 0,01
	110-150	2,38 ± 0,04	0,61 ± 0,01
PHD #2	50-90	3,10 ± 0,09	0,47 ± 0,02
	80-120	2,46 ± 0,08	0,62 ± 0,02
	110-150	1,67 ± 0,06	0,82 ± 0,03
PHD #3	50-90	3,77 ± 0,04	0,41 ± 0,004
	80-120	2,47 ± 0,04	0,61 ± 0,01
	110-150	1,64 ± 0,03	0,76 ± 0,01
PLLA media ± SD	50-90	1,38 ± 0,21 ^{b,c}	1,06 ± 0,09 ^{b,c}
	80-120	0,93 ± 0,13 ^{a,c}	1,43 ± 0,15 ^{a,c}
	110-150	0,76 ± 0,15 ^{a,b}	1,76 ± 0,26 ^{a,b}
PHD media ± SD	50-90	3,81 ± 0,62 ^{b,c}	0,41 ± 0,05 ^{b,c}
	80-120	2,76 ± 0,43 ^{a,c}	0,57 ± 0,07 ^{a,c}
	110-150	1,90 ± 0,36 ^{a,b}	0,73 ± 0,09 ^{a,b}

a, b, c indican diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con 50-90 mmHg, 80-120 mmHg y 110-150 mmHg, respectivamente.

Los valores obtenidos para la *compliance* dinámica y el módulo elástico de presión-deformación, se presentan en la tabla 4.6. Se observa que la *compliance* disminuye significativamente en la mayoría de los casos, a

medida que la presión transmural aumenta. La misma dependencia de la presión se observa con el aumento en el módulo elástico de presión-deformación, lo cual demuestra el endurecimiento del injerto vascular. Como se mencionó en la sección 4.3.1. en las estructuras electrohiladas sometidas a tensiones, en este caso presiones internas, ocurre un reclutamiento parcial de la nanofibras presentes. Se considera que la variación de la *compliance* al aumentar la presión se debe a este comportamiento, el mismo efecto fue observado en otro trabajo con injertos vasculares electrohilados (McClure, 2010).

Por otro lado, se caracterizó la *compliance* dinámica y el módulo elástico de presión-deformación para arterias femorales de oveja, de forma de comparar el comportamiento mecánico de los injertos. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.7. Se observa que en el intervalo del colágeno la arteria es significativamente más rígida (una mayor pendiente en la curva presión-diámetro) que en el intervalo de la elastina.

Tabla 4.7. Propiedades mecánicas de arterias femorales ovinas: %C y E_{Pe} .

muestra	PR (mmHg)	%C (10^{-2} mmHg)	E_{Pe} (MPa)
#1	60-90	$8,69 \pm 1,64$	$0,185 \pm 0,036$
	100-130	$0,61 \pm 0,15$	$1,877 \pm 0,519$
#2	60-90	$8,25 \pm 0,52$	$0,170 \pm 0,013$
	100-130	$0,89 \pm 0,24$	$1,061 \pm 0,142$
#3	60-90	$7,42 \pm 0,33$	$0,178 \pm 0,013$
	100-130	$0,74 \pm 0,24$	$1,919 \pm 0,376$
#4	60-90	$9,75 \pm 0,44$	$0,129 \pm 0,003$
	100-130	$0,86 \pm 0,12$	$1,444 \pm 0,104$
media \pm SD	60-90	$8,52 \pm 1,15$	$0,166 \pm 0,030$
	100-130	$0,79 \pm 0,20^a$	$1,576 \pm 0,478^a$

^a indica diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con 100-130 mmHg

Los injertos vasculares se caracterizaron mecánicamente de manera satisfactoria. Se obtuvieron valores consistentes y repetitivos de *compliance* dinámica así como también módulo elástico. La desviación estándar fue similar a los valores obtenidos para arterias naturales.

Los injertos de PLLA mostraron la resistencia y rigidez suficiente para resistir presiones elevadas. Los injertos de PHD presentaron un comportamiento más elastomérico, con una naturaleza más distensible. Los resultados obtenidos revelan una variación significativa de la *compliance* y el módulo elástico de presión-deformación en los intervalos de presión estudiados. Se observa que a medida que el intervalo de presión aumenta los injertos se hacen más rígidos, siendo este efecto más pronunciado para los injertos de PLLA. Las arterias nativas presentan valores de *compliance* elevados a bajos valores de presión, los cuales disminuyen a medida que la presión aumenta (Lee, 2010). Este comportamiento se atribuye al reclutamiento de las fibras de colágeno y la activación de las células de músculo liso (Armentano, 1995). Al comparar con las arterias femorales, el comportamiento de los injertos vasculares de PLLA puede ser asociado al comportamiento del colágeno en las arterias femorales (100-130 mmHg). Por otro lado, los injertos de PHD presentan unas propiedades similares al intervalo de la elastina (60-90 mmHg). Este comportamiento se visualiza en los lazos de presión-diámetro de la figura 4.11. y corrobora lo observado en los ensayos de tracción (Sección 4.3.1.). Se confirma la hipótesis que el PLLA se comporta mecánicamente de modo similar al colágeno y con igual criterio el PHD se asemeja a la elastina.

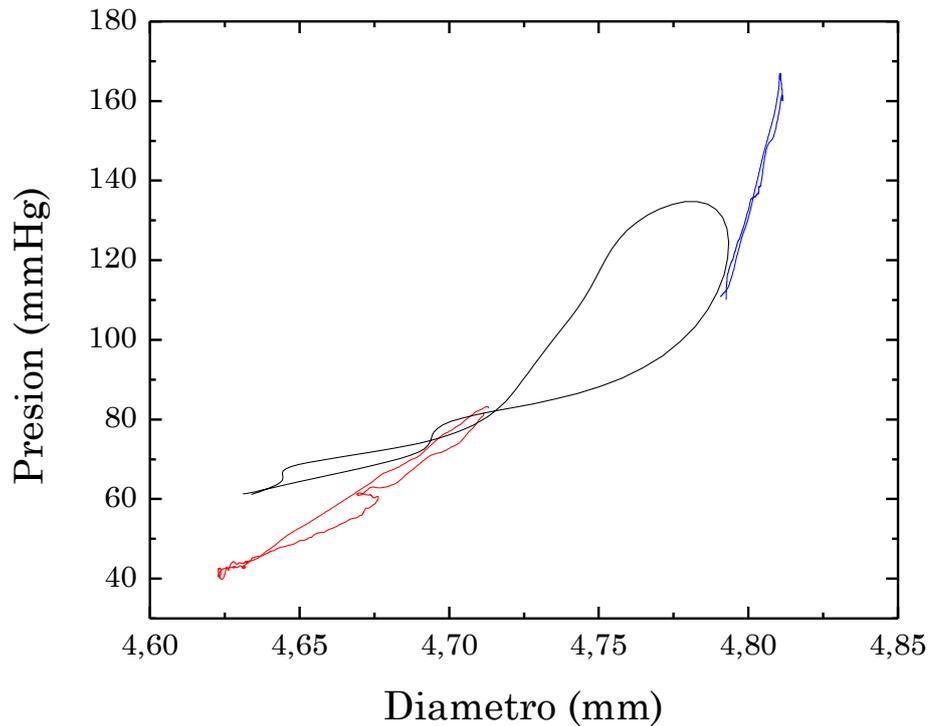


Figura 4.11. Lazo de presión - diámetro para injertos vasculares de PLLA a altas presiones (azul) y PHD a bajas presiones (rojo), y arteria femoral (negro).

4.3.3.2. Ensayos de presión vs. diámetro para injertos bicapa de distinto espesor

Se utilizó un equipamiento con menor precisión para evaluar la respuesta de injertos bicapa de diferente espesor, sometidos a distintos alargamientos axiales. Este equipamiento permitió seleccionar los injertos de mejor respuesta biomimética los cuales en la sección siguiente se ensayaron en forma dinámica en biorreactor (Sección 4.3.3.3). La figura 4.12. presenta las curvas promedio de presión en función de D/D_0 , siendo D el diámetro externo y D_0 el diámetro externo a una presión interna de 50 mmHg, para los injertos bicapa de los tres espesores estudiados para un alargamiento axial $L/L_0 = 1$. Los injertos bicapa imitan fielmente el

comportamiento tipo “J” de las arterias naturales en el intervalo fisiológico ampliado de presiones.

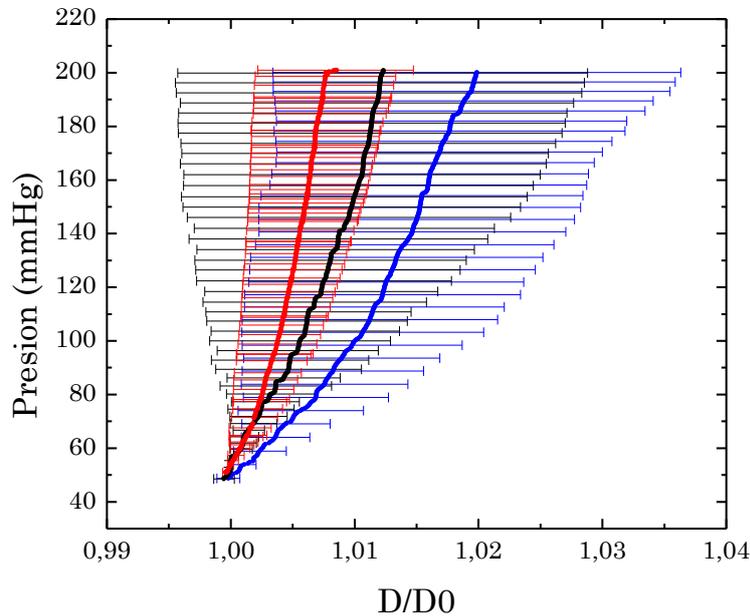


Figura 4.12. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro).

La respuesta mecánica tipo “J” se ha observado en injertos vasculares producidos a partir de cultivos celulares *in vitro* (Konig, 2009; Zahedmanesh, 2011) así como también en algunos casos donde se han empleado polímeros naturales como colágeno, elastina o fibrina (McMahon, 2011). Sin embargo, este comportamiento es difícil de lograr en injertos producidos únicamente con polímeros sintéticos. Estos presentan una respuesta contraria frente a la aplicación de una fuerza, en donde la deformación es pequeña y lineal al principio y luego soportan una mayor deformación para un pequeño aumento de carga. La importancia de obtener una respuesta biomimética ha llevado al desarrollado de estrategias para lograr una respuesta tipo “J”. H. Sonoda *et al.* desarrollaron un diseño de injerto vascular formado por dos capas concéntricas separadas una cierta distancia entre sí (Sonoda, 2001; Sonoda, 2003). Las propiedades de cada capa se diseñaron de forma tal que la capa interna presente un comportamiento similar a las arterias a bajas presiones y que el

comportamiento de ambas capas sea semejante a la respuesta arterial a altas presiones. Se fijó la distancia de separación entre las capas de forma que estas entren en contacto en el nivel de deformación al que comienzan a actuar las fibras de colágeno en una arteria natural. Lograron así obtener un diseño adaptable a la arteria que se desea reemplazar en función de las propiedades de las capas individuales y de la distancia de separación de las mismas. También, imitando la activación de las fibras de colágeno, H.S. Rapoport *et al.* desarrollaron un colector de diámetro variable que permite obtener una capa externa con fibras onduladas (Rapoport, 2012). Este diseño permite procesar la capa interna por la técnica de electrohilado sobre el colector rotatorio en su menor diámetro. Luego de aumentar el diámetro del colector se coloca una malla de poliéster unida a la capa interna con la misma solución de poliuretano de la capa interna, y se reduce el diámetro del colector a su dimensión inicial. De esta forma, al haber utilizado un material que soporta grandes deformaciones elásticas, la capa interna mantiene su diámetro inicial mientras que la capa externa se arruga formando ondulaciones que se activaran (al igual que el colágeno) a mayores presiones. Se obtiene un comportamiento tipo “J”, nuevamente moldeable según los materiales utilizados y el grado de expansión del diámetro del colector.

En esta tesis los injertos bicapa electrohilados presentan una estructura bicapa con una separación pequeña entre las mismas, como se observa en la sección 2.3.3. del capítulo 2. Por lo tanto, al igual que el diseño de H. Sonoda *et al.* (Sonoda, 2001; Sonoda, 2003), la capa interna, con mayor porcentaje de PHD, actúa a bajas presiones mientras que luego de una cierta deformación circunferencial, ambas capas se acoplan y soportan el aumento de la presión juntas. Se obtiene un comportamiento mecánico tipo “J” más pronunciado que el observado para los injertos monocapa, ya que el efecto del reclutamiento de las nanofibras a medida que la presión aumenta, se acopla al efecto de las dos capas separadas. Este efecto no se observa en los ensayos de tracción donde ambas capas son deformadas al mismo tiempo. En los ensayos presión-diámetro, en cambio, se obtiene la

deformación de la capa interna primero hasta que esta alcanza la dimensión de la capa externa y continúan deformando conjuntamente.

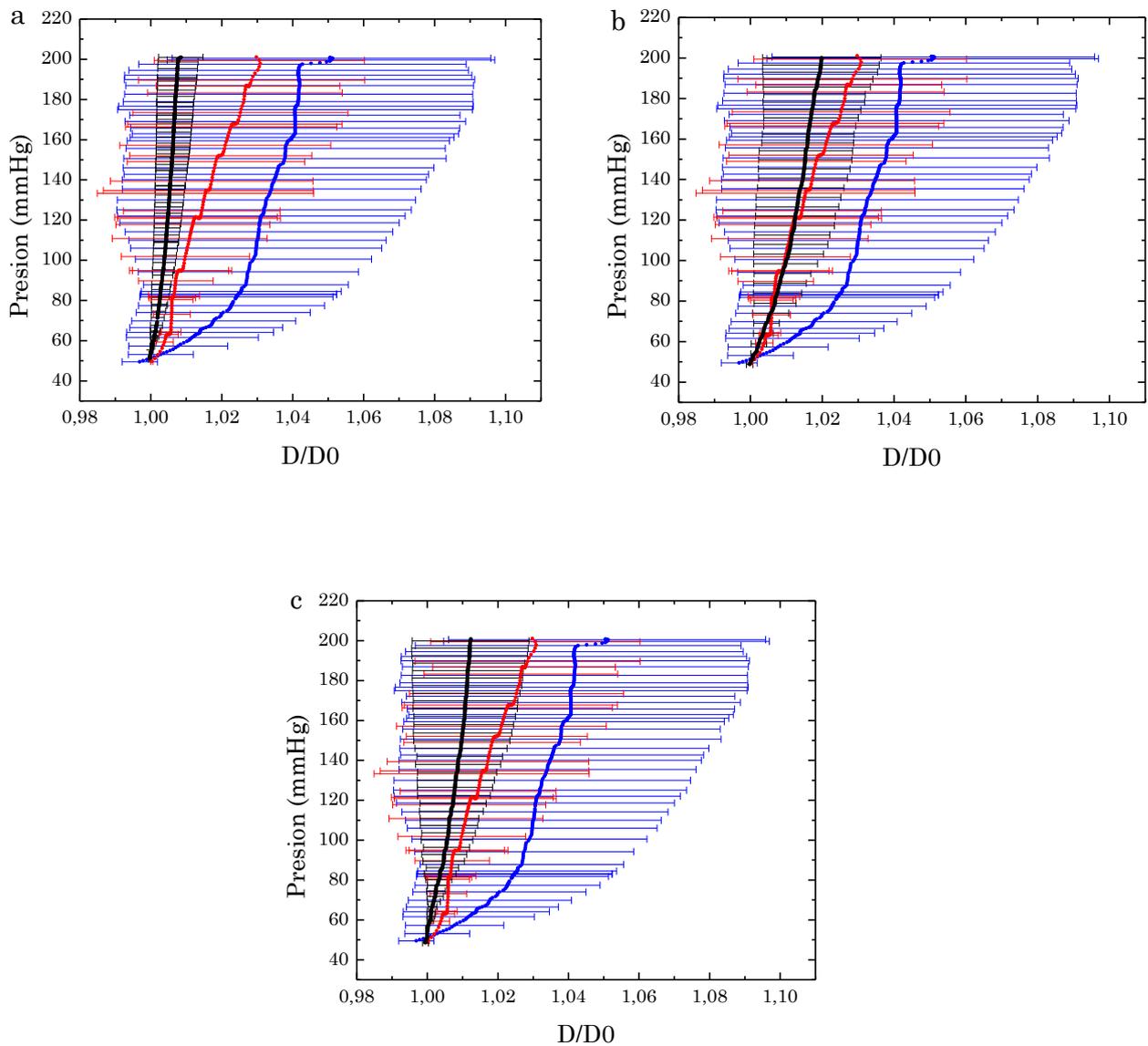


Figura 4.13. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa (negro) de a) espesor #1, b) espesor #2 y c) espesor #3, comparadas con arterias coronarias jóvenes (azul) y envejecidas (rojo) (Claes, 2010).

Se comparó el comportamiento mecánico obtenido para los injertos bicapa con los resultados de E. Claes *et al.* en arterias coronarias, y arterias y venas utilizadas como *bypass* (en caso de afecciones coronarias) (Claes, 2010). La figura 4.13. presenta las curvas promedio de presión en función del diámetro normalizado para los injertos bicapa de los tres espesores

estudiados, y arterias coronarias jóvenes y envejecidas. Se puede observar que, a pesar de presentar una respuesta más rígida y más próxima a las arterias envejecidas, en todos los casos las curvas del injerto bicapa con sus barras de error se encuentran comprendidas dentro de las desviaciones de las curvas de ambas arterias coronarias. Este resultado realza el comportamiento tipo “J” obtenido, ya que se encuentra en el orden de la respuesta de las arterias coronarias que se desean reemplazar.

Luego, se compararon las curvas de los injertos bicapa con la respuesta de vasos sanguíneos que se utilizan típicamente como *bypass* en caso de afecciones coronarias. La figura 4.14. presenta las curvas promedio de los injertos, arterias radiales, arterias mamarias y venas safenas envejecidas.

Nuevamente, se observa que en todos los casos las curvas del injerto bicapa se encuentran a la izquierda de las curvas de los vasos sanguíneos utilizados para *bypass*, aunque comprendidas dentro de sus desviaciones. Más aún, los injertos presentan un comportamiento muy próximo al de las venas safenas las cuales son el injerto más usado, y con un alto índice de éxito, en pacientes con afecciones coronarias (Canver, 1995).

Se ensayaron los injertos bicapa de los tres espesores a un alargamiento axial de $L/L_0 = 1,05$ y $L/L_0 = 1,1$ dado que al suturar los injertos en el lugar del implante estos pueden sufrir un alargamiento axial. Se analizó el grado de deformación que sufren los injertos, y si estos sufren deformación plástica. La figura 4.15. presenta una curva de fuerza en función del desplazamiento axial para un injerto tipo.

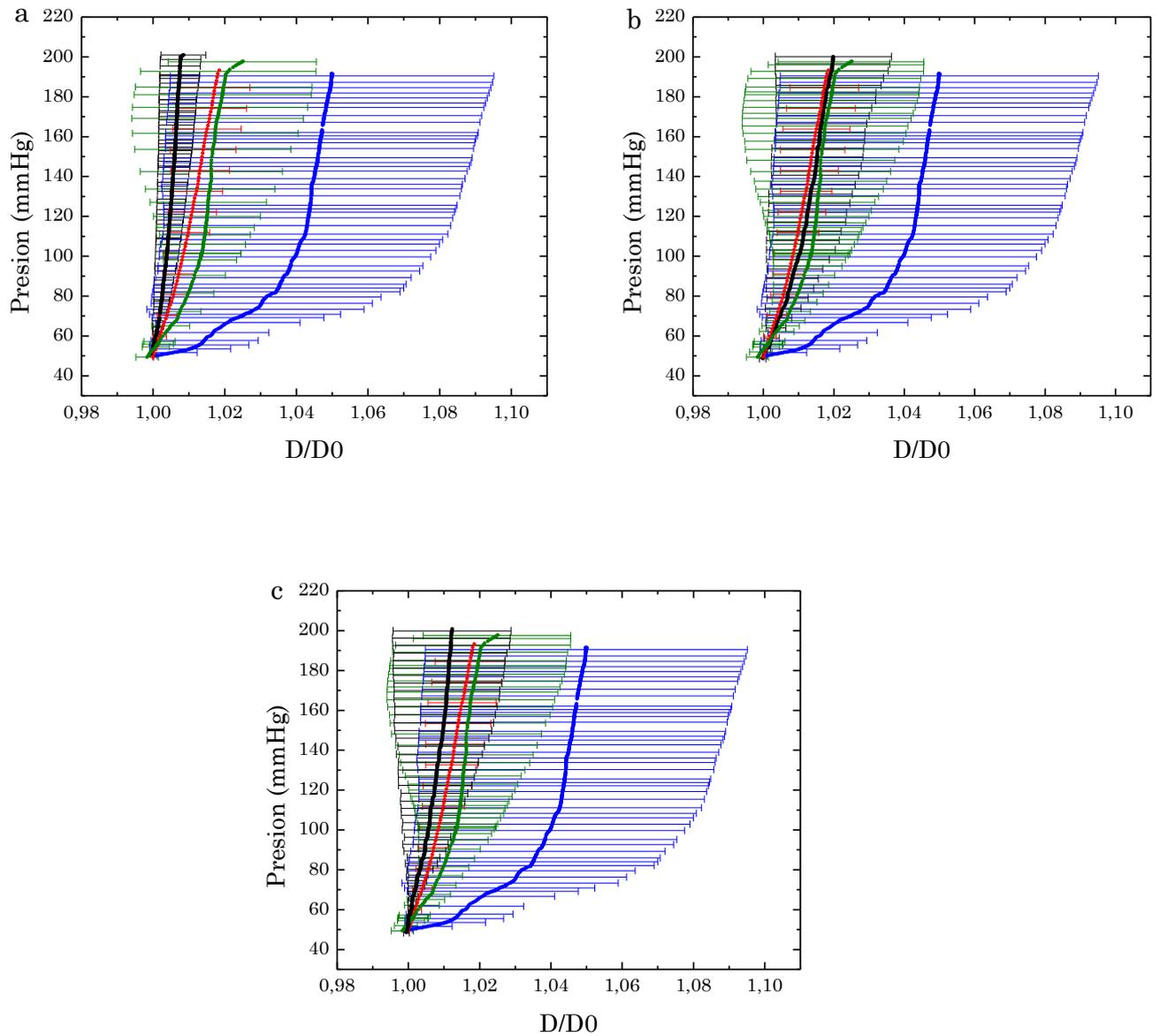


Figura 4.14. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa (negro) de a) espesor #1, b) espesor #2 y c) espesor #3, comparadas con arterias radiales (verdes), arterias mamarias (azul) y venas safenas (rojo) envejecidas (Claes, 2010).

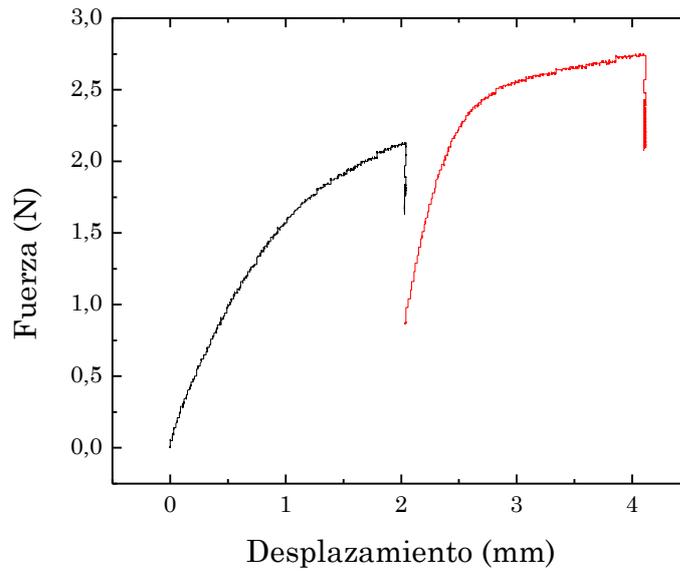


Figura 4.15. Curvas de fuerza vs desplazamiento axial para un injerto vascular bicapa, a un alargamiento axial $L/L_0 = 1,05$ (negro) y $L/L_0 = 1,1$ (rojo).

Se observa que los injertos comienzan a sufrir una deformación permanente cuando el alargamiento axial es de $L/L_0 = 1,1$. Por este motivo se toma como alargamiento máximo permitido durante el manejo, suturado y proceso quirúrgico a $L/L_0 = 1,05$.

Los injertos bicapa mantienen su comportamiento tipo “J” a pesar de sufrir una pequeña deformación plástica a $L/L_0 = 1,1$, (Figura 4.16. b). Por otro lado, a mayor alargamiento axial se obtiene una mayor variación del diámetro del injerto con la presión aplicada. Se evidencia una mayor *compliance* a mayor alargamiento axial, en especial para los injertos de espesor #3.

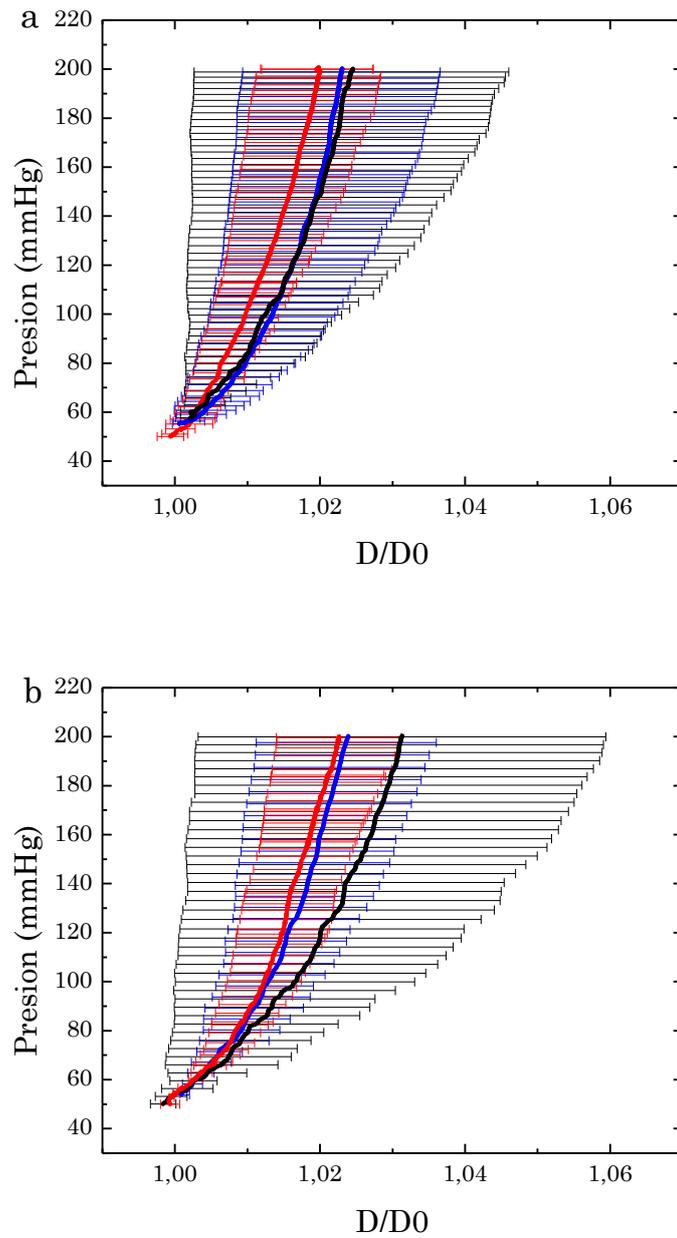


Figura 4.16. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapas de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro) a $L/L_0 = 1,05$ (a) y $L/L_0 = 1,1$ (b).

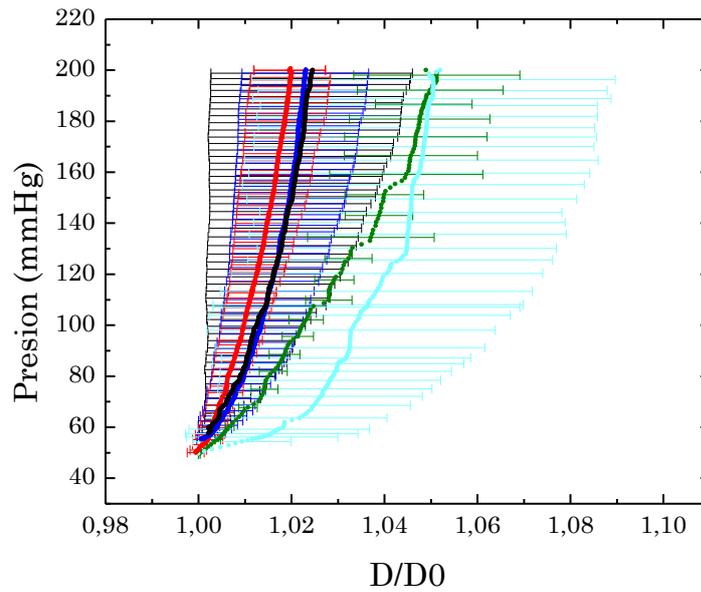


Figura 4.17. Curvas de presión vs D/D_0 para injertos vasculares bicapa de espesor #1 (rojo), espesor #2 (azul) y espesor #3 (negro) a $L/L_0 = 1,05$ y las arterias coronarias envejecidas (verde) y jóvenes (celeste) a $L/L_0 = 1,1$ (Claes, 2010).

En la figura 4.17. se pueden observar las curvas de presión en función del diámetro con un alargamiento axial aplicado, para los injertos bicapa de los tres espesores y las arterias coronarias jóvenes y envejecidas. Por falta de ensayos de las arterias coronarias a $L/L_0 = 1,05$ se utilizaron los ensayos a $L/L_0 = 1,1$ para comparar. Se puede observar que el injerto de espesor #3 es el que presenta un comportamiento más similar a las arterias coronarias. En particular, si bien los injertos poseen un comportamiento menos distensible, parte de la curva de las arterias coronarias envejecidas (intervalo fisiológico 80-120 mmHg) se encuentra comprendida dentro de las barras de error del injerto de espesor #3. Además, las desviaciones del injerto de espesor #3 y de ambas arterias coronarias se superponen en todo el intervalo de presión estudiado.

A partir de las curvas obtenidas se calculó la *compliance* de los injertos bicapa para tres intervalos de presión (50-90 mmHg, 80-120 mmHg y 110-150 mmHg) según lo establece la norma (ANSI/AAMI/ISO, 2010) y de

acuerdo a la ecuación (4.1.). La tabla 4.8. presenta los resultados obtenidos para $L/L_0 = 1$.

Tabla 4.8. %C (10^{-2} mmHg) a distintos intervalos de presión para los injertos vasculares bicapa, arterias coronarias, mamarias, radiales y venas safenas

Intervalo de presión (mmHg)	50-90	80-120	110-150
Injerto vascular e #1	1,09 ± 0,99	0,59 ± 0,42	0,46 ± 0,35
Injerto vascular e #2	2,37 ± 2,24	1,56 ± 1,50	1,09 ± 0,72
Injerto vascular e #3	1,49 ± 1,99	1,23 ± 1,92	1,05 ± 1,62
coronarias jóvenes	8,92 ± 7,67	3,39 ± 6,03	2,69 ± 0,89 ^{a,b}
coronarias envejecidas	4,01 ± 2,08 ^a	4,06 ± 3,16	3,42 ± 1,72 ^a
mamarias	21,05 ± 26,04	5,22 ± 5,13	1,79 ± 1,96
radiales	5,66 ± 2,12 ^{a,c}	2,05 ± 3,68	1,06 ± 4,73
safenas	2,60 ± 1,72	1,77 ± 1,20	0,67 ± 1,89

a, b, c indican diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con injertos bicapa de espesor #1, #2 y #3, respectivamente.

Los resultados obtenidos refuerzan el comportamiento tipo “J” observado en las curvas de presión en función del diámetro. Si bien la *compliance* calculada para los injertos bicapa presenta una alta desviación, el mismo efecto se observa en los vasos sanguíneos estudiados. Los valores obtenidos sólo presentan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en los intervalos de bajas (50-90 mmHg) y altas (110-150 mmHg) presiones, principalmente para el injerto de espesor #1 (Tabla 4.8.). En el intervalo fisiológico estricto (80-120 mmHg), las *compliance* de todos los injertos son estadísticamente iguales a los vasos sanguíneos analizados ($p < 0,05$). No obstante, el valor medio es más próximo a las venas safenas las cuales presentan un comportamiento menos distensible. La figura 4.18., presenta de forma gráfica los resultados obtenidos. En particular, los injertos de espesor #2 y #3 presentan valores similares a las arterias coronarias envejecidas, las arterias radiales y las venas safenas. Estos resultados los convierten en muy buenos candidatos para su uso a largos tiempos de implantación, dado que es el desajuste en la *compliance* en los sitios de anastomosis es la principal causa de falla de los injertos actuales (Weston, 1996; Salacinski, 2001).

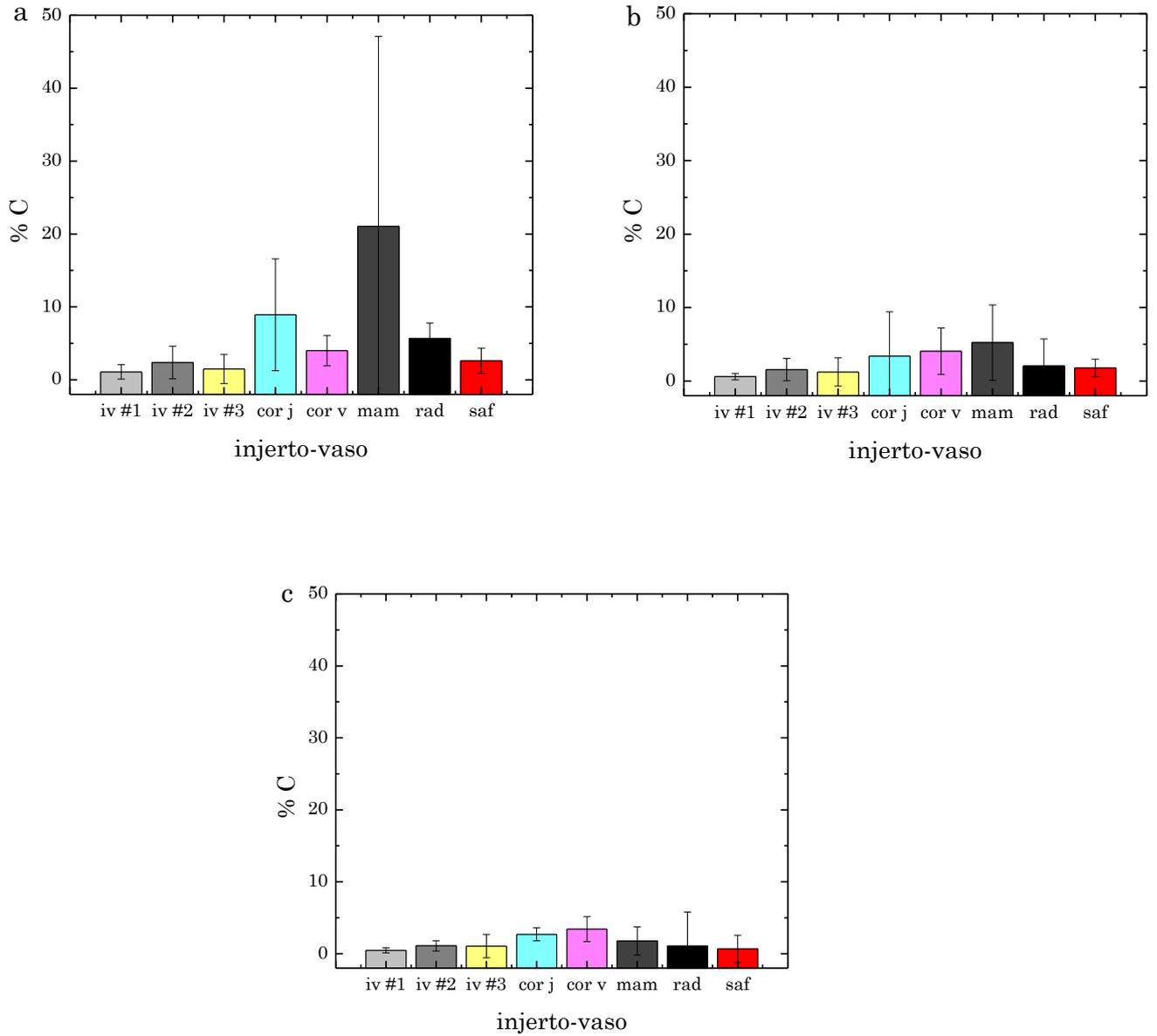


Figura 4.18. *Compliance* (10^{-2} mmHg) para injertos vasculares bicapas de espesor #1, #2 y #3 comparada con arterias coronarias, mamarias, radiales, mamarias y venas safenas calculada en los intervalos a) 50-90 mmHg, b) 80-120 mmHg y c) 110-150 mmHg para $L/L_0 = 1$ (Claes, 2010).

La *compliance* también se calculó para un alargamiento axial de $L/L_0 = 1,05$ (Tabla 4.9). Se compararon los valores obtenidos con valores de *compliance* de arterias coronarias a $L/L_0 = 1,1$, al igual que en la figura 4.17.

Tabla 4.9. %C (10^{-2} mmHg) a distintos intervalos de presión para los injertos vasculares bicapa a $L/L_0 = 1,05$, y arterias coronarias a $L/L_0 = 1,1$.

Intervalo de presión (mmHg)	50-90	80-120	110-150
Injerto vascular e #1	$2,40 \pm 1,02$	$1,67 \pm 0,67$	$1,30 \pm 0,65$
Injerto vascular e #2	$3,68 \pm 2,77$	$1,84 \pm 1,03$	$1,61 \pm 1,24$
Injerto vascular e #3	$2,67 \pm 3,08$	$1,75 \pm 2,04$	$1,24 \pm 1,36$
Coronarias jóvenes	$10,32 \pm 8,24$	$3,52 \pm 2,73$	$2,69 \pm 0,89^a$
Coronarias envejecidas	$6,73 \pm 1,46^{a,c}$	$5,71 \pm 1,83^{a,b,c}$	$3,93 \pm 1,39^{a,c}$

A, b, c indican diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con injertos bicapa de espesor #1, #2 y #3, respectivamente.

Se observa que la *compliance* aumenta al aumentar el alargamiento axial, tal como se verifica para las arterias coronarias. La *compliance* para los injertos bicapa, a un alargamiento axial de $L/L_0 = 1,05$, se encuentra en el orden de las arterias coronarias con alargamiento axial de $L/L_0 = 1,1$ (Figura 4.19.).

El comportamiento exhibido por los injertos bicapa corrobora los resultados obtenidos previamente, en cuanto al comportamiento tipo colágeno del PLLA y las propiedades similares a la elastina del PHD. Se logró imitar la estructura en capas de las arterias así como también el comportamiento biomimético a partir de las relaciones de las mezclas elegidas. El injerto bicapa de espesor #3 fue seleccionado para los ensayos en biorreactor y estudiar con mayor precisión su comportamiento, debido al mejor comportamiento del mismo frente a los otros espesores, demostrado en esta sección.

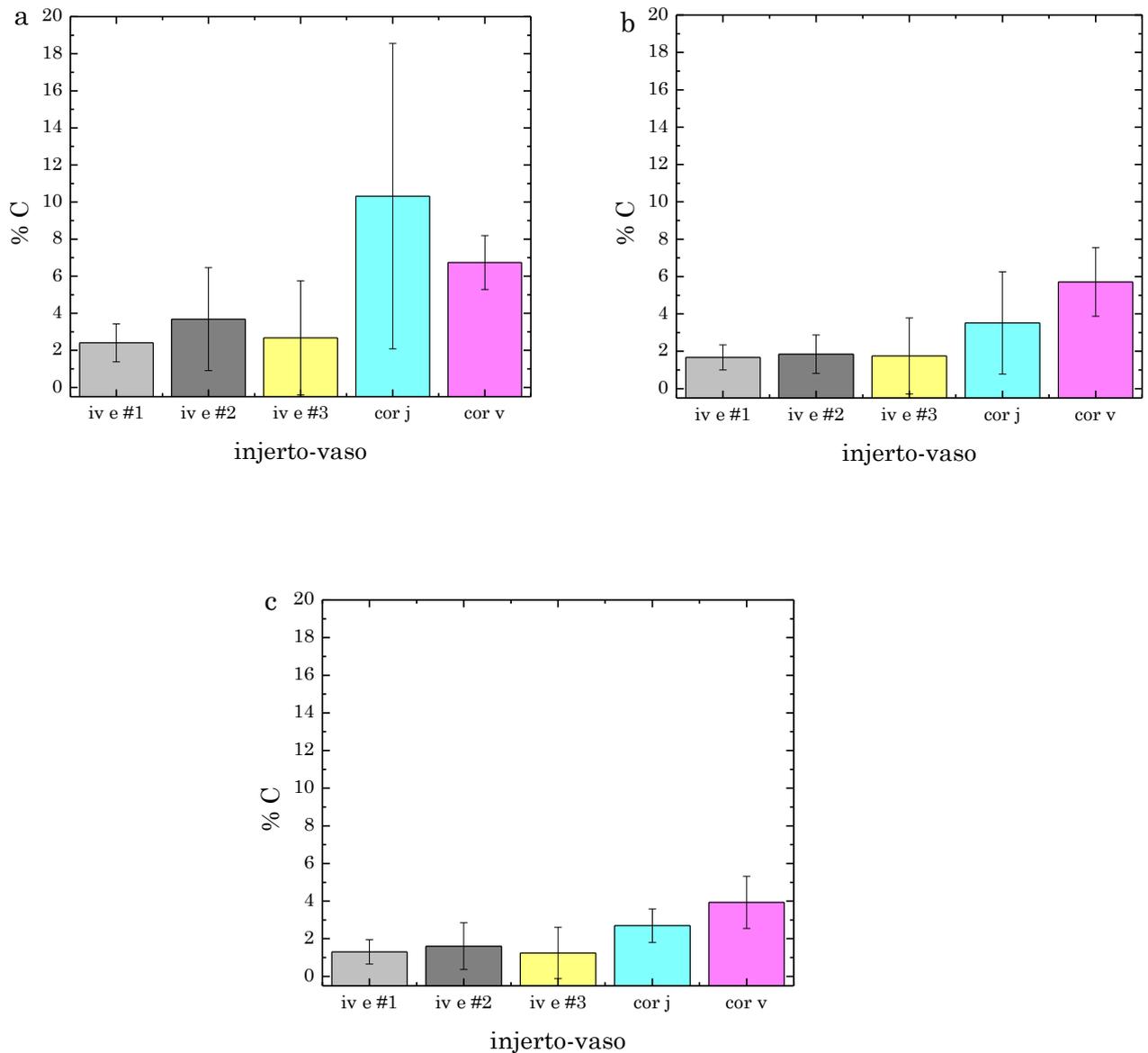


Figura 4.19. *Compliance* (10^{-2} mmHg) para injertos vasculares bicapa de espesor #1, #2 y #3 a $L/L_0 = 1,05$ comparada con arterias coronarias a $L/L_0 = 1,1$, calculada en los intervalos a) 50-90 mmHg, b) 80-120 mmHg y c) 110-150 mmHg (Claes, 2010).

4.3.3.3. Ensayos dinámicos en biorreactor para injertos bicapa de espesor #3

Los injertos se colocaron en el biorreactor y se impusieron ondas de presión programadas por el sistema circulatorio. La presión interna

instantánea y el diámetro externo se midieron para las muestras en cada intervalo de presiones. Los resultados de las medidas se presentan en la tabla 4.10. para los intervalos estudiados. También se calculó la tensión circunferencial de pared media.

Tabla 4.10. Medidas dinámicas para los injertos bicapa en distintos intervalos de presión. PR, P_s, P_D, D_s, D_D, σ_M .

muestra	PR (mmHg)	P _s (mmHg)	P _D (mmHg)	D _s (mm)	D _D (mm)	σ_M (kPa)
#1	50-90	82,89 ± 0,86	29,10 ± 0,85	5,953 ± 0,003	5,910 ± 0,003	100,64 ± 0,5
	80-120	135,30 ± 1,16	86,22 ± 0,99	5,989 ± 0,005	5,956 ± 0,001	200,44 ± 0,8
	110-150	168,30 ± 0,44	109,99 ± 0,36	6,021 ± 0,004	5,999 ± 0,001	253,39 ± 1,1
#2	50-90	90,93 ± 0,84	33,34 ± 0,85	5,745 ± 0,001	5,675 ± 0,001	107,50 ± 0,9
	80-120	125,49 ± 0,95	67,49 ± 0,90	5,824 ± 0,001	5,788 ± 0,002	169,75 ± 0,7
	110-150	161,43 ± 0,68	104,45 ± 0,62	5,880 ± 0,001	5,859 ± 0,001	236,43 ± 1,5
#3	50-90	86,54 ± 0,55	44,55 ± 0,32	6,08 ± 0,008	6,03 ± 0,010	120,26 ± 1,0
	80-120	117,87 ± 0,62	77,11 ± 0,62	6,15 ± 0,008	6,11 ± 0,009	181,08 ± 1,2
	110-150	137,48 ± 0,48	95,77 ± 0,99	6,18 ± 0,002	6,15 ± 0,005	217,86 ± 0,6
#4	50-90	71,22 ± 0,75	31,52 ± 1,18	5,82 ± 0,005	5,75 ± 0,003	90,05 ± 0,7
	80-120	118,38 ± 0,52	77,10 ± 1,18	5,92 ± 0,006	5,89 ± 0,002	174,88 ± 0,6
	110-150	190,00 ± 0,76	146,16 ± 1,05	6,03 ± 0,003	6,01 ± 0,007	306,59 ± 0,4
media ± SD	50-90	82,90 ± 7,51	34,63 ± 6,10	5,899 ± 0,130	5,840 ± 0,140	104,61 ± 12,66
	80-120	124,26 ± 7,25	76,98 ± 6,82	5,971 ± 0,119	5,936 ± 0,119	181,54 ± 13,43
	110-150	164,30 ± 19,15	114,09 ± 19,62	6,027 ± 0,108	6,004 ± 0,106	253,57 ± 38,21

La figura 4.20. presenta los lazos de presión versus diámetro medidos para el injerto bicapa de espesor #3. Se obtiene un comportamiento tipo “J” al unir las curvas obtenidas en los tres intervalos de presión, al igual que lo observado en la sección 4.3.3.2. Se puede apreciar como la rigidez del injerto aumenta al ensayarlo bajo presiones más altas, comportamiento común en las arterias naturales. Los valores obtenidos para la *compliance* dinámica y el módulo elástico de presión-deformación, se presentan en la tabla 4.11. Se corroboran los resultados obtenidos en la sección anterior, donde la *compliance* disminuye significativamente en la mayoría de los casos, a medida que la presión transmural aumenta. El mismo comportamiento dependiente de la presión se observa al aumentar el modulo elástico de presión-deformación, lo cual demuestra el endurecimiento del injerto

vascular. Los valores de *compliance* obtenidos a través de estos ensayos dinámicos, los cuales presentan mayor precisión que los ensayos presión-diámetro realizados en la sección 4.3.3.2., son prácticamente iguales a los antes calculados, a su vez, éstos presentan menor desviación consistentes con la mayor precisión del ensayo.

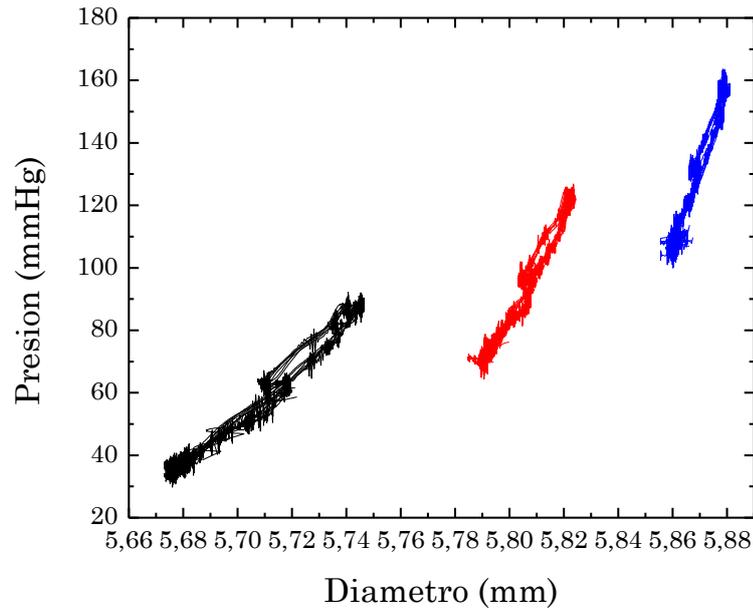


Figura 4.20. Lazo de presión versus diámetro para injertos vasculares bicapa de espesor #3 para 50-90 mmHg (negro), 80-120 mmHg (rojo) y 110-150 mmHg (azul).

Tabla 4.11. Propiedades mecánicas de los injertos vasculares bicapa: %C y E_{Pe} .

muestra	PR (mmHg)	%C (10^{-2} mmHg)	E_{Pe} (MPa)
#1	50-90	$1,35 \pm 0,09$	$1,35 \pm 0,10$
	80-120	$1,14 \pm 0,20$	$1,10 \pm 0,16$
	110-150	$0,64 \pm 0,10$	$2,01 \pm 0,25$
#2	50-90	$2,17 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,01$
	80-120	$1,05 \pm 0,06$	$1,36 \pm 0,07$
	110-150	$0,63 \pm 0,03$	$2,10 \pm 0,09$
#3	50-90	$2,08 \pm 0,38$	$0,73 \pm 0,11$
	80-120	$1,44 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,04$
	110-150	$1,12 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,05$
#4	50-90	$3,16 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,02$
	80-120	$1,43 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,03$
	110-150	$0,75 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,09$
media \pm SD	50-90	$2,19 \pm 0,69^{b,c}$	$0,86 \pm 0,31^{b,c}$
	80-120	$1,27 \pm 0,20^{a,c}$	$1,10 \pm 0,18^{a,c}$
	110-150	$0,79 \pm 0,21^{a,b}$	$1,71 \pm 0,38^{a,b}$

a, b, c indican diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con 50-90 mmHg, 80-120 mmHg y 110-150 mmHg, respectivamente.

Se obtiene una buena respuesta mecánica al comparar los resultados obtenidos con otros injertos vasculares obtenidos a partir de las diferentes estrategias de la ingeniería de tejidos. Más aún la *compliance* presentada por los injertos bicapa es altamente superior a la que presentan los injertos comerciales de ePTFE (0,1 %/100 mmHg) (Yin, 2013).

Se desarrollaron injertos a partir de cultivos bacteriales *in vitro* en los cuales se obtuvieron valores de *compliance* de $4,27 \pm 1,51$ %/100 mmHg en el intervalo de presiones de 30-120 mmHg (Zahedmanesh, 2011). Se obtuvieron también, injertos a partir de cultivos celulares humanos autólogos, los cuales presentaron una *compliance* de $3,4 \pm 1,6$ %/100 mmHg en el intervalo de presiones de 50-200 mmHg (Konig, 2009).

El injerto bicapa de espesor #2 para un intervalo de presión de 50-120 mmHg (similar al intervalo estudiado por Zahedmanesh *et al.* (Zahedmanesh, 2011)) presentó un valor de $1,51 \pm 1,29$ %/100 mmHg, mientras que en intervalo de 50-200 mmHg se obtuvo un valor de $2,01 \pm$

1,88, ambos valores, si bien levemente inferiores, son estadísticamente iguales ($p < 0,05$) a los injertos cultivados *in vitro*.

Existen injertos a partir de polímeros sintéticos y naturales producidos por técnicas de obtención de matrices porosas como TIPS, lixiviado de partículas, gel-hilado, electrohilado y algunos a partir de dos técnicas distintas. El injerto bicapa de PEUU obtenido por TIPS y electrohilado por L. Soletti *et al.* (Soletti, 2010) presentó una *compliance* de $4,6 \pm 0,5$ %/100 mmHg en el intervalo fisiológico (80-120 mmHg). Este valor se encuentra en el orden del obtenido para los injertos monocapa de PHD $2,76 \pm 0,51$ %/100 mmHg. El injerto es más distensible como se esperaba dado que está formada por PEUU ($p < 0,05$). Se produjo un injerto de PLCL (5:5) por la técnica de gel-hilado el cual presentó una *compliance* de 1,195 %/100 mmHg en el intervalo fisiológico (80-120 mmHg), 1,289 en un intervalo de 50-90 mmHg y 0,825 para 110-150 mmHg (Lee, 2010). Los injertos bicapa presentan valores de *compliance* similares en todos los intervalos de presiones estudiados. S. Liu *et al.* produjeron injertos bicapa de fibrina de seda con una *compliance* biomimética en el intervalo fisiológico, los valores se encontraron entre 2,3-2,5 %/100mmHg (Liu, 2013). Los injertos bicapa y en particular los injertos monocapa de PHD, presentan valores comparables. Dentro de los injertos obtenidos por la técnica de electrohilado, las mayores *compliance* las presentan los obtenidos a partir de poliuretano y PLCL: $4,1 \pm 0,9$ y $7,2 \pm 0,4$ %/100 mmHg para los injertos de poliuretano de baja y alta porosidad respectivamente (Bergmeister, 2013); $3,7 \pm 1,2$ %/100 mmHg para los injertos de PLCL (Wang, 2013). B. Marelli *et al.* produjeron injertos electrohilados de fibrina de seda reforzados con colágeno con una *compliance* de $3,24 \pm 0,58$ %/100 mmHg (Marelli, 2012). Valores bastante menores se obtuvieron para injertos electrohilados de mezclas de colágeno, quitosano y PLCL en distintas relaciones de los mismos (Yin, 2013): $2,0 \pm 0,6$ %/100 mmHg para una mezcla 0/0/100, $0,7 \pm 0,4$ %/100 mmHg para 20/5/75, y $0,8 \pm 0,4$ %/100 mmHg para 40/10/50. El mismo grupo desarrolló injertos vasculares tricapa a partir de colágeno, elastina, fibrina de seda y PCL, donde cada capa estaba formada por

distintas proporciones de dichos polímeros (McClure, 2010; McClure, 2012). En dicho trabajo se obtuvieron valores de *compliance* en el intervalo de 0,4-2,8 %/100 mmHg, y en función también de su tensión de reventado se propusieron como los mejores injertos, a los injertos a base de colágeno de las mezclas: 1) 55/35/10 con 55/10/35 y 2) 45/45/10 con 65/10/25 de PCL/elastina/colágeno para la capa media y externa respectivamente; y a base de fibrina de seda: 3) 45/45/10 con 55/10/35 de PCL/elastina/fibrina de seda para la capa media y externa respectivamente. Estos presentaron valores de *compliance* de 1,4 %/100 mmHg, 0,6 %/100 mmHg y 1,4 %/100 mmHg respectivamente.

Los injertos bicapa electrohilados obtenidos y caracterizados en esta tesis presentan valores de *compliance* del orden de los encontrados en literatura para otros injertos electrohilados. En particular los injertos bicapa presentaron valores de *compliance* similares y superiores a los injertos tricapa, propuestos por G.L. Bowlin como los más apropiados para *bypass* arterial.

4.3.4. Ensayos de presión de reventado

Se estudió la resistencia a la rotura bajo presión interna en ambiente fisiológico para los injertos bicapa de los tres espesores analizados. Los injertos rompieron en todos los casos por su zona más débil, con menor espesor, formando una localización de la deformación. La figura 4.21. muestra a un injerto antes y después de ensayado.

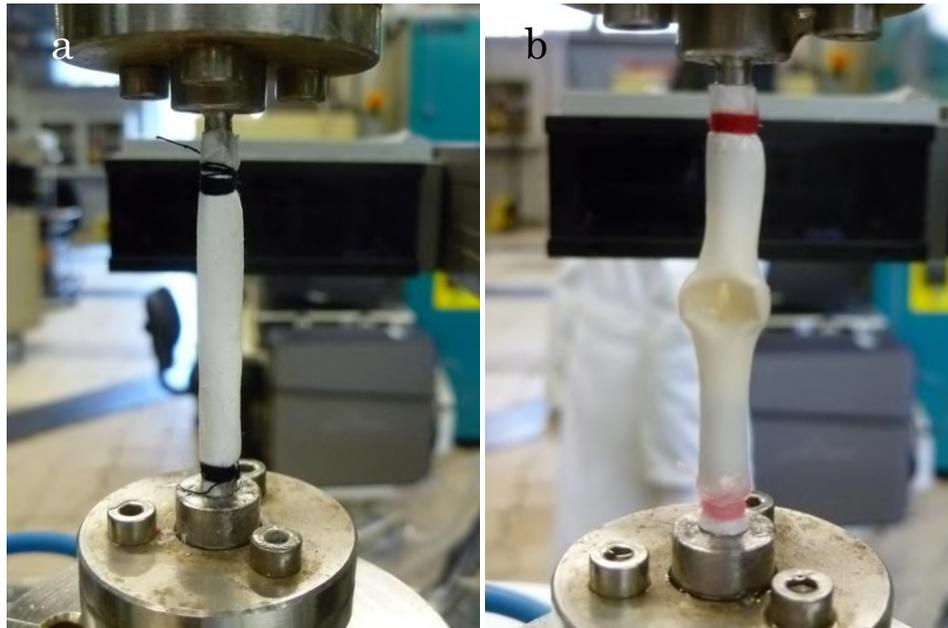


Figura 4.21. Injerto vascular bicapa montado en la máquina de ensayos, a) antes y b) después del ensayo de reventado.

En la figura 4.22. se puede apreciar una curva modelo del ensayo, en donde se observa la localización de la deformación y el comportamiento tipo “J” a bajas presiones.

La tabla 4.12. presenta los valores medios de presión máxima alcanzada por cada tipo de espesor y su desviación para dos L/L_0 distintas. Si bien los valores siguen una tendencia, a mayor espesor mayor tensión de reventado, estos solo presentan una diferencia estadística ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para el espesor #1 y el #3. En el caso de $L/L_0 = 1,1$, también hay una diferencia estadística entre el espesor #1 y el #2. Por otro lado, se observa una menor tensión de reventado a mayor alargamiento axial, al comparar la tensión de reventado entre los injertos de igual espesor y distinto alargamiento axial. Sin embargo, estadísticamente los valores son iguales ($p < 0,05$). Este resultado demuestra que la aplicación de un esfuerzo axial al injerto, al colocarlo en el lugar de anastomosis por ejemplo, no va a afectar la resistencia al reventado del mismo.

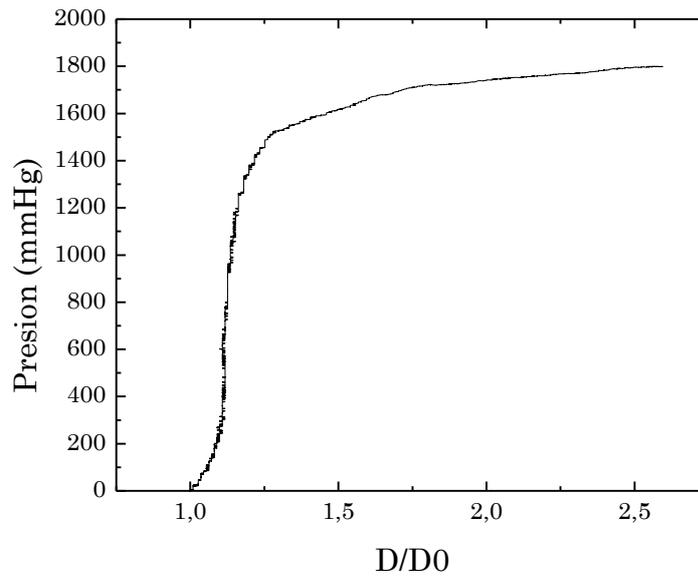


Figura 4.22. Curva modelo del ensayo presión-deformación hasta rotura para un injerto de espesor #3.

Tabla 4.12. Presión de reventado para injertos bicapa a distintos L/L_0 .

Espesor #	Presión de reventado (mmHg)	Presión de reventado (mmHg)
	$L/L_0 = 1$	$L/L_0 = 1,1$
1	$1232,69 \pm 557,28^a$	$800,61 \pm 142,46^{a,b}$
2	$1500,05 \pm 323,63$	$1303,94 \pm 355,33^b$
3	$1775,21 \pm 57,5^a$	$1502,04 \pm 354,1^a$

^{a, b} indican diferencia estadística ($p < 0,05$) para los injertos de espesor #1 comparados con los de espesor #3 y con los de espesor #2, respectivamente.

La resistencia al reventado no se ha explorado tan profundamente como otras de las propiedades evaluadas, en particular en vasos sanguíneos naturales. Sin embargo, a modo comparativo se ha estudiado esta propiedad en algunas arterias y venas de origen animal y humano. Las arterias femorales caninas presentaron una resistencia al reventado de 2148 ± 264 mmHg (Wang, 2013), las arterias carótidas porcinas mostraron valores inferiores, de 910 mmHg (Rapoport, 2012).

Las venas safenas humanas tienen una resistencia al reventado de 1250 ± 500 mmHg (Soletti, 2010), mientras que las arterias mamarias presentan valores entre 2031 y 4225 mmHg (Yin, 2013). Para las arterias coronarias la presión de reventado se encuentra en el orden de los 2000 mmHg (L'Hereux, 2006). Estos valores de resistencia de los vasos sanguíneos son del orden de los obtenidos para los injertos bicapa, y altamente superiores a los valores de presión fisiológica a los que serán sometidos los injertos *in vivo*.

Los injertos obtenidos por electrohilados u otra técnica de obtención de matrices porosas, presentan valores dentro del mismo orden de presiones. La resistencia al reventado de los injertos electrohilados de una mezcla de PCL y colágeno fue de 4915 ± 155 mmHg (Lee, 2008). En el caso de un injerto a partir de una mezcla de colágeno, elastina y PDLGA desarrollado por el mismo grupo se obtuvo una resistencia de 1425 mmHg (Stitzel, 2006). La resistencia al reventado para injertos electrohilados de PCL se encontró en el intervalo de 1000-3000 mmHg (Drilling, 2009). Otras tubuladuras electrohiladas de PLCL mostraron una resistencia al reventado de 3175 ± 438 mmHg (Wang, 2013). Para el caso de injertos electrohilados a partir de poliuretanos biodegradables se obtuvieron valores entre 540 ± 15 y 1290 ± 15 mmHg (Han, 2011). Los injertos de mezclas de polímeros naturales como el colágeno y el quitosano con PLCL resultaron en tensiones de reventado altas, de 3365 mmHg (Yin, 2013). Por su parte, los injertos bicapa con comportamiento "J" obtenidos por H.S. Rapoport *et al.* resultaron en resistencias de 3095 ± 1016 mmHg (Rapoport, 2012). El grupo de G.L. Bowlin desarrolló injertos multicapas con altas tensiones de reventado en algunos casos superiores a la capacidad máxima del equipo de medición, 2000-3500 mmHg (McClure, 2010; McClure, 2012).

L. Soletti *et al.* realizaron injertos bicapa híbridos obtenidos por una combinación de TIPS y electrohilado con una resistencia de 2300 mmHg (Soletti, 2010). La resistencia obtenida para injertos no-electrohilados de polímeros naturales como el colágeno, se mantuvo en el intervalo observado para injertos electrohilados, 1225-1574 mmHg (Ghezzi, 2012). Las

tubuladuras de fibrina de seda mostraron resistencias inferiores, entre 779-806 mmHg (Liu, 2013). G. König *et al.* obtuvieron valores de presiones de reventado entre 3399 ± 470 y 3523 ± 1159 mmHg para injertos cultivados *in vitro* a partir de células humanas autólogas (König, 2009).

Los valores obtenidos por otros injertos electrohilados o a partir de otras técnicas como TIPS, mostraron valores algo superiores a los que presentan los vasos sanguíneos humanos y a los obtenidos por los injertos bicapas desarrollados en esta tesis. No obstante, estos últimos son del mismo orden y altamente superiores al intervalo de presiones fisiológicas. De acuerdo a nuestro mejor conocimiento, no se ha estudiado aún el efecto de un alargamiento axial en la resistencia al reventado de injertos vasculares electrohilados. Estos resultados en conjunto con los otros analizados en las secciones anteriores, prueban que los injertos bicapa, en especial los de espesor #3, cumplen con las propiedades necesarias para desarrollarse como injertos vasculares coronarios.

4.4. Conclusiones parciales

La caracterización del comportamiento mecánico de los injertos vasculares, tanto los monocapa de PLLA o PHD como los bicapa obtenidos a partir de mezcla de estos polímeros, pudo llevarse a cabo mediante la realización de ensayos con un conjunto de técnicas experimentales.

Se caracterizaron estructuras electrohiladas de los polímeros puros, PLLA y PHD, tanto en tracción como en presión-diámetro. Se encontró que el PLLA se comporta mecánicamente como el colágeno, mientras que el PHD presenta una respuesta más elástica como la elastina. Estos resultados comprueban la hipótesis planteada al seleccionar los materiales para desarrollar los injertos vasculares.

Al analizar los injertos bicapa se observó que la contribución de cada polímero al injerto, en conjunto con las cualidades de tener un material nanofibroso, en capas, y con separación entre estas, resultan en un comportamiento mecánico tipo “J” de características biomiméticas cuando

estos son sometidos a presiones internas. Más aún los valores de *compliance* se encuentran en el orden de arterias coronarias humanas y los vasos sanguíneos utilizados para reemplazo de las mismas. Los injertos presentan resistencia a la sutura y presiones de reventado también en el orden de arterias y venas humanas. Además, las propiedades observadas son comparables y en algunos casos superiores a otros injertos sintéticos desarrollados por la técnica de electrohilado.

Estos resultados indican que los injertos vasculares bicapa son buenos candidatos para reemplazo de arterias coronarias teniendo en cuenta su desempeño mecánico.

4.5. Bibliografía

- Abbott W., Megerman J., Hasson J., L'Italien G., Warnock D., 1987. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency, *Journal of Vascular Surgery*, 5: 376-382.
- ANSI/AAMI/ISO 7198:1998/2001/(R) 2010. Cardiovascular implants- Tubular vascular prostheses.
- Armentano R.L., Levenson J., Barra J.G., Fischer E.I., Breitbart G.J., Pichel R.H., Simon A., 1991. Assessment of elastin and collagen contribution to aortic elasticity in conscious dogs. *American Journal of Physiology*, 260: H1870- H1877.
- Armentano R.L., Cabrera Fischer E.I., Barra J.G., Levenson J.A., Simon A.C., Pichel R.H., 1994. Single beat evaluation of circumferential aortic elastin elastic modulus in conscious dogs. Potential application in non-invasive measurements, *Med. Prog. Technol.*, 20: 91-99.
- Armentano R.L., Barra J.G., Levenson J., Simon A., Pichel R.H., 1995. Arterial wall mechanics in conscious dogs: assessment of viscous, inertial, and elastic moduli to characterize aortic wall behavior, *Circulation Research*, 76: 468-478.

- Balay G., Brum J., Bia D., Armentano R.L., Negreira C., 2010. Improvement of artery radii determination with single ultra sound channel hardware & in vitro artificial heart system, Conference proceedings: IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2010: 2521-2524.
- Barra J.G., Armentano R.L., Levenson J., Fischer E.I., Pichel R.H., Simon A., 1993. Assessment of smooth muscle contribution to descending thoracic aortic elastic mechanics in conscious dogs, *Circulation Research*, 73: 1040-1050.
 - Bergel D.H., 1961. The static elastic properties of the arterial wall, *The Journal of Physiology*, 156: 445-457.
 - Bergel D.H., 1961b. The dynamic elastic properties of the arterial wall, *The Journal of Physiology*, 156: 458-469.
 - Bergmeister H., Schreiber C., Grasl C., Walter I., Plasenzotti R., Stoiber M., Bernhard D., Schima H., 2013. Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities, *Acta Biomaterialia*, 9: 6032-6040.
 - Brum J., Bia D., Benech N., Balay G., Armentano R.L., Negreira C., 2010. Setup of a cardiovascular simulator: application to the evaluation of the dynamical behavior of atheroma plaques in human arteries, *Physics Procedia*, 3: 1095-1101.
 - Canver C.C., 1995. Conduit Options in Coronary Artery Bypass Surgery, *Chest*, 108: 1150-1155.
 - Claes E., 2010. Estudio mecánico de las arterias coronarias humanas y sus sustitutos vasculares, tesis doctoral, Escuela técnica superior de ingenieros de caminos, canales y puertos, Universidad Politécnica de Madrid.
 - Donovan D.L., Schmidt S.P., Townshend S.P., Njus G.O., Sharp W.V., 1990. Material and structural characterization of human saphenous vein. *Journal of Vascular Surgery*, 12: 531-7.
 - Drilling S., Gaumer J., Lannutti J., 2009. Fabrication of burst pressure competent vascular grafts via electrospinning: Effects of

- microstructure, *Journal of Biomedical Materials Research*, 88A: 923-934.
- Falasco G.A., Terán F., 2005. Estación automatizada de ensayos in-vitro de segmentos vasculares, Proyecto final, Universidad Favaloro.
 - Fung Y.C., 1993. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. 2nd ed., Springer, Heidelberg.
 - Gamero L.G., Armentano R.L., Barra J.G., Simon A., 2001. Levenson J., Identification of arterial wall dynamics in conscious dogs, *Experimental Physiology*, 86: 519-528.
 - Ghezzi C.E., Marelli B., Muja N., Nazhat S.N., 2012. Immediate production of a tubular dense collagen construct with bioinspired mechanical properties, *Acta Biomaterialia*, 8: 1813-1825.
 - Han F., Jia X., Dai D., Yang X., Zhao J., Zhao Y., Fan Y., Yuan X., 2013. Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF, *Biomaterials*, 34: 7302-7313.
 - Han J., Cao R-W., Chen B., Ye L., Zhang A-Y., Zhang J., Feng Z-G., 2011. Electrospinning and biocompatibility evaluation of biodegradable polyurethanes based on L-lysine diisocyanate and L-lysine chain extender, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A: 705-714.
 - Kannan R.Y., Salacinski H.J., Butler P.E., Hamilton G., Seifalian A.M., 2005. Current Status of Prosthetic Bypass Grafts: A Review, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B: 570-581.
 - König G., McAllister T.N., Dusserre N., Garrido S.A., Iyican C., Marini A., Fiorillo A., Avila H., Wystrychowski W., Zagalski K., Maruszewski M., Linthorst Jones A., Cierpka L., de la Fuente L.M., L'Heureux N., 2009. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery, *Biomaterials*, 30: 1542-1550.

- Lee H., Kim S.H., Jung Y.m., Chung J.H., Kim S.H., Kim S.H., 2010. Novel measurement of pressure inside a compliant vascular scaffold of PLCL, *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7: 298-308.
- Lee S.J., Liu J., Oh S.H., Soker S., Atala A., Yoo J.J., 2008. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions, *Biomaterials*, 29: 2891-2898.
 - L'Hereux N., Dusserre N., Konig G., Victor B., Keire P., Wight T.N., Chronos N.A., Kyles A.E., Gregory C.R., Hoyt G., Robbins R.C., McAllister T.N., 2006. Human tissue engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nature Medicine*, 12: 361-365.
 - Liu S., Dong C., Lu G., Lu Q., Li Z., Kaplan D.L., Zhu H., 2013. Bilayered vascular grafts based on silk proteins, *Acta Biomaterialia*, 9: 8991-9003.
 - Lu X., Pandit A., Kassabam G.S., 2004. Biaxial incremental homeostatic elastic moduli of coronary artery: two-layer model, *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 287: H1663-H1669.
 - Marelli B., Achilli M., Alessandrino A., Freddi G., Tanzi M.C., Fare S., Mantovani D., 2012. Collagen-Reinforced Electrospun Silk Fibroin Tubular Construct as Small Calibre Vascular Graft, *Macromolecular Bioscience*, 12: 1566-1574.
 - McClure M.J., Sell S.A., Simpson D.G., Walpoth B.H., Bowlin G.L., 2010. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study, *Acta Biomaterialia*, 6: 2422-2433.
 - McClure M.J., Simpson D.G., Bowlin G.L., 2012. Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10: 48-61.
 - McMahan R.E., Qu X., Jimenez-Vergara A.C., Bashur C.A., Guelcher S.A., Goldstein A.S., Hahn M.S., 2011. Hydrogel–Electrospun Mesh

Composites for Coronary Artery Bypass Grafts, *Tissue Engineering: Part C*, 17: 451-461.

- Nerem R.M., 2003. Role of mechanics in vascular tissue engineering, *Biorheology*, 40: 281-287.
- Nieponice A., Soletti L., Guan J., Deasy B.M., Huard J., Wagner W.R., Vorp D.A., 2008. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique, *Biomaterials*, 29: 825-833.
- O'Rourke M.F., 1982. *Arterial function in health and disease*, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 153-169.
- Pai C.-L., Boyce M.C., Rutledge G.C., 2011. On the importance of fiber curvature to the elastic moduli of electrospun nonwoven fiber meshes, *Polymer*, 52: 6126-6133.
- Pu J., Komvopoulos K., 2014. Mechanical properties of electrospun bilayer fibrous membranes as potential scaffolds for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10: 2718-2726.
- Rachev A., Felden L., Ku D.N., 2011. Design and fabrication of a mechanically matched vascular graft, *Journal of Biomechanical Engineering*, 133: 091004-091012.
- Rapoport H.S., Fish J., Basu J., Campbell J., Genheimer C., Payne R., Jain D., 2012. Construction of a Tubular Scaffold that Mimics J-Shaped Stress/Strain Mechanics Using an Innovative Electrospinning Technique, *Tissue Engineering: Part C*, 18: 567-574.
- Rhodin J.A.G., 2014. Architecture of the Vessel Wall in *Comprehensive Physiology, Supplement 7: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Vascular Smooth Muscle*: 1-31. First published in print 1980. doi: 10.1002/cphy.cp020201.
- Rizvi M.S., Kumar P., Katti D.S., Pal A., 2012. Mathematical model of mechanical behavior of micro/nanofibrous materials designed for extracellular matrix substitutes, *Acta Biomaterialia*, 8: 4111-4122.

- Roach M.R., Burton A.C., 1957. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 35: 681-890.
- Salacinski H.J., Goldner S., Giudiceandrea A., Hamilton G., Seifalian A.M., Edwards A., Carson R.J., 2001. The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review, *Journal of Biomaterials Applications*, 15: 241-278.
 - Salvucci F.P., Bia D., Armentano R.L., Barra J.G., Craiem D., Zócalo Y., Fernández J.D., Baguear F., Atienza J.M., Rojo F.J., Guinea G.V., 2009. Association between Mechanics and Structure in Arteries and Veins: Theoretical Approach to Vascular Graft Confection, *Conference proceedings: IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2009: 4258-4261.
 - Shadwick R.E., 1999. Mechanical design in arteries, *Journal of Experimental Biology*, 202: 3305-3313.
 - Soletti L., Hong Y., Guan J., Stankus J.J., El-Kurdi M.S., Wagner W.R., Vorp D.A., 2010. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, 6: 110-122.
 - Sonoda H., Takamizawa K., Nakayama Y., Yasui H., Matsuda T., 2001. Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: Design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55: 266-276.
 - Sonoda H., Takamizawa K., Nakayama Y., Yasui H., Matsuda T., 2003. Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 65A: 170-181.
 - Stitzel J., Liu J., Lee S.J., Komura M., Berry J., Soker S., Lim G., Van Dyke M., Czerw R., Yoo J.J., Atala A., 2006. Controlled fabrication of a biological vascular substitute, *Biomaterials*, 27: 1088-1094.
 - Suárez-Bagnasco D., Armentano R.L., Balay G., Cymberknop L.J., Brum J., Bia D., Negreira C., 2013. Measurement system for an in-

vitro characterization of the biomechanics and hemodynamics of arterial bifurcations, *Journal of Physics: Conference Series*, 421: 012018-012026.

- Wang S., Mo X.M., Jiang B.J., Gao C.J, Wang H.S., Zhuang Y.G, Qiu L.J, 2013. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency, *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2131-2139.
- Weston M.W., Rhee K., Tarbell J.M., 1996. Compliance and diameter mismatch affect the wall shear rate distribution near an end-to-end anastomosis, *Journal of Biomechanics*, 29: 187-198.
- Yin A., Zhang K., McClure M.J., Huang C., Wu J., Fang J., Mo X., Bowlin G.L., Al-Deyab S.S., El-Newehy M., 2013. Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co-e-caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A: 1292-1301.
- Zahedmanesh H., Mackle J.N., Sellborn A., Drotz K., Bodin A., Gatenholm P., Lally C., 2011. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B: 105-113.

Capítulo 5

**Citocompatibilidad y respuesta celular de matrices
nanofibrosas electrohiladas frente a distintos
estímulos**

5.1. Introducción

La matriz extracelular nativa está compuesta de una red de proteínas y glicosaminoglicanos de tamaño en el orden nanométrico. Los espacios intersticiales entre las células están ocupados con geles de estas biomacromoléculas y actúan como amortiguadores a la compresión en contra de los esfuerzos físicos presentes en los tejidos, influyendo dinámicamente en el fenotipo y otros comportamientos celulares al introducir señales biológicas y químicas. La estructura y los componentes de la matriz extracelular proporcionan soporte estructural e integridad mecánica a las células residentes y modulan las actividades celulares como migración, proliferación, diferenciación, expresión genética y secreción de hormonas y factores de crecimiento. La composición y el arreglo de las fibras de la matriz extracelular en un tejido pueden imponer un ajuste fino de las propiedades mecánicas. Las fibras de la matriz extracelular también ofrecen lugares para la adhesión celular y pueden regular su forma y patrones de migración en base a la composición y orientación de las mismas. A su vez, ciertas proteínas fibrosas estructurales pueden actuar como un reservorio para la liberación de péptidos bioactivos pequeños y factores de crecimiento (Beachley, 2010; Kai, 2013).

Las células cultivadas sobre sustratos nanoestructurados pueden tomar diferentes formas en respuesta a las características específicas encontradas. Las células reaccionan frente a objetos tan pequeños como 5 nm y es posible que las nanoestructuras especialmente aquellas con dimensiones similares a la matriz extracelular, puedan influenciar en el comportamiento celular a través de mecanismos aún poco conocidos. La figura 5.1. muestra como las células presentan mayor cantidad de puntos de unión en matrices nanofibrosas frente a soportes microestructurados (Stevens, 2005). Hasta hace poco, se creía que al imitar la estructura porosa de la matriz extracelular, ya sea mediante una matriz natural o artificial, ésta solo servía como soporte para las células. El enfoque principal estaba centrado en cuestiones críticas de la ciencia e ingeniería de biomateriales,

tales como mejorar el transporte de masa hacia dentro y fuera de las estructuras y diseñar matrices porosas biodegradables y biocompatibles con propiedades mecánicas aptas para la ingeniería de tejidos. Con el tiempo se puso mayor énfasis en las propiedades biológicas de la matriz y se incorporaron factores bioactivos (Dvir, 2011).

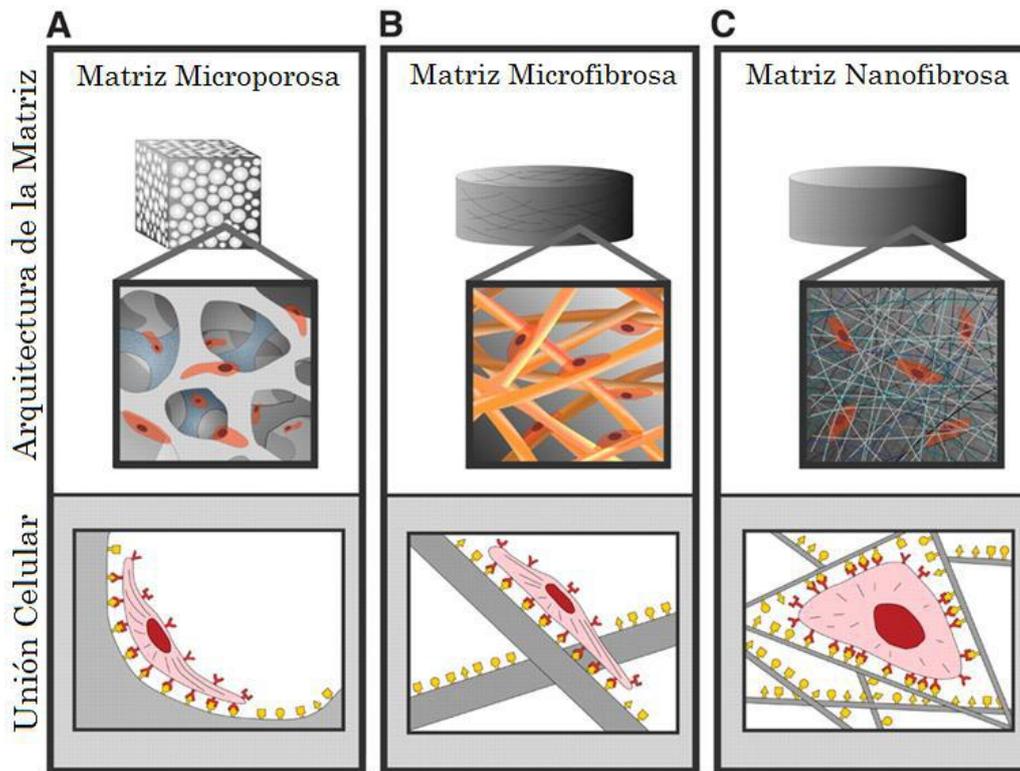


Figura 5.1. Efecto de la arquitectura de la matriz soporte en la adhesión y unión celular (adaptada de Stevens, 2005).

Una de las características más importante de las estructuras nanofibrosas obtenidas por la técnica de electrohilado es su capacidad para imitar la matriz extracelular. Más aún, las nanofibras poliméricas pueden diseñarse de forma de modular una variedad de comportamientos celulares. Se sabe que la topografía de las nanofibras por sí sola, independientemente del material del cual estén constituidas, tiene un potencial para modular comportamientos deseados en ingeniería de tejidos como alineación unidireccional, viabilidad, adhesión y producción de matriz extracelular aumentados, migración celular guiada, y diferenciación controlada. La

versatilidad de las nanofibras poliméricas para funcionalizarse con biomoléculas abre la puerta a vastas oportunidades para el diseño de matrices soporte para ingeniería de tejidos con mayor grado de control sobre la incorporación y función celular.

Varios tejidos como los nervios, los músculos cardíacos y esqueléticos, los tendones, ligamentos y vasos sanguíneos poseen células orientadas en un arreglo bien alineado. Por lo tanto, en este tipo de tejidos, resulta necesario disponer de matrices con características topográficas de orientación para inducir la formación de arreglos de células alineadas. La técnica de electrohilado permite obtener arreglos de nanofibras alineadas. Diferentes líneas celulares han mostrado capacidad para copiar la topografía de la matriz, observando que las células adquieren una forma alargada en la dirección de las nanofibras. En el caso de tejidos cardiovasculares, el uso de una matriz con nanofibras alineadas ha logrado la formación de arreglos con muy buena alineación para células humanas de musculo liso, células endoteliales de vena umbilical humanas y de aorta bovina y células mesenquimales de la matriz del cordón umbilical humano (Wu, 2010; Uttayarat, 2010; Kenar, 2010; Kenar, 2011; Nivison-Smith, 2012; Jia, 2014; Whited, 2013; Sankaran, 2014; Shalumon, 2015). Muy pocos autores lograron obtener una morfología de fibras alineadas al emplear un colector de pequeño diámetro en la producción de injertos vasculares de pequeño diámetro. K.T. Shalumon *et al.* realizaron injertos de pequeño diámetro de forma indirecta, mediante la deposición de nanofibras sobre un colector rotatorio de gran diámetro que luego se removieron y enrollaron alrededor de un tubo de pequeño diámetro de Teflon uniendo los bordes con cloroformo (Shalumon, 2015). P. Uttayarat *et al.* lograron producir un injerto vascular de 4 mm de diámetro con nanofibras orientadas circunferencialmente mediante un colector de pequeño diámetro. Sin embargo, la velocidad de rotación utilizada para producir estos injertos fue de 35.000 rpm, velocidad que es muy superior a las encontradas en la mayoría de los motores comerciales (Figura 5.2. a) (Uttayarat, 2010). Por otro lado, K.K. Sankaran *et al.* utilizaron un colector de pequeño diámetro con partes aislantes a lo

largo del eje de forma de obtener tubuladuras con nanofibras orientadas en la dirección axial, también se utilizó una velocidad de rotación alta para mejorar la alineación (Sankaran, 2014). H. Wu *et al.* lograron obtener tanto fibras alineadas en dirección circunferencial como en dirección axial, aunque un menor grado de alineación en este último caso, mediante la modificación del campo eléctrico (Wu, 2010). Para ello utilizaron un colector auxiliar de placas paralelas, similar al descrito en el capítulo 2 para orientar las fibras de PLLA, ubicado debajo del mandril rotatorio de pequeño diámetro. En todos estos casos observaron que las células adoptaron la topografía de las nanofibras producidas, mostrando que esta es una buena estrategia para imitar el comportamiento de los vasos vasculares nativos. Sin embargo, dada la gran dificultad en producir esta orientación para los injertos de pequeño diámetro, se deben considerar otros mecanismos.

Las células no solo responden a la topografía del substrato sobre el que son cultivadas sino también a estímulos mecánicos. En el cuerpo humano estas se encuentran sometidas a sollicitaciones variadas. La adhesión, proliferación y diferenciación celular no son las mismas en un cultivo *in vitro* estanco que en un cultivo dinámico. Los estímulos mecánicos se aplican en biorreactores, los cuales brindan herramientas para direccionar el desarrollo de tejidos funcionales *in vitro*, al simular un ambiente mecánico, físico y biológico apropiado. Las fuerzas asociadas con la distensión de los vasos sanguíneos tienen una influencia directa en las células endoteliales y las de músculo liso, mientras que los esfuerzos de corte influyen en el recubrimiento de la pared del vaso con células endoteliales. S. Dermenoudis *et al.* diseñaron un biorreactor que permite la aplicación de distintas sollicitaciones mecánicas y observaron que las células se orientan en respuesta a la sollicitación aplicada (Dermenoudis, 2010). Las células copiaron la dirección del flujo y se elongaron en esta misma dirección cuando se sometieron a esfuerzos de corte de 10^3 s^{-1} . Las deformaciones cíclicas uniaxiales de 6,7% a 1 Hz indujeron una alineación vertical al flujo, es decir en la dirección circunferencial del injerto, y una mayor elongación que antes (Figura 5.2. b).

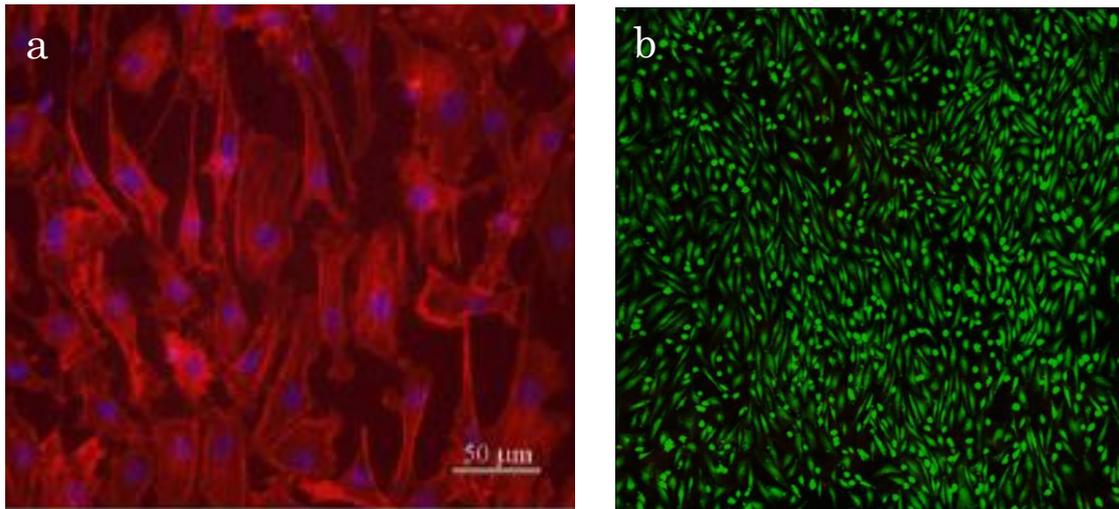


Figura 5.2. Células con orientación preferencial en la dirección circunferencial de dos injertos vasculares debido a: a) la alineación de las nanofibras (Uttayarat, 2010), y b) como resultado de aplicar una deformación axial cíclica en un biorreactor (Dermenoudis, 2010).

X. Peng *et al.* también observaron la alineación de las células y una nueva disposición del citoesqueleto en respuesta a deformaciones pulsátiles, flujo y señales combinadas (Peng, 2000). Los biorreactores influyen además en otros aspectos del injerto vascular y las células cultivadas sobre estos. M.S. Hahn *et al.* observaron que la proliferación celular, el contenido de colágeno y el módulo elástico de los injertos vasculares fueron positivamente afectados por la estimulación en flujo pulsátil (Hahn, 2007). T.M. Maul *et al.* observaron que las células precursoras de médula ósea respondieron a una presión hidroestática cíclica con alteraciones en la morfología y un aumento en la proliferación (Maul, 2007). Los cultivos dinámicos resultaron en una forma de estimular la proliferación celular sin el agregado de agentes bioactivos, lo cual puede reducir el tiempo de cultivo *in vitro* para la obtención de un injerto completamente celularizado. En otro estudio, el mismo grupo demostró que los cultivos dinámicos en un biorreactor inducen la diferenciación de las células madres hacia células de músculo liso y células endoteliales (Maul, 2011). Las expresiones proteicas de células de músculo liso se obtuvieron cuando las células madres mesenquimales

estaban expuestas a deformaciones cíclicas, siendo esta respuesta fuertemente dependiente de la magnitud y la frecuencia aplicada. Además, la morfología de las células cambió hacia una forma más alargada. Al analizar la diferenciación hacia células endoteliales se observó un único marcador, el cual sugiere la potencialidad de dichas células para diferenciarse en endoteliales. Más aún, la falta de marcadores para adipocitos u osteoblastos sugiere que el estímulo mecánico característico de la vasculatura induce una diferenciación específica vascular.

Otra forma de favorecer la proliferación y regeneración celular es mediante estímulos químicos, incorporando moléculas bioactivas a las matrices porosas o injertos. Puede incorporarse a las nanofibras poliméricas una variedad de biomoléculas y drogas distintas durante la fabricación de las mismas o en post-procesamiento mediante técnicas de modificación superficial. De esta forma se guía a las células hacia la función y el comportamiento deseados. Los tratamientos de funcionalización superficial se han realizado mediante absorción física o uniones superficiales covalentes. La modificación superficial es una estrategia que ha dado buenos resultados para el caso de injertos vasculares, donde se han incorporado factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y heparina con el fin de mejorar la endotelización de los injertos y evitar la formación de coágulos (Miyazu, 2010; Ye, 2012; Wang, 2013a; Pitarresi, 2014, Rujitanaroj, 2014). También se ha estudiado el efecto de las mismas biomoléculas al incorporarlas dentro de las fibras, ya sea por electrohilado co-axial o como mezcla física (Wang, 2013b; Han, 2013; Zhang, 2013). La técnica de incorporación directa permite incorporar mayor cantidad de biomoléculas y mejora la bioactividad en comparación con las técnicas de modificación superficial.

Los factores de crecimiento juegan un rol importante en la regeneración de tejidos debido a su habilidad para promover la proliferación, diferenciación y quimiotaxis celular. El plasma rico en plaquetas (PRP) y su polvo liofilizado (preparación rica en factores de crecimiento, PRGF) están ganando atención como una fuente natural, económica, y fácil de obtener de

factores de crecimiento (Anitua, 2001; Anitua, 2010; Lubkowska, 2012; Horimizu, 2013). El PRP realiza la respuesta regenerativa tisular por medio de la activación complementaria de cambios microvasculares y proliferación endotelial, manteniendo una proporción fisiológica de los factores de crecimiento (Lu, 2008; Anitua, 2010). El PRP también contiene otras moléculas bioactivas relevantes como fibrinógeno, trombospondina-1 o laminina-8, los cuales poseen un rol principal en las interacciones célula a célula y célula a matriz (Bir, 2009; Lee, 2012). Para nuestro conocimiento, se han electrohilado pocas matrices que incluyan PRP en su estructura. El grupo de G.L. Bowlin trabajó con mezclas de PRGF y PCL, PGA o fibrina de seda, así como también fibras de PRGF puro. Observaron una liberación controlada, tanto del nivel de proteínas genéricas como de ciertos factores de crecimiento puntuales, durante un mes. El PRGF favorece la infiltración celular así como también la proliferación (Sell, 2011; Wolfe, 2011). Por otro lado, V. Bertoneclj *et al.* desarrollaron matrices electrohiladas de quitosano y PEO con PRP. Observaron un efecto sinérgico en la proliferación celular debido al PRP y la topografía de la matrices (Bertoneclj, 2014). Otro abordaje ha sido la modificación superficial de la matriz nanofibrosa mediante absorción de PRP sobre la matriz porosa, creando así un ambiente rico en factores de crecimiento que ha mostrado favorecer la proliferación y diferenciación celular (McClure, 2013; Díaz-Gómez, 2014). Por lo tanto, la combinación de PRGF en conjunto con la topografía de las nanofibras ayuda a la producción de injertos más bioactivos, cumpliendo con la necesidad del mercado de un injerto listo para usarse con tiempos cortos de cultivos previos *in vitro*.

En este capítulo se estudió la respuesta celular frente a distintos estímulos en matrices nanofibrosas. Se eligió al PLLA como material modelo y al mismo tiempo por formar parte de las mezclas utilizadas en los injertos vasculares de pequeño diámetro. Se estudió la respuesta celular frente a estímulos topográficos como la orientación de las nanofibras en una dirección preferencial, se analizó también la respuesta celular frente a estímulos químicos, como la incorporación de PRGF dentro de las

nanofibras, y frente a estímulos mecánicos en biorreactor. Finalmente, se analizó la citotoxicidad de matrices electrohiladas de las mezclas utilizadas en las dos capas de los injertos vasculares.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

5.2.1.1. Materiales

Se utilizaron matrices planas obtenidas por la técnica de electrohilado descritas en el capítulo 2, sección 2.2.2.1., para el PLLA se modificaron algunos parámetros en función de los parámetros óptimos para realizar las matrices alineadas y la incorporación de PRGF (Sección 5.2.1.3.).

Se utilizaron solución reguladora de fosfato (PBS, pH 7.4) obtenida en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (MSC) StemPRO® de Gibco (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), láminas de mioblastos diafragmáticos genéticamente modificados obtenidas de biopsia de ovejas, y un kit de ensayo de proteínas (ácido bicinonínico) Pierce™ BCA (BCA) de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico y se utilizaron tal como fueron recibidos.

5.2.1.2. Obtención de preparación rica en factores de crecimiento (PRGF)

El PRGF se preparó en el Centro de Transfusión de Galicia (España). Se obtuvo capa leucocitaria humana de donantes sanos, la que se centrifugó por 15 minutos a 400g. Se recolectó la fracción superior, que contiene concentración alta en plaquetas (PRP). Las plaquetas se activaron a través de ciclos de congelación (-80°C)-descongelación (20°C) (uno al día, por 4 días) para permitir la liberación de los factores de crecimiento GFs a partir de

gránulos alpha densos. Luego, el PRP se centrifugó a 12,000g por 10 min a 4 °C para separar los factores de crecimiento que contienen plasma de las plaquetas remanentes. Se midió la concentración de VEGF por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (RayBiotech, USA). El sobrenadante se congeló a -80 °C y liofilizó, y se mantuvo a -80 °C el polvo seco obtenido (PRGF) hasta su uso.

5.2.1.3. Obtención de matrices nanofibrosas electrohiladas

Se prepararon matrices porosas de PLLA con fibras bien alineadas y orientadas al azar, según los parámetros estudiados en el capítulo 2, sección 2.2.2.1., para estudiar la respuesta celular frente a la topografía de las nanofibras. Se obtuvieron matrices alineadas a partir de un colector formado por dos marcos dieléctricos (de madera) colocados sobre un colector de aluminio plano como se muestra en la figura 5.3. Este sistema permitió la recolección de fibras entre los marcos, así como también entre el marco pequeño y la placa colectora en una forma altamente alineada.

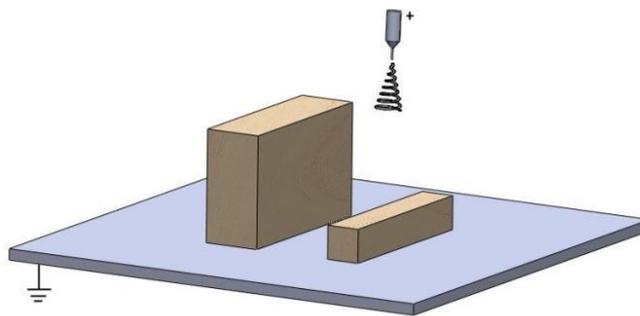


Figura 5.3. Esquema del colector utilizado para obtención de matrices con nanofibras alineadas.

Se incorporó PRGF en las nanofibras para promover la proliferación, diferenciación y quimiotaxis celular, y obtener un sistema de liberación sostenida en el tiempo de factores de crecimiento. El PRGF se agregó en distintas concentraciones (10, 30 y 50 mg/ml) (Tabla 5.1.).

Tabla 5.1. Soluciones de PLLA/PRGF en DCM/DMF 60/40.

Muestra	Concentración de PLLA (p/v)	Concentración de PRGF (p/v)
10/0	10	0
10/1	10	1
10/3	10	3
10/5	10	5

Además, se utilizaron matrices de las mezclas interna (50/50) y externa (90/10) PLLA/PHD con los parámetros y condiciones analizados en la sección 2.2.2.1. del capítulo 2.

5.2.2. Caracterización fisicoquímica de matrices nanofibrosas electrohiladas

Las matrices porosas de PLLA/PRGF se caracterizaron mediante las técnicas descritas en las secciones 3.2.3. y 3.2.4. (SEM, DSC, FTIR, ángulo de contacto).

5.2.3. Cultivos *in vitro*

5.2.3.1. Ensayos de proliferación de células madre mesenquimales (MSC)

Se colocaron fragmentos de las matrices porosas (25 mm²) en placas de 24 pocillos, esterilizados en etanol (80% v/v), lavados tres veces en PBS y pre-incubados en medio de cultivo, preparado con MesenPro RS (96%), suplemento de crecimiento MesenPro (2%), glutamina (1%) y antibióticos (penicilina- estreptomycin; 10,000 unidades/mL y 10,000 µg/mL, respectivamente) (1%), durante la noche. Se cultivaron células MSCs sobre cada matriz a una concentración de 2x10⁴ células/pocillo en 200 µL de medio y se lo dejó actuar por 25 min. Luego, se agregó 1 mL de medio de cultivo a cada pocillo. Se utilizaron aros de vidrio Pyrex® para evitar la flotación de

las matrices y su contracción. Se cultivaron las células por 14 días en las matrices de PLLA aleatorias, alineadas, y en las mismas con distinto porcentaje de PRGF, así como también en matrices de las mezclas PLLA/PHD 50/50 y 90/10. La proliferación de las MSCs se cuantificó en los días 1, 3, 7 y 14 usando un ensayo MTT (Roche, Switzerland). Brevemente, las matrices porosas se incubaron con un reactivo MTT a 37 °C por 4 h y después durante la noche con el detergente incluido en el kit. Las soluciones finales se colectaron y midieron a 550 nm (UV Bio-Rad Model 680 microplate reader, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.3.2. Evaluación de la morfología y citocompatibilidad de las células

Se cultivaron células MSCs (2×10^4 células/matriz) sobre matrices alineadas y al azar en placas de 24-pocillos, como se describió en la sección 5.2.3.1. Luego de 7 días de cultivo se fijaron las células MSCs con paraformaldehído (4% en PBS) seguido de su deshidratación en etanol (70% v/v). Las matrices se cubrieron con un recubrimiento de oro y se observaron mediante SEM (Zeiss Ultra Plus, Germany). También se realizó una tinción vivo-muerto para analizar la citocompatibilidad y morfología celular. Las MSCs cultivadas por 7 días en las matrices aleatorias, alineadas y con distinto porcentaje de PRGF se lavaron con PBS y se tiñeron con una solución de calceína (1 mg mL^{-1})/yoduro de propidio (1 mg mL^{-1})/PBS 2/1/97 v/v. La morfología y viabilidad celular se evaluó a partir de imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia confocal laser (LCS, Leica Microsystems, Germany), luego de la incubación en la oscuridad por 10 min (color verde, citoplasma de células vivas). Las micrografías confocales se procesaron con el software ImagePro Plus (Media Cybernetics Inc., USA) para medir el ángulo de orientación de las células. Se midió un total de por lo menos 300 citoplasmas por micrografía de forma de obtener un valor estadístico significativo.

5.2.3.3. Estudio del proceso de liberación de proteínas

Las matrices porosas electrohiladas de PLLA/PRGF con topografía aleatoria se cortaron en forma de discos de 12 mm de diámetro, se esterilizaron en etanol (80% v/v), se lavaron tres veces en PBS y se colocaron en placas de 24 pocillos. Cada pocillo se llenó con 1 mL de PBS y se incubó a 37 °C y 5% CO₂. Se recolectó el medio en los días 1, 3, 7, 11 y 21, y los pocillos se rellenaron con PBS. Las alícuotas se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su análisis. Se usó un ensayo BCA para cuantificar la liberación total de proteínas. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) hasta 2 mg/mL.

5.2.3.4. Cultivos celulares con estímulos mecánicos en biorreactor

La aplicación de un estímulo mecánico unidireccional se estudió en biorreactor. Se utilizaron matrices nanofibrosas de PLLA aleatorias electrohiladas como soportes biomiméticos para el cultivo celular. Las matrices se cultivaron con láminas de mioblastos diafragmáticos genéticamente modificados obtenidas de biopsia en ovejas. Se ensayaron en el biorreactor por 4 días con una sollicitación de tracción dinámica con frecuencia 5 Hz y ciclos de 2 días alternados de 1 hora de estímulo, 1 hora de descanso y 2 días de estímulo permanente. Posteriormente las matrices cultivadas se fijaron y tiñeron con hematoxilina-eosina y observaron en microscopio óptico.

5.3. Resultados

5.3.1. Cultivos *in vitro* sobre matrices de PLLA

5.3.1.1. Cultivo de MSC en matrices nanofibrosas con distintas topografías

Se obtuvieron matrices porosas a partir del electrohilado de PLLA (C = 10% p/v) con un diámetro medio de fibras de 325 ± 62 nm y 487 ± 167 nm, para las matrices con orientación aleatoria y alineada respectivamente. En cuanto a las matrices alineadas se logró una muy buena orientación de las nanofibras, siendo el ángulo medio de $90 \pm 20,18^\circ$. Las medidas de los ángulos se normalizaron a 90° para facilitar la comparación. Aunque la desviación estándar obtenida no fue muy pequeña, la matriz presentó un histograma de distribución de ángulos unimodal que confirma la alineación de las fibras en una dirección preferencial (Figura 5.4.).

Se observó tanto por SEM como por microscopía confocal, una buena adhesión de MSC en las matrices electrohiladas. Las células adoptaron la topografía de las matrices nanofibrosas, tanto aleatoria como alineada. La figura 5.5. presenta las micrografías en donde se puede apreciar las células orientadas en la dirección de las nanofibras. La falta de células de coloración roja en las micrografías confocales indica la alta citocompatibilidad y baja toxicidad de las matrices. En ambos casos las células copiaron la topografía, obteniendo una morfología alargada, aunque en menor medida, también para las matrices con orientación aleatoria.

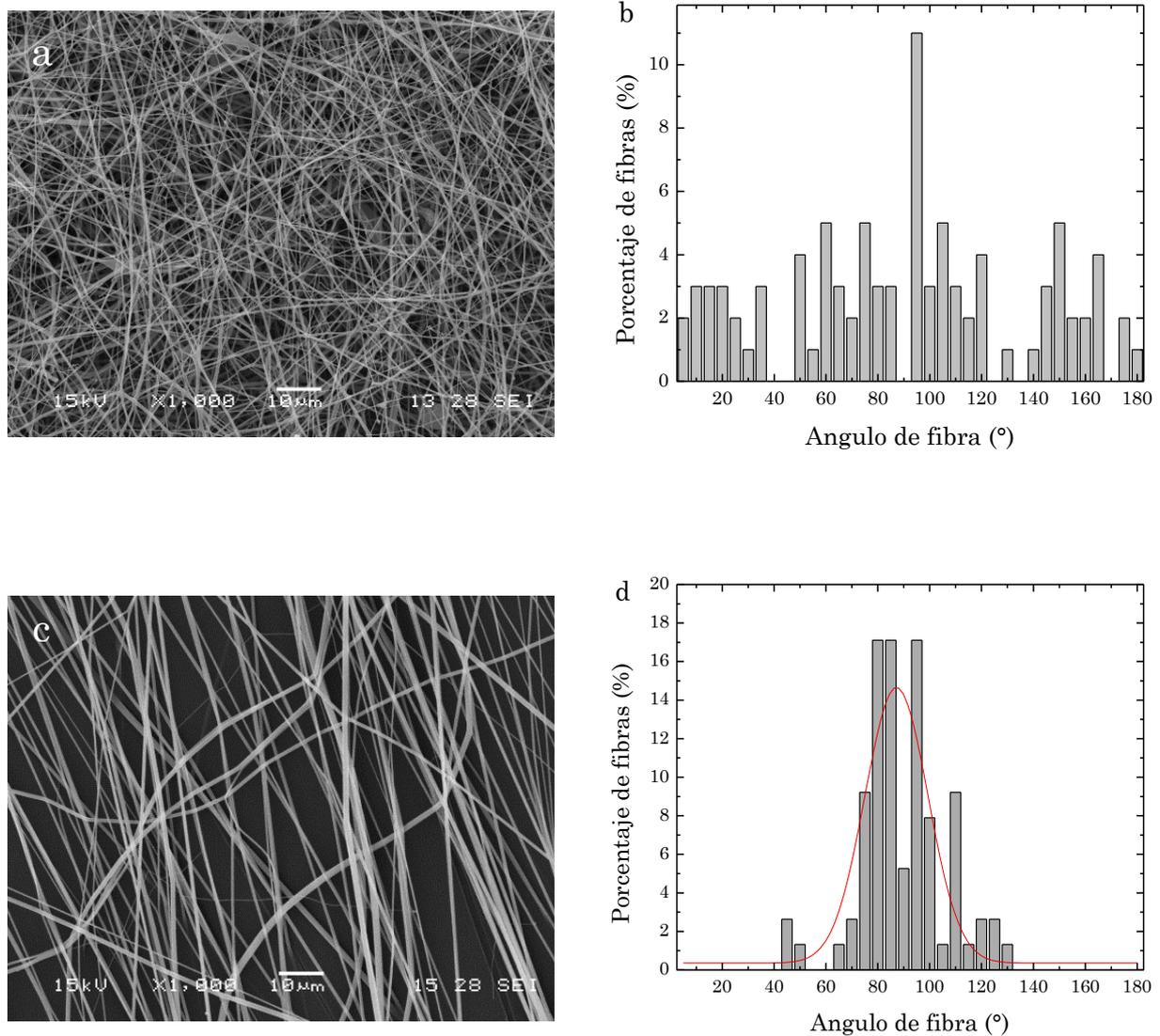


Figura 5.4. Resultados del análisis por SEM y los histogramas para fibras (a, b) aleatorias y (c, d) alineadas de PLLA.

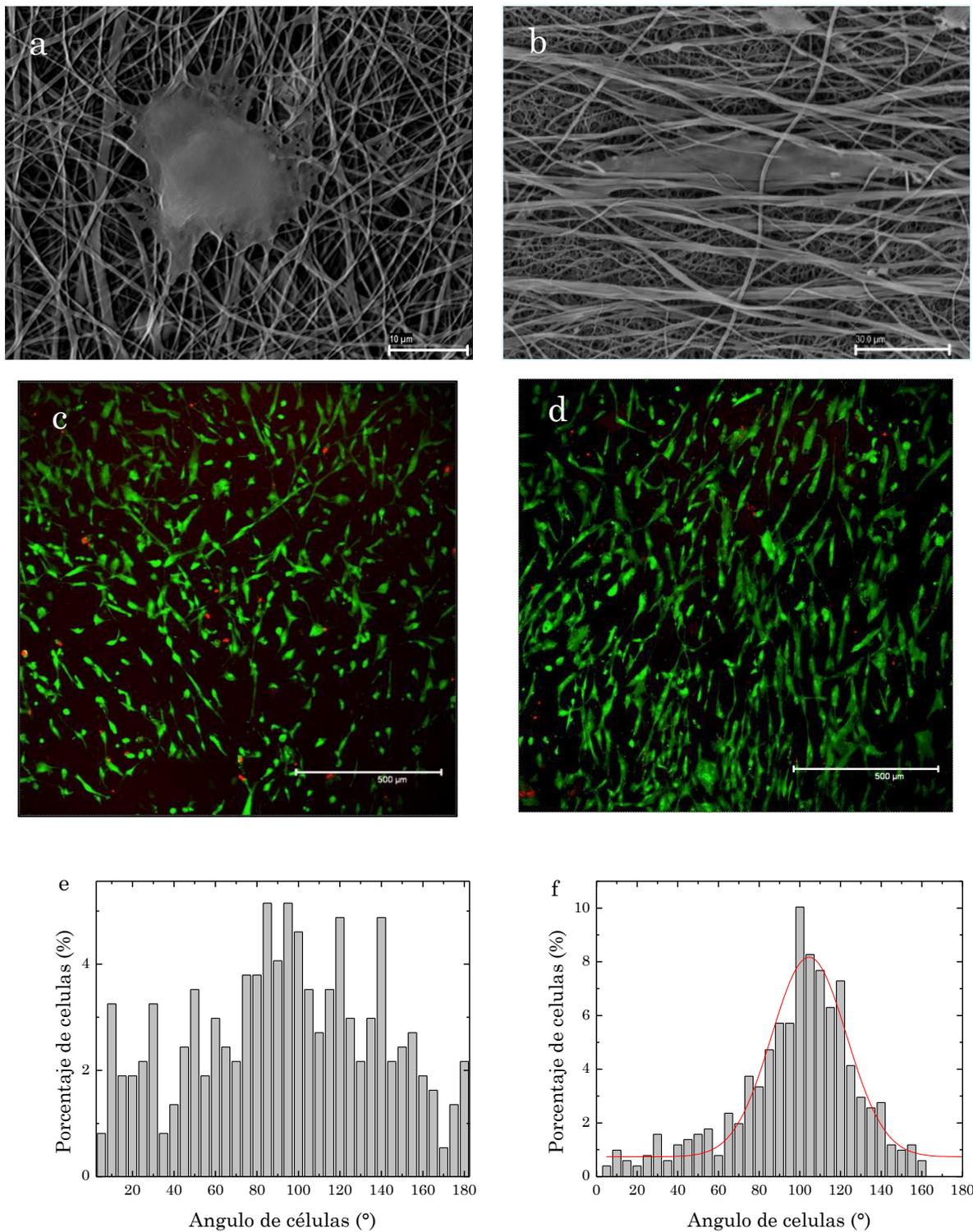


Figura 5.5. (a-b) Micrografías SEM y (c-d) micrografía confocal de MSC cultivadas en (a-c) una matriz de PLLA al azar, y (b-d) alineadas, y sus correspondientes histogramas de distribución de ángulos (e) y (f).

Las diferencias en la orientación de las células se mantuvo hasta la convergencia de las células en las matrices, en concordancia con estudios previos sobre topografías alineadas usando MSCs (Prodanov, 2010; Shang, 2010). Los ligandos de unión de integrina, lamellipodia y filopodio, parecen ser la clave en la alineación de las células mediada por la topografía (Teixeira, 2003). La organización de las fibras promueve la orientación de las células a través de guía por contacto, la cual se mejora cuando el diámetro medio de las fibras es cercano a 300 nm. Esta topografía facilita la formación de una monocapa de células continuas en la matriz (Whited, 2014). Se observa la potencialidad de obtener distinta orientación celular según la topografía de las matrices subyacentes y de extrapolar estos resultados preliminares en matrices planas a injertos vasculares electrohilados con distinta orientación preferencial de las nanofibras.

5.3.1.2. Cultivo de MSC en matrices con distinto estímulo químico

La incorporación de PRGF en las matrices porosas resultó en un diámetro de fibra medio de 402 ± 182 nm, 354 ± 119 nm, y 339 ± 147 nm para PLLA/PRGF 10/1, 10/3 y 10/5, respectivamente. Estos resultados, no presentaron cambios significativos en el tamaño de las fibras con el incremento de la concentración de PRGF ($p > 0,05$), en concordancia con trabajos previos de PRGF incorporado en nanofibras electrohiladas (Sell, 2011).

La incorporación del PRGF en las fibras se observó por FTIR (Figura 5.6.). El espectro de FTIR del PRGF mostró los picos característicos de las amidas I y II de las proteínas en 1644 y 1534 cm^{-1} , respectivamente. Estos picos, ausentes en la curva de la matriz de PLLA, se manifiestan en las matrices de PLLA/PRGF 10/1, 10/3 y 10/5; a mayor concentración de PRGF, mayor intensidad de los picos del espectro. Esto demuestra una exitosa incorporación del PRGF en las matrices. Las curvas de FTIR también mostraron los picos carbonilos a 1755 cm^{-1} y el estiramiento del enlace C-O a 1092 cm^{-1} , los cuales son característicos del PLLA.

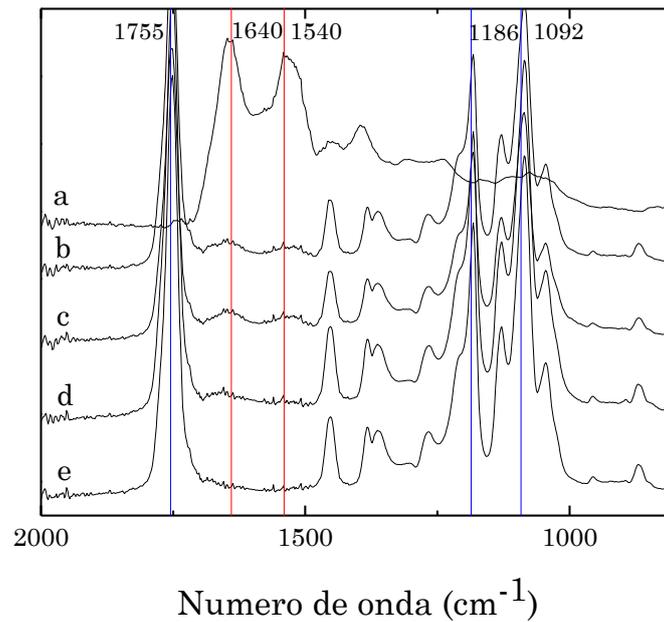


Figure 5.6. Espectros de FTIR de a) polvo de PRGF, y b) matrices de PLLA/PRGF 10/5, c) 10/3, d) 10/1 y e) 10/0.

Se analizaron las muestras por calorimetría diferencial de barrido (Tabla 5.2.). Los termogramas no mostraron cambios significativos debido a la incorporación del PRGF, sino sólo debido al procesamiento por electrohilado. La incorporación del PRGF disminuyó la T_g , lo que indica que la inclusión de componentes proteicos entre las cadenas de polímeros produce un efecto plastificante.

También, se estudió el cambio en la hidrofiliidad de las matrices al incorporar PRGF, mediante la medición del ángulo de contacto. Se obtuvieron valores de 126° , $122,7^\circ$ y $124,3^\circ$, para las matrices 10/0, 10/1 y 10/3 respectivamente. Estos se encuentran en el orden de los medidos para los injertos vasculares de PLLA en el capítulo 3 (Sección 3.3.1.4.). En las matrices de PLLA/PRGF 10/5 la gota de agua destilada se absorbió en unos pocos segundos, indicando un comportamiento hidrofílico. El aumento de la concentración de PRGF incrementó el contenido de PRGF en la superficie de la matriz y en consecuencia se produjo un incremento en la hidrofiliidad de las mismas, favoreciendo la adhesión celular (Duan, 2007).

Tabla 5.2. T_g , T_c y T_m , ΔH_c , ΔH_m , y X_c para el PLLA sin procesar, matrices electrohiladas de PLLA y PLLA/PRGF.

Muestra	T_g (°C)	T_c (°C)	ΔH_c (J g ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	X_c^a (%)
PLLA sin procesar	61,4	---	---	152,5	35,0	37,6
10/0	56,1	81,8	10,9	153,9	30,5	21,1
10/1	51,9	76,3	11,7	151,0	32,4	22,2
10/3	50,7	77,5	2,9	155,9	17,8	15,9
10/5	48,6	77,2	14,6	146,8	28,2	14,6
PRGF	---	---	---	---	---	---

^a X_c para el PLLA se calculó considerando 93 J g⁻¹ como la ΔH_m para el PLLA 100% cristalino (Fischer, 1973).

Los ensayos de liberación de proteína total a partir de las matrices porosas de PLLA/PRGF se realizaron en PBS por tres semanas a 37 °C, por medio de un ensayo BCA (Figure 5.7.). Sorprendentemente la liberación del PRGF no presentó un efecto de liberación inicial rápida (*burst effect*) incluso en las muestras con una concentración de PRGF de 50 mg/ml. Se liberaron cantidades detectables de proteínas en las primeras 24 h a partir de las matrices de PLLA/PRGF 10/1, 10/3 y 10/5, sin embargo solo la última matriz liberó niveles significativamente superiores al control (10/0) ($p < 0,05$). La liberación de las proteínas presentó una disminución de la velocidad entre los días 3 y 7, lo que puede ser asociado a un lapso de tiempo en donde la liberación de las proteínas pasa de la superficie al cuerpo de las matrices. Las matrices de PLLA/PRGF 10/1, 10/3 y 10/5 contienen aproximadamente 72, 184 y 266 µg de proteína por mg de matriz respectivamente, teniendo en cuenta que el PRGF tiene un contenido total de proteína del 80% (Díaz-Gómez, 2014). La matriz de PLLA/PRGF 10/5 liberó hasta 180 µg por mg de material luego de 21 días; el 67,7% de la carga útil. La matriz de PLLA/PRGF 10/3 liberó 24,6 µg de proteína por mg de matriz; el 13,4% de la carga útil. La liberación fue del 11% al día 21 para el caso de la matriz PLLA/PRGF 10/1. La liberación más rápida de la matriz PLLA/PRGF 10/5 en comparación con las otras dos se explica por cambios en la estructura del volumen de la matriz por encima de un valor dado de concentración de PRGF. A diferencia del PLLA, el PRGF es hidrofílico y se disuelve a medida

que el agua tiene acceso a la estructura interna de la matriz. Como se observó a partir de las medidas de ángulo de contacto, las matrices con contenido en peso de PRGF del 9% y 23% (PLLA/PRGF 10/1 y 10/3) se comportan como hidrofóbicas, lo que significa que dichos contenidos de proteínas causan pequeños cambios en el volumen de la estructura de la matriz de PLLA y que las proteínas se encuentran intercaladas entre las cadenas de PLLA. Por lo tanto, luego de la liberación de las proteínas más accesibles, la red de PLLA previene efectivamente el acceso del medio de liberación al volumen hasta que la degradación del PLLA ocurra. Contrariamente, en las matrices con alto contenido de PRGF, 33,3% (PLLA/PRGF 10/5), hay un exceso de proteínas para ser encapsuladas en la matriz. Se produce así una liberación mayor, relacionada principalmente al acceso directo de las proteínas al medio de liberación.

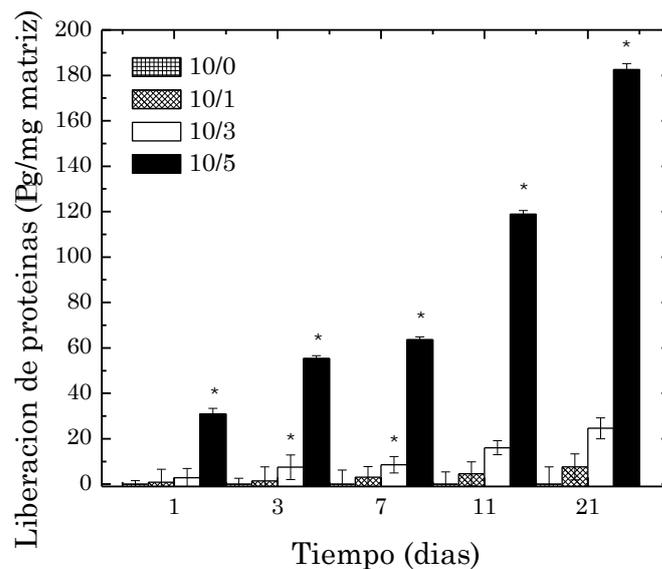


Figura 5.7. Suma acumulativa de proteínas liberadas a partir de matrices porosas de PLLA/PRGF en PBS a 37°C. *Diferencia estadística significativa con respecto a la matriz 10/0 ($p < 0,05$).

Se realizaron cultivos de MSCs con las matrices nanofibrosas preparadas con las soluciones detalladas en la tabla 5.1. Las MSCs cultivadas en las matrices de PLLA/PRGF 10/0 y 10/1 mostraron un crecimiento similar hasta los 7 días de cultivo, esto puede estar relacionado

al hecho que las matrices 10/1 liberan muy poca cantidad de PRGF durante ese periodo. Las matrices con mayor contenido de PRGF aumentan notablemente el crecimiento de las MSCs ($p < 0,05$) (Figura 5.8.). Tanto la matriz de PLLA/PRGF 10/3 como la 10/5 evidencian una mayor proliferación celular luego de 7 días. Las diferencias entre la densidad celular se estrechó luego de 14 días de cultivo, probablemente debido al hecho que las células adheridas a las matrices de PLLA/PRGF convergen entre sí. Al comparar los valores de absorbancia con el control positivo, se observa que todas las matrices con PRGF mostraron valores de proliferación de MSCs estadísticamente iguales a los 14 días. Hay que destacar que en todos los casos la proliferación de MSCs fue aumentando con el tiempo de cultivo, indicando una buena biocompatibilidad por parte de las matrices electrohiladas. La citotoxicidad de las matrices fue baja debido a la buena biocompatibilidad del PLLA (Simamora, 2006) y el PRGF autólogo (Anitua, 2005).

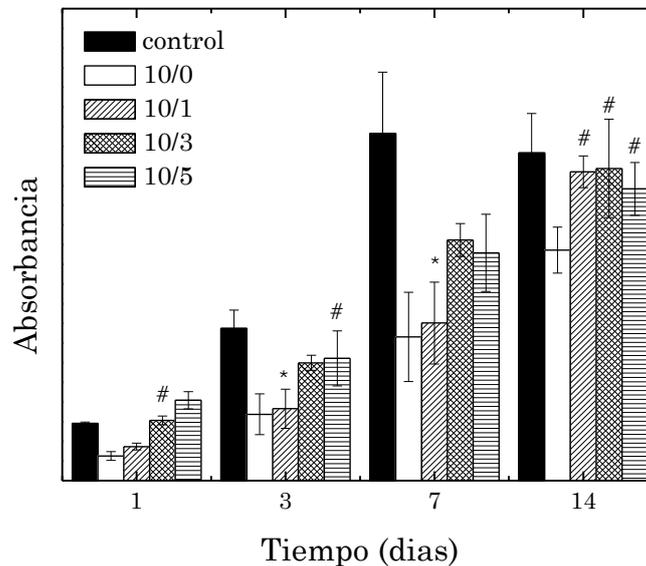


Figura 5.8. Proliferación de MSC en matrices de PLLA:PRGF mediante ensayo de MTT. * Igualdad estadística significativa con respecto a la matriz 10/0 ($p < 0,05$); # Igualdad estadística significativa con respecto al control + ($p < 0,05$).

Las muestras de PLLA sin PRGF mostraron una adhesión y proliferación celular buena (Figura 5.5. d-c), sin embargo la presencia de PRGF mejoró notablemente el comportamiento celular (Figura 5.9.).

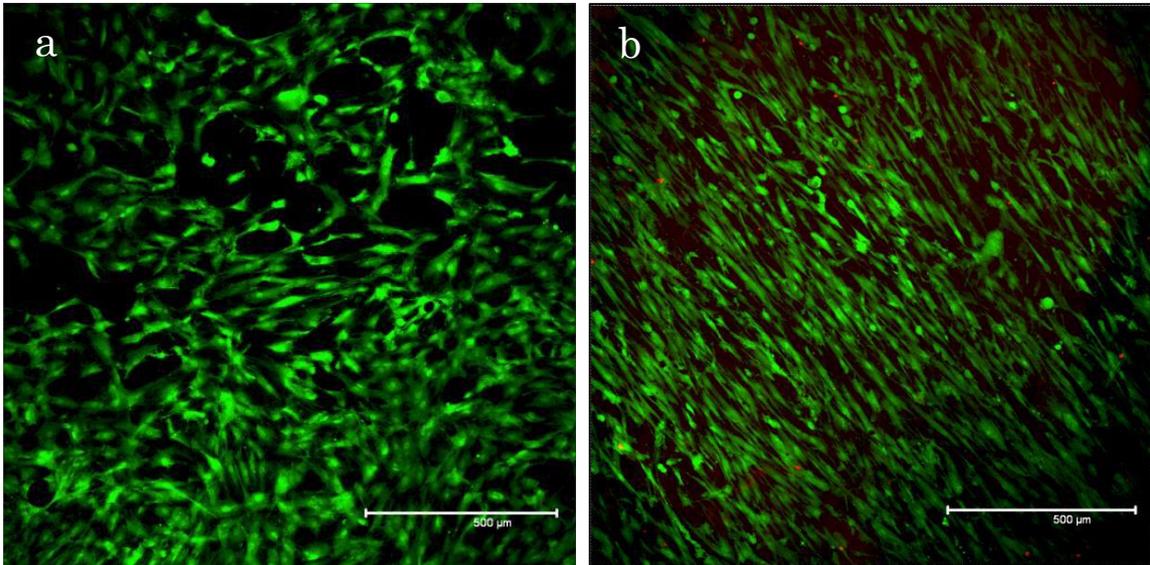


Figura 5.9. Micrografía confocal de MSC cultivadas en una matriz de a) PLLA con topografía aleatoria, y b) alineada con 5% p/v de PRGF.

5.3.1.3. Cultivos celulares con estímulos mecánicos en biorreactor

Se estudió la influencia de un estímulo mecánico en la topografía de las células luego de un periodo de cultivo *in vitro*. Se colocó una matriz nanofibrosa de PLLA con orientación al azar en un biorreactor desarrollado en la Universidad Favaloro (Figura 5.10. a y b) que aplica estímulos de tracción uniaxial. En condiciones estáticas de cultivo esta matriz no presentó una orientación preferencial de MSCs, como se describió en la sección 5.3.1.1. La figura 5.10. c) presenta una micrografía luego del cultivo en donde se observa una muy buena alineación de las células debido al estímulo mecánico. A su vez, se puede suponer, cualitativamente, que la proliferación celular es mayor en un cultivo dinámico dado que la micrografía resultante del cultivo en biorreactor a los 4 días de cultivo (Figura 5.10. c) presenta mayor densidad celular que la resultante del cultivo estático (Figura 5.4. a) a los 7 días de cultivo.

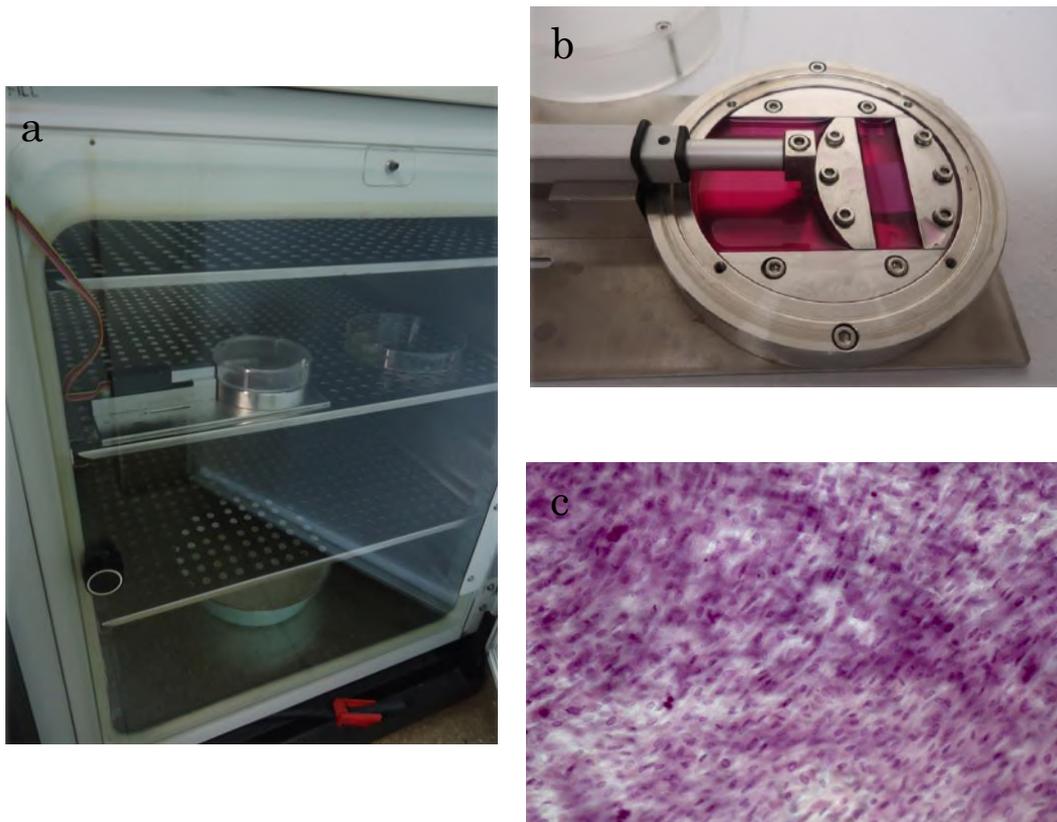


Figura 5.10. (a, b) Biorreactor para cultivos celulares con estímulo de tracción, y c) micrografía de la matriz luego de ser cultivada en el biorreactor.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía (Dermenoudis, 2010; Dermenoudis, 2010b), donde se destaca la importancia de cultivos *in vitro* en biorreactores bajo estímulos mecánicos que imiten las situaciones mecánicas a las que va a estar sometida la matriz porosa. Esta estrategia constituye una alternativa para copiar la topografía de las células dentro de los tejidos vasculares, evitando la utilización de una matriz alineada difícil de obtener para los injertos de pequeño diámetro. Estos resultados no solo muestran cómo la topografía y densidad de las células cultivadas se puede favorecer por un estímulo mecánico, sino también la tolerancia de matrices electrohiladas a cultivos con deformaciones y tensiones dinámicas.

5.3.2. Cultivo *in vitro* en matrices nanofibras de PLLA/PHD con la composición de las capas interna y externa de los injertos vasculares

Se realizaron cultivos de MSCs sobre matrices porosas de mezclas de PLLA y PHD, en las proporciones correspondientes a la capa interna (50/50) y externa (90/10) de los injertos vasculares de pequeño diámetro, para evaluar su citocompatibilidad. Los resultados obtenidos (Figura 5.11.) muestran resultados aceptables, donde si bien la proliferación celular no aumenta con el tiempo, salvo para el caso de la capa externa a los 14 días, esta se mantiene constante, indicando que las matrices no son tóxicas. Sin embargo, la proliferación de MSCs en la capa interna se encuentra a la mitad del valor del control positivo a los 14 días.

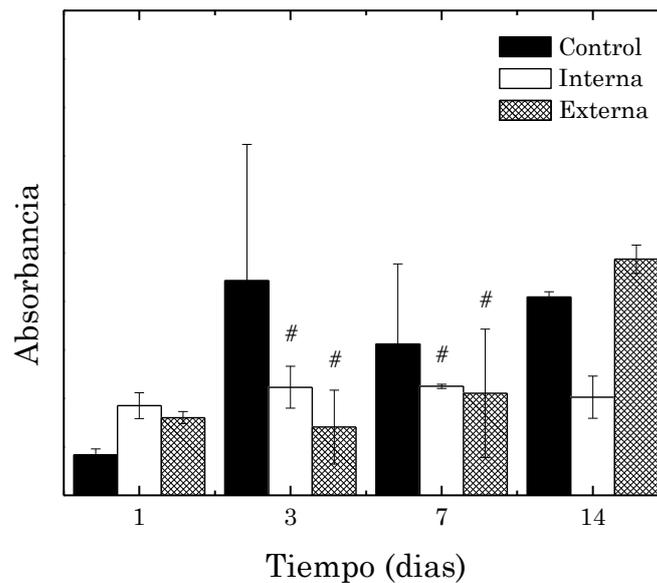


Figura 5.11. Proliferación de MSC en matrices de PLLA/PHD 90/10 y 50/50 mediante ensayo de MTT. # Igualdad estadística significativa con respecto al control + ($p < 0,05$).

La proliferación celular puede mejorarse mediante distintos estímulos, principalmente el agregado de factores de crecimiento puede ayudar a mejorar la respuesta biológica sin comprometer la morfología de

las fibras ni sus propiedades, como se demostró en las secciones anteriores. En la figura 5.8., se mostró que las matrices porosas de PLLA sin PRGF también presentan valores de absorbancia por debajo del control, no obstante las matrices 10/1, 10/3 y 10/5 todos presentan valores estadísticamente iguales al control ($p < 0,05$). Esta tendencia observada es prometedora en cuanto a la mejora en la proliferación celular con el agregado de PRGF en las matrices de la capa interna. Por otro lado, el cultivo dinámico también ha mostrado mejorar la proliferación.

5.4. Conclusiones parciales

En este capítulo se estudió la biocompatibilidad de las matrices porosas electrohiladas así como también la influencia de estímulos topográficos, químicos y mecánicos en la proliferación celular. La topografía afectó el comportamiento celular, tal como se evidenció en la forma de las células sobre los substratos cultivados. Esto indica que el diseño topográfico de la matriz o injerto constituye una forma posible de obtener una orientación preferencial de las células en un tejido. Asimismo, el agregado de PRGF mejoró significativamente la proliferación celular, logrando una respuesta similar al control positivo a los 14 días para todas las matrices con PRGF. También se obtuvo una buena respuesta a los estímulos mecánicos. Se logró una excelente orientación en una dirección preferencial al cultivar las células sobre una matriz porosa electrohilada con orientación aleatoria en un biorreactor que aplica un esfuerzo cíclico. De esta manera, el estímulo mecánico resultó otra manera de obtener una orientación preferencial de las células.

Por último se analizó la biocompatibilidad de las matrices de las mezclas poliméricas correspondientes al injerto vascular bicapa. Se encontró que estas son biocompatibles logrando una proliferación de MSCs mayor al control para el caso de la capa externa. La capa interna, presenta valores menores de proliferación de MSCs. No obstante, teniendo en cuenta los estudios previos se propone el agregado de PRGF u otra molécula bioactiva

para mejorar la proliferación celular. En esta dirección, el grupo está estudiando diversas vías de modificación superficial de las matrices mediante la unión de heparina para mejorar la respuesta biológica de la capa interna. El agregado de PRGF en conjunto con la heparinización de la superficie llevará a la obtención de un injerto más bioactivo, que podría implantarse luego de un mínimo tiempo de cultivo *in vitro*.

5.5. Bibliografía

- Anitua E., 2001. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery, *Practical procedures & aesthetic dentistry*, 13: 487-493.
- Anitua E., Andia I., Sanchez M., Azofra J., Zalduendo M.M., de la Fuente M., 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture, *Journal of Orthopaedic Research*, 23: 281-286.
- Anitua E., Sanchez M., Orive G., 2010. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62: 741-752.
- Beachley V., Wen X., 2010. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions, *Progress in Polymer Science*, 35: 868-892.
- Bertonecelj V., Pelipenko J., Kristl J., Jeras M., Cukjati M., Kocbek P., 2014. Development and bioevaluation of nanofibers with blood-derived growth factors for dermal wound healing, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88: 64-74.
- Bir S.C., Esaki J., Marui A., Yamahara K., Tsubota H., Ikeda T., Sakata R., 2009. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse, *Journal of Vascular Surgery*, 50: 870-879.
- Dermenoudis S., Missirlis Y., 2010. Design of a novel rotating wall bioreactor for the in vitro simulation of the mechanical environment of the endothelial function, *Journal of Biomechanics*, 43: 1426-1431.

- Dermeoudis S., Missirlis Y.F., 2010b. Bioreactors in Tissue Engineering, *Advanced Engineering Materials*, 12: B592-B608.
- Díaz-Gómez L., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Silva M., Dominguez F., Sheikh F.A., Cantu T., Desai R., Garcia V.L., Macossay J., 2014. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation, *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 40: 180-188.
 - Duan Y., Wang Z., Yan W., Wang S., Zhang S., Jia J., 2007. Preparation of collagen-coated electrospun nanofibers by remote plasma treatment and their biological properties, *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 18: 1153-1164.
 - Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R., 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues, *Nature Nanotechnology*, 6: 13-22.
 - Fischer E.W., Sterzel H.J., Wegner G., 1973. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions, *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 251: 980-990.
 - Hahn M.S., Mchale M.K., Wang E., Schmedlen R.H., West J.L., 2007. Physiologic Pulsatile Flow Bioreactor Conditioning of Poly(ethylene glycol)-based Tissue Engineered Vascular Grafts, *Annals of Biomedical Engineering*, 35: 190-200.
 - Han J., Farah S., Domb A.J., Lelkes P.I., 2013. Electrospun Rapamycin-Eluting Polyurethane Fibers for Vascular Grafts, *Pharmaceutical Research*, 30: 1735-1748.
 - Horimizu M., Kawase T., Nakajima Y., Okuda K., Nagata M., Wolff L.F., Yoshie H., 2013. An improved freeze-dried PRP-coated biodegradable material suitable for connective tissue regenerative therapy, *Cryobiology*, 66: 223-232.
 - Jia L., Prabhakaran M.P., Qin X., Ramakrishna S., 2014. Guiding the orientation of smooth muscle cells on random and aligned

- polyurethane/collagen nanofibers, *Journal of Biomaterials Applications*, 29: 364-377.
- Kai D., Jin G., Prabhakaran M.P., Ramakrishna S., 2013. Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells, *Biotechnology Journal*, 8: 59-72.
 - Kenar H., Kose G.T., Hasirci V., 2010. Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 989-997.
 - Kenar H., Kose G.T., Toner M., Kaplan D.L., Hasirci V., 2011. A 3D aligned microfibrillar myocardial tissue construct cultured under transient perfusion, *Biomaterials*, 32: 5320-5329.
 - Lee H.-R., Park K.M., Joung Y.K., Park K.D., Do S.H., 2012. Platelet-rich plasma loaded in situ-formed hydrogel enhances hyaline cartilage regeneration by CB1 upregulation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100: 3099-3107.
 - Lu H., Vo J.M., Chin H.S., Lin J., Cozin M., Tsay R., Eisig S., Landesberg R.J., 2008. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86: 1128-1136.
 - Lubkowska A., Dolegowska B., Banfi G., 2012. Growth Factor Content in PRP and their applicability in medicine, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 26: 3S-22S.
 - Maul T.M., Hamilton D.W., Nieponice A., Soletti L., Vorp D.A., 2007. A New Experimental System for the Extended Application of Cyclic Hydrostatic Pressure to Cell Culture, *Journal of Biomechanical Engineering*, 129: 110-116.
 - Maul T.M., Chew D.W., Nieponice A., Vorp D.A., 2011. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 10: 939-53.
 - McClure M.J., Garg K., Simpson D.G., Ryan J.J., Sell S.A., Bowlin G.L., Ericksen J.J., 2013. The influence of platelet-rich plasma on myogenic

- differentiation, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, en prensa, doi: 10.1002/term.1755.
- Miyazu K., Kawahara D., Ohtake H., Watanabe G., Matsuda T., 2010. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at in situ capture of endothelial progenitor cell, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94B: 53-63.
 - Nivison-Smith L., Weiss A.S., 2012. Alignment of human vascular smooth muscle cells on parallel electrospun synthetic elastin fibers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A: 155-161.
 - Peng X., Recchia F.A., Byrne B.J., Wittstein I.S., Ziegelstein R.C., Kass D.A., 2000. In vitro system to study realistic pulsatile flow and stretch signaling in cultured vascular cells, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279: C797-C805.
 - Pitarresi G., Fiorica C., Palumbo F.S., Rigogliuso S., Gherzi G., Giammona G., 2014. Heparin functionalized polyaspartamide/polyester scaffold for potential blood vessel regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102: 1334-41.
 - Prodanov L., Riet J., Lamers E., Domanski M., Luttge R., van Loon J.J.W.A., Jansen J.A., Walboomers X.F., 2010. The interaction between nanoscale surface features and mechanical loading and its effect on osteoblast-like cells behavior, *Biomaterials*, 31: 7758-7765.
 - Rujitanaroj P.-O., Aid-Launais R., Chew S.Y., Visage C.L., 2014. Polysaccharide electrospun fibers with sulfated poly(fucose) promote endothelial cell migration and VEGF-mediated angiogenesis, *Biomaterials Science*, 2: 843-852.
 - Sankaran K.K., Vasanthan K.S., Krishnan U.M., Sethuraman S., 2014. Development and evaluation of axially aligned nanofibres for blood vessel tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8: 640-51.
 - Sell S. A., Wolfe P.S., Ericksen J.J., Simpson D.G., Bowlin G.L., 2011. Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Tissue Engineering Part A*, 17: 2723-2737.

- Shalumon K.T., Deepthi S., Anupama M.S., Nair S.V., Jayakumar R., Chennazhi K.P., 2015. Fabrication of poly (l-lactic acid)/gelatin composite tubular scaffolds for vascular tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1048-1055.
- Shang S., Yang F., Cheng X., Walboomers X.F., Jansen J.A., 2010. The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells, *European cells & materials*, 19: 180-192.
 - Simamora P., Chern W., 2006. Poly-L-lactic acid: an overview, *Journal of Drugs in Dermatology*, 5: 436-440.
 - Stevens M.M., George J.H., 2005. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface, *Science*, 310: 1135-1138.
 - Teixeira A.I., Abrams G.A., Bertics P.J., Murphy C.J., Nealey P.F., 2003. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, *Journal of Cell Science*, 15: 1881-1892.
 - Uttayarat P., Perets A., Li M., Pimton P., Stachelek S.J., Alferiev I., Composto R.J., Levy R.J., Lelkes P.I., 2010. Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, 6: 4229-4237.
 - Wang T., Ji X., Jin L., Feng Z., Wu J., Zheng J., Wang H., Xu Z.-W., Guo L., He N., 2013a. Fabrication and Characterization of Heparin-Grafted Poly(L-lactic acid)-Chitosan Core-Shell Nanofibers Scaffold for Vascular Gasket, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5: 3757-3763.
 - Wang S., Mo X.M., Jiang B.J., Gao C.J., Wang H.S., Zhuang Y.G., Qiu L.J., 2013b. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency, *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2131-2139.
 - Whited B.M., Rylander M.N., 2013. The Influence of Electrospun Scaffold Topography on Endothelial Cell Morphology, Alignment, and Adhesion in Response to Fluid Flow, *Biotechnology and Bioengineering*, 9999: 1-12.

- Whited B.M., Rylander M.N., 2014. The influence of electrospun scaffold topography on endothelial cell morphology, alignment, and adhesion in response to fluid flow, *Biotechnology and Bioengineering*, 111: 184-195.
- Wolfe P.S., Sell S.A, Ericksen J.J., Simpson D.G., Bowlin G.L., 2011. The Creation of Electrospun Nanofibers from Platelet Rich Plasma, *Journal of Tissue Science & Engineering*, 2: 107-114.
 - Wu H., Fan J., Chu C.-C., Wu J., 2010. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 3207-3215.
 - Ye L., Wu X., Duan H.-Y., Geng X., Chen B., Gu Y.-Q., Zhang A.-Y., Zhang J., Feng Z.-G., 2012. The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of heparin–poly(ϵ -caprolactone) conjugate for vascular tissue engineering scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A: 3251-3258.
 - Zhang H., Jia X., Han F., Zhao J., Zhao Y., Fan Y., Yuan X., 2013. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration, *Biomaterials*, 34: 2202-2212.

Capítulo 6

**Modelado del comportamiento mecánico de los
injertos vasculares bajo presión interna**

6.1. Introducción

Resulta necesario conocer las propiedades mecánicas de los tejidos vivos y sus reemplazos para comprender su comportamiento frente a solicitaciones mecánicas. Las ecuaciones constitutivas constituyen la mejor manera de representar estas propiedades. Sin embargo, los tejidos vivos no presentan ecuaciones constitutivas conocidas, situación que plantea uno de los principales desafíos de la biomecánica. Las ecuaciones constitutivas establecen la relación matemática entre la tensión aplicada y la deformación consiguiente. Conocer las ecuaciones constitutivas de los materiales, tanto biológicos como sintéticos, permite predecir la respuesta mecánica frente a diferentes solicitaciones mediante la simulación y modelado mecánico.

El modelado del comportamiento mecánico de tejidos vasculares surge como un instrumento importante tanto en el estudio de los mismos y su respuesta bajo condiciones normales (sanas) o patológicas. Este conocimiento tiene un especial potencial en el seguimiento de la progresión de las enfermedades así como en el diseño e implementación de substitutos sintéticos. El avance de la mecánica de medios continuos y los avances computacionales, han permitido el desarrollo de modelos constitutivos complejos capaces de simular el comportamiento de los tejidos vasculares, en particular, de las arterias biológicas (Malvern, 1969; Gurtin, 1981; Fung, 1993; Holzapfel, 2000; Holzapfel, 2006; Holzapfel, 2013).

Las propiedades de la pared arterial han sido estudiadas mediante diversos modelos constitutivos, entre los que se encuentran los modelos elásticos no-lineales o hiperelásticos (Langewouters, 1984; Holzapfel, 2000b; Horgan, 2003; Gasser, 2006; Bustamante, 2010; Kanyanta, 2010), viscoelásticos (Holenstein, 1980; Orosz, 1997; Holzapfel, 2002; Craiem, 2006; Zhang, 2007; Bia, 2007) y autoregresivos (Gamero, 2001; Gamero, 2002). Estos modelos representan correctamente la respuesta mecánica de la arteria en todo el intervalo de presiones, o al menos en una gran extensión. Sin embargo, en el intervalo fisiológico es usual linealizar la

relación tensión-deformación de las arterias, asumiendo que las deformaciones son pequeñas.

Si bien los injertos sintéticos para ingeniería de tejidos vasculares no poseen una estructura jerárquica compleja como las redes de colágeno y elastina presente en los tejidos naturales, la búsqueda de un comportamiento mecánico similar a los tejidos nativos es constante. Por lo tanto, los modelos estudiados para tejidos biológicos son de utilidad para el modelado de injertos sintéticos. Se ha modelado con mayor profundidad el comportamiento de la pared arterial, sin embargo, pocos trabajos han propuesto ecuaciones constitutivas para injertos sintéticos de arterias (Zidi, 2003; Courtney, 2006; Hollister, 2007; Yeoman, 2009). D.A. Vorp *et al.* desarrollaron un modelo sencillo para obtener la distribución de tensiones dentro de la pared arterial de un injerto vascular durante el proceso de degradación del mismo (Vorp 1995). Este modelo toma en cuenta una estructura cilíndrica tricapa, donde el injerto ocupa la capa del medio y las otras dos capas se componen por tejido en crecimiento. Si bien este modelo fue desarrollado para simular el proceso de bioabsorción de un injerto sintético degradable, también puede emplearse para modelar la tensión circunferencial dentro de la pared de un injerto tricapa y estudiar como las propiedades de cada capa afectan la tensión circunferencial del mismo, como lo hicieron McClure *et al.* (McClure, 2010). En otro trabajo, D.A. Vorp y su grupo, estudiaron el efecto de un recubrimiento microfibrilar a injertos vasculares en la tensión circunferencial de la pared (El-Kurdi 2008). Para este estudio se utilizó el mismo modelo desarrollado anteriormente pero adaptándolo para un sistema bicapa.

La estructura compleja de las arterias, conformadas con capas de distintos componentes, ya descrita en los capítulos 1 y 4, les confiere una respuesta mecánica propia, no-lineal, viscoelástica y con una componente inercial. Hay que tener en cuenta que los tres componentes principales de las arterias, elastina, fibras de colágeno y músculo liso, cambian su proporción relativa con la localización en sentido proximal-distal y con el diámetro de las arterias. Asimismo, el espesor de los vasos también varía

considerablemente con los parámetros mencionados y lo mismo ocurre con las formas de onda de presión y caudal. Por lo tanto, las propiedades mecánicas y geométricas de las arterias varían en porcentajes muy altos en las diferentes localizaciones del árbol arterial, cambiando además entre sujetos y con la edad. Estas condiciones marcan por un lado, la necesidad de adaptar en cada caso la composición y propiedades de los implantes substitutos; pero por otro lado, evidencian la imposibilidad de realizar ensayos que puedan abarcar todas las situaciones mencionadas. El modelado del comportamiento mecánico de injertos vasculares, permite ahorrar ensayos experimentales en laboratorio y predecir cómo las distintas variables (composición, dimensiones, etc.) afectan al comportamiento final de la matriz *in vivo*, y por lo tanto obtener un componente estructuralmente biomimético, minimizando los ensayos clínicos y los experimentos invasivos (Holzapfel, 2000b; McClure, 2010; Zahedmanesh, 2011). El empleo de modelos constitutivos para simular el comportamiento mecánico de injertos vasculares sintéticos en conjunto con modelos hemodinámicos que tengan en cuenta la interacción fluido-estructura, son una herramienta excelente para predecir la composición y dimensiones de las matrices ideales para ingeniería de tejidos.

Este capítulo propone el empleo de un modelado sencillo, adaptado del trabajo de D.A. Vorp y colaboradores, para obtener la tensión circunferencial de pared de los injertos bicapa en función de las propiedades de sus capas y poder predecir como este valor se afecta al modificar el tamaño del injerto (diámetro interno), el espesor de sus capas, las propiedades y la cantidad de las mismas.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

Se utilizaron los módulos elásticos calculados en el capítulo 4 para las matrices electrohiladas de PLLA, PHD y las dos mezclas de los mismos.

También se utilizaron las dimensiones de los injertos bicapa producidos tal como se describió en el capítulo 2.

6.2.2. Modelo y ecuaciones constitutivas

Las ecuaciones constitutivas desarrolladas por D.A. Vorp et al. (Vorp, 1995; El-Kurdi, 2008) se basan en los principios de las ecuaciones de Lamé. Se siguieron simplificaciones similares a las descritas previamente (Vorp, 1995; McClure, 2010), en donde se idealiza la geometría del injerto como dos/tres capas uniformes concéntricas, se asume que no hay deslizamiento o despegue entre las capas, y que se mantiene la compatibilidad de la deformación en la interfaz. También se supone que cada capa sufre sólo pequeñas deformaciones a la presión arterial media y que se encuentra bajo un estado de tensión plana. Por último se asume que cada material se comporta como incompresible, isotrópico, homogéneo y lineal elástico.

El esquema de la figura 6.1. presenta el modelo de la estructura tubular de tres capas. El injerto está sometido a una presión interna igual a la presión sanguínea intraluminal media (considerada 100 mmHg para todos los modelados) y una presión externa igual a cero. Debido a la diferencia en las propiedades mecánicas y la compatibilidad de los desplazamientos entre cada capa, se desarrolla una presión interfacial en la unión de cada par adyacente. Cada capa puede ser generalizada como un cilindro de pared gruesa sometido a presiones interna y externa. De acuerdo con el esquema de la figura 6.1., la capa interna está sometida a P_1 y P_2 , respectivamente, la capa central a P_2 y P_3 , y la externa a P_3 y P_0 . Análogamente, para el modelo de dos capas desaparece una interfaz y se obtiene solo una presión interfacial denominada P_2 en $r = b$. La presión externa, P_0 , ahora actúa en $r = c$.

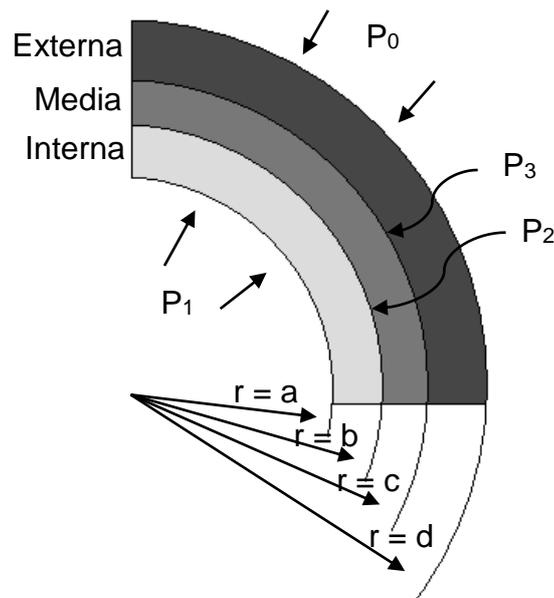


Figura 6.1. Esquema representativo del modelo de tres capas concéntricas.

La capa interna presenta un radio interno $r = a$ y está sometida a una presión interna P_1 . La unión de la capa interna y la media (en $r = b$) presenta una presión P_2 . La interface en la capa media y la externa en $r = c$, sufre una presión P_3 . La presión externa P_0 actúa en $r = d$.

Se utilizaron, entonces, dos modelos, uno de dos y otro de tres capas para predecir el valor de la tensión de pared circunferencial (CWS) de los mismos. La CWS, para cada radio (r), de las dos capas se calculó según:

$$CWS = \frac{r_1^2 P_1}{r_0^2} - \frac{r_0^2 P_0}{r_1^2} = \frac{P_1}{r_0^2} - \frac{P_0}{r_1^2} \quad \text{para } r_1 \leq r \leq r_0 \quad (6.1.)$$

donde r_1 es el radio interior de la capa analizada, r_0 el radio exterior, P_1 es la presión interna y P_0 la presión en externa para cada capa. Luego:

$$P_2 = \frac{a^2 P_1 \left[\frac{1}{b^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right] + \frac{b^2 P_0 \left[\frac{1}{a^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right]}{b^2 \left[\frac{1}{a^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right] - \frac{b^2 P_0 \left[\frac{1}{a^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right]}{a^2 \left[\frac{1}{b^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right]}}{b^2 \left[\frac{1}{a^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right] - \frac{b^2 P_0 \left[\frac{1}{a^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right]}{a^2 \left[\frac{1}{b^2} - \frac{\nu}{E_{EXT}} \right]}} \quad (6.2.)$$

donde E_{INT} , y E_{EXT} representan el módulo elástico de las capas interna y externa, respectivamente; ν representa el coeficiente de Poisson para las

capas interna y externa (considerado igual para ambas); a, b son el radio interno para las capas interna, externa; y c es el radio externo de la capa externa.

La CWS, para el modelo de tres capas también se calculó a partir de la ecuación 6.1. Las presiones de las interfaces se obtienen a partir de las siguientes ecuaciones:

$$P_2 - P_1 = \frac{2a^2b}{b^2 - a^2} E_{INT} \frac{d^2 - b^2}{d^2 - b^2} E_{MED} k_2 \quad (6.3.)$$

$$P_3 - P_1 = \frac{2a^2b}{b^2 - a^2} E_{INT} \frac{2d^2 - b^2}{d^2 - b^2} E_{MED} k_2 \quad (6.4.)$$

$$k_1 = \frac{b^3 - a^3}{b^2 - a^2} \frac{X_{INT}}{E_{INT}} \frac{b^3 - c^3}{b^2 - c^2} \frac{X_{MED}}{E_{MED}} \quad (6.5.)$$

$$k_2 = \frac{c^3 - b^3}{c^2 - b^2} \frac{X_{MED}}{E_{MED}} \frac{c^3 - d^3}{c^2 - d^2} \frac{X_{EXT}}{E_{EXT}} \quad (6.6.)$$

donde k_1 y k_2 son constantes; E_{INT} , E_{MED} y E_{EXT} representan el módulo elástico de las capas interna, media y externa, respectivamente; ν_{INT} , ν_{MED} y ν_{EXT} representan el coeficiente de Poisson para las capas interna, media y externa, respectivamente; a, b y c son el radio interno para las capas interna, media y externa; y d es el radio externo de las capa externa. Teniendo en cuenta que se asumió que cada material es incompresible y sufre solo deformaciones pequeñas, es apropiado tomar un coeficiente de Poisson $\nu_{INT} = \nu_{MED} = \nu_{EXT} = 0,5$.

6.3. Resultados

6.3.1. Análisis de la tensión circunferencial de pared con el modelo de dos capas

6.3.1.1. Corroboración del modelo de dos capas

Se modeló la CWS para el injerto bicapa de espesor #3 (Figura 6.2.) y se analizó si el valor obtenido estaba en el orden de la σ_m calculada en la sección 4.3.3.3. del capítulo 4 a partir de los ensayos de presión-diámetro en el biorreactor. Se obtuvo un valor entre 180-140 kPa, el cual coincide con el valor de σ_m ($181,54 \pm 13,43$) para el intervalo fisiológico de presiones (80-120 mmHg) obtenida anteriormente. Por lo tanto, se puede establecer que este modelo, si bien asume muchas simplificaciones, es una aproximación aceptable para estimar la CWS dentro de las diferentes capas del injerto y predecir como los posibles cambios del mismo (material y cantidad de las capas, espesor, y diámetro interno) pueden afectar la CWS resultante.

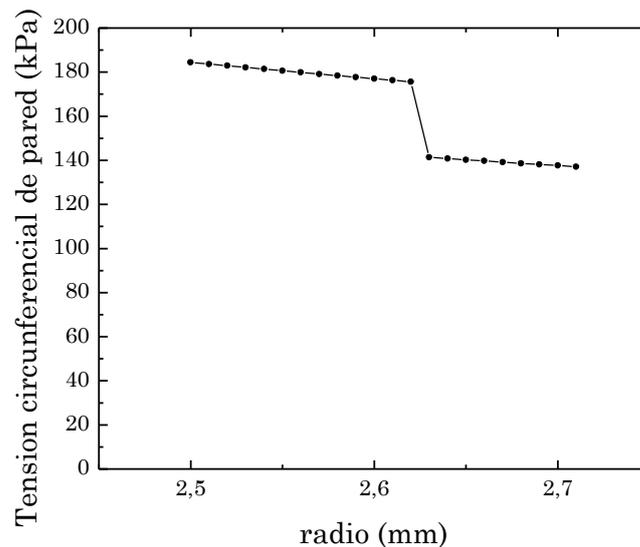


Figura 6.2. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3.

6.3.1.2. Estudio de la variación del módulo elástico de las capas individuales del injerto en el comportamiento final del mismo

Se estudió como modificar el injerto para obtener valores de CWS más cercanos a los de arterias coronarias naturales, mediante la variación de los materiales de las capas, teniendo en cuenta que los valores de tensión circunferencial de pared media reportados en la literatura para arterias naturales se encuentran alrededor de 30-40 kPa (Claes, 2010; McClure, 2010). Además, una menor tensión circunferencial de pared media está asociada a un injerto con mayor distensibilidad y menor rigidez.

Se modeló el comportamiento del injerto bicapa con la capa externa fija y se cambió la composición de la capa interna con los tres materiales o mezclas caracterizados en el capítulo 4 (interna, PHD y PLLA). Se observó que a mayor diferencia entre los módulos de las capas, mayor es la diferencia entre la CWS dentro de cada capa (Figura 6.3. a). Al disminuir el valor del módulo de la capa interna, se obtuvieron valores de la CWS en el orden de las arterias naturales en la capa interna, sin embargo en la capa externa la CWS aumentó a más del doble que en el injerto original.

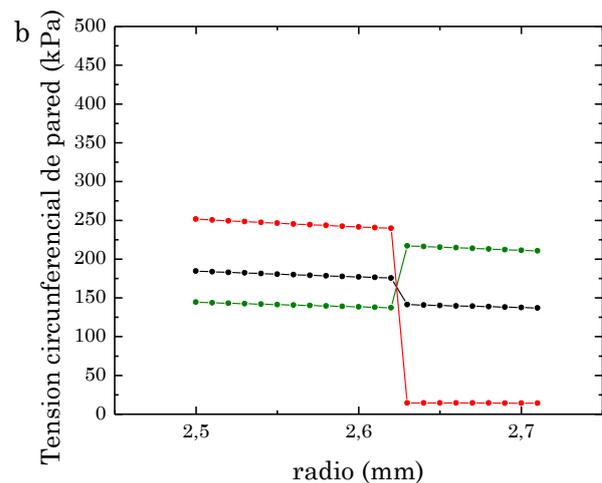
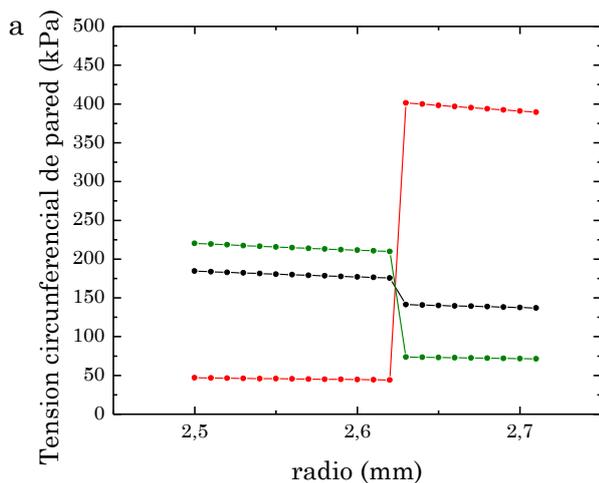
Posteriormente, se estudió el efecto de variar las propiedades de la capa externa, en este caso por las de la capa externa, PHD y PLLA (Figura 6.3. b), manteniendo la capa interna fija. En este caso se obtuvo un efecto similar al observado en la figura 6.3. a, pero en la capa externa, aunque con valores menores de CWS para el caso de mayor diferencia entre los módulos de las capas modelados.

Se analizó como la presencia del PHD en la capa interna (Figura 6.3. c) y externa (Figura 6.3. d) afecta la CWS en ambas capas, dado que la presencia de la capa de PHD resultó en valores de CWS en el orden de los observados en las arterias naturales. No se observaron grandes cambios en la CWS resultantes al mantener la capa interna o externa de PHD, ya que los módulos de las capas interna, externa y PLLA no son tan distintos entre sí (6,30 MPa, 7,34 MPa y 14.43 MPa respectivamente) y por lo tanto la diferencia entre los módulos es grande en todos los casos. Nuevamente, a

pesar de obtener valores bajos de CWS para la capa de PHD, las otras capas presentan valores de un orden mayor para cualquiera de los materiales utilizados.

Además, se modeló el uso de PLLA en la capa interna (Figura 6.3. e) y externa (Figura 6.3. f). De estos modelados, los valores de CWS más atractivos resultaron para el injerto que emplea PLLA en el interior y la capa interna en el exterior, donde se logra un valor de CWS por encima de los 200 kPa en el interior y alrededor de 70 kPa en el exterior. Sin embargo, en las arterias naturales el componente más rígido (colágeno) se encuentra en el exterior, por lo que se considera que este injerto no tendrá una respuesta mecánica biomimética. El resto de las combinaciones genera o una gran diferencia entre los CWS de cada capa o valores elevados para ambas.

La modificación de la composición de las capas no predijo un injerto alternativo con valores de CWS más próximos a las arterias naturales que el injerto bicapa desarrollado y caracterizado en los capítulos anteriores. En las secciones siguientes se modelan otro tipo de modificaciones para mejorar la respuesta mecánica del injerto.



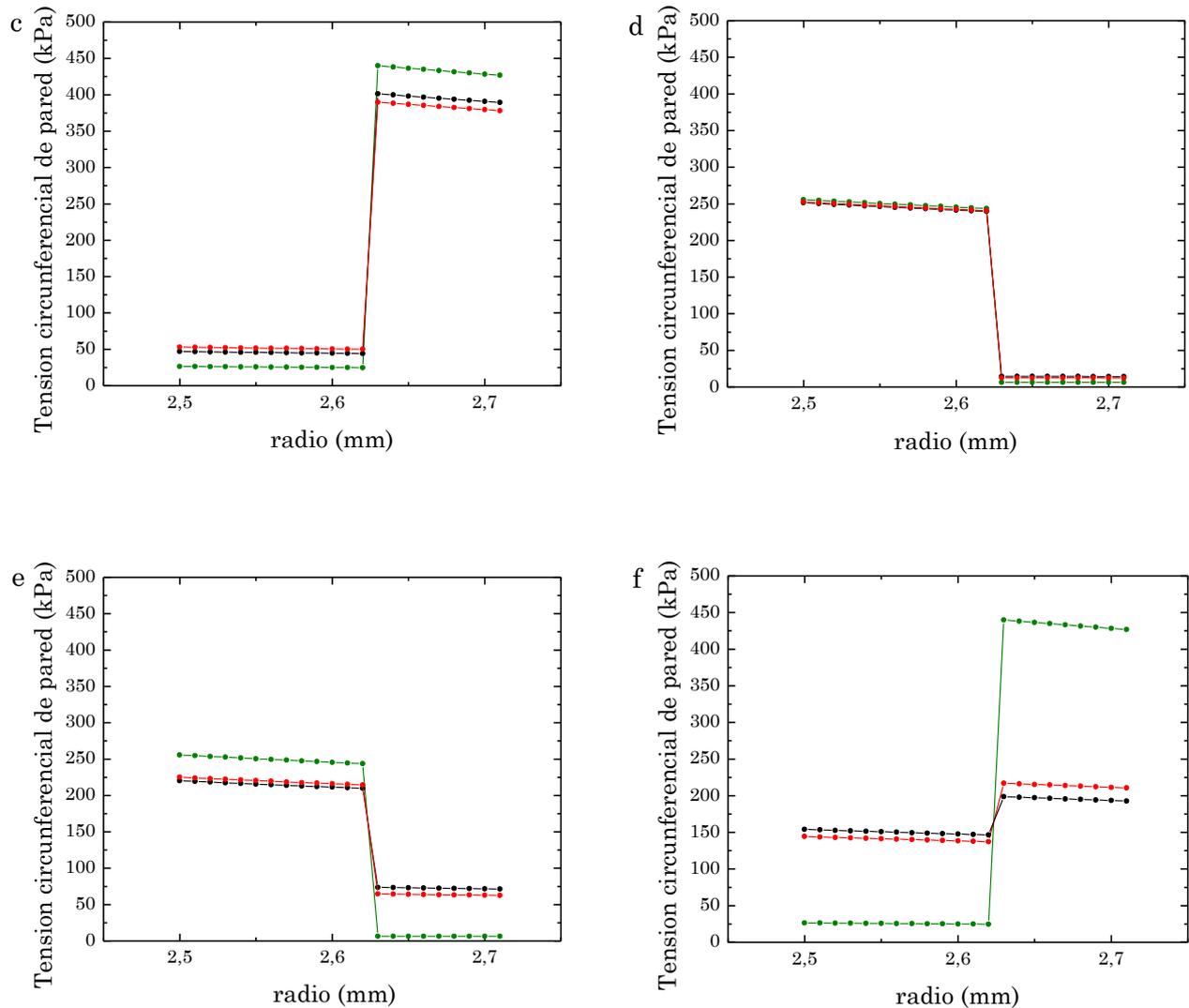


Figura 6.3. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con: a) la capa interna variante (interna: negro, PLLA: verde, PHD: rojo); b) la capa externa variante (externa: negro, PLLA: verde y PHD: rojo); c) la capa interna de PHD y la externa variante (externa: negro, PLLA: verde y interna: rojo); d) la capa externa de PHD y la interna variante (interna: negro, PLLA: verde y interna: rojo); e) la capa interna de PLLA y la externa variante (externa: negro, PHD: verde y interna: rojo); f) la capa externa de PLLA y la interna variante (externa: negro, PHD: verde y interna: rojo).

6.3.1.3. Estudio de la variación del espesor de las capas individuales del injerto en el comportamiento final del mismo

Considerando que en la práctica, los injertos vasculares presentaron una respuesta con mayor distensibilidad a mayor espesor se decidió estudiar el efecto de variar el espesor de las capas en el valor de CWS obtenido. Se mantuvieron las propiedades del injerto bicapa con las mezclas interna y externa, y se modificó el espesor.

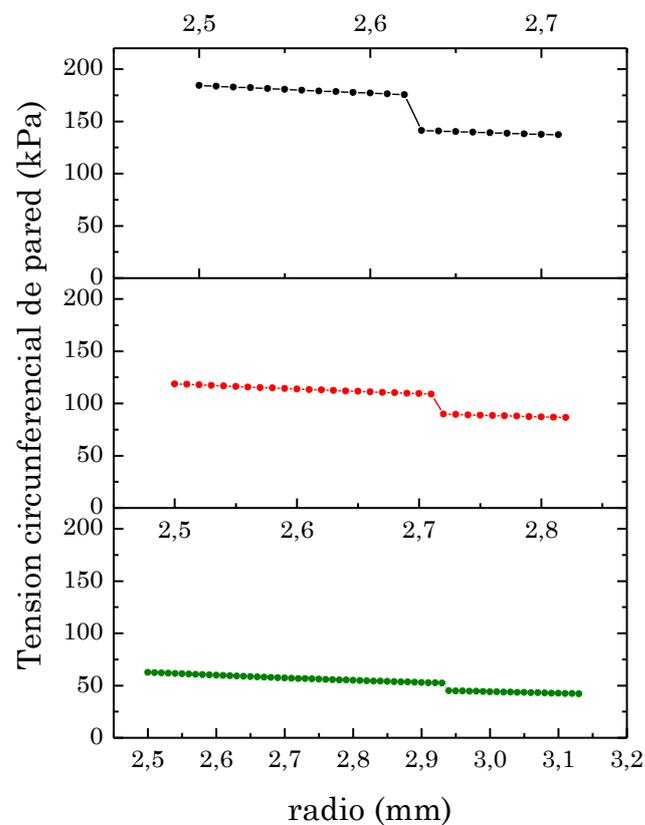


Figura 6.4. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con espesor original (negro), espesor un 50% superior (rojo) y el doble de espesor (verde).

La figura 6.4. presenta los resultados del modelado. Se observa que el aumento del espesor conduce a una disminución del valor de CWS hacia valores cercanos a las arterias naturales. La diferencia de CWS entre las capas también se reduce. Se evidencia también que un injerto de mayor espesor presenta una mayor distensibilidad en su respuesta, lo cual

concuenda con lo observado en los ensayos de presión-diámetro en la sección 4.3.3.2. del capítulo 4.

6.3.1.4. Estudio de la variación del diámetro interno del injerto en el comportamiento final del mismo

Algunas arterias coronarias presentan diámetro menores a 5 mm, a pesar de esto, se fijó el tamaño de los injertos desarrollados en esta tesis en dicho valor para facilitar la caracterización mecánica de los mismos debido a la resolución de los sensores utilizados. Se modeló la respuesta de injertos con igual composición y espesor a los desarrollados pero con menor diámetro, para estudiar cómo será su comportamiento mecánico y si dichos injertos tendrán también una respuesta biomimética.

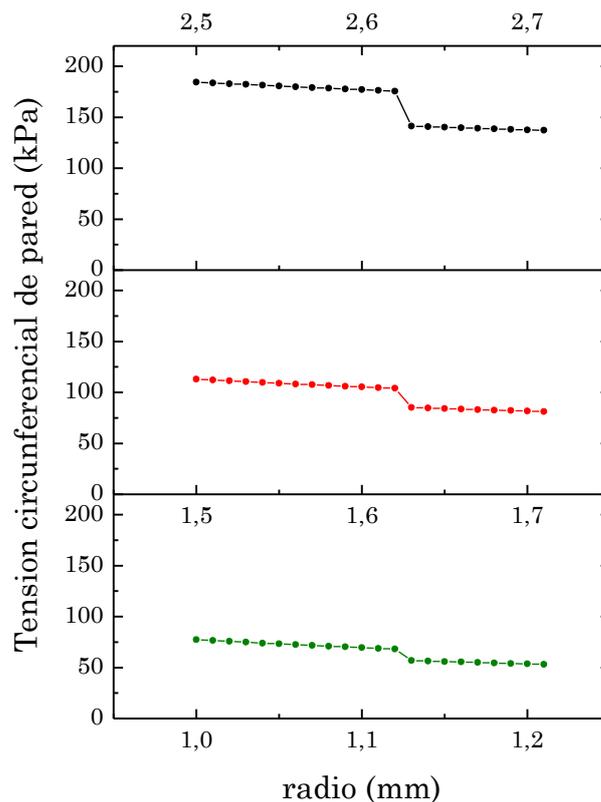


Figura 6.5. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con 5 mm (original) (negro), 3 mm (rojo) y 2 mm de diámetro interno (verde).

Se observó un efecto similar al aumento del espesor de pared cuando se disminuye el tamaño del injerto (Figura 6.5). Es decir, disminuye la CWS y la diferencia de la misma entre las capas. Este resultado es alentador ya que indica que la composición elegida para los injertos desarrollados pero en injertos de menor diámetro aún resultaría en injertos menos rígidos y con mayor distensibilidad.

Luego, dada la disminución del valor de CWS con el aumento del espesor de pared y la disminución del diámetro del injerto, se modeló la respuesta de un injerto de 2 mm de diámetro interno y el doble de espesor (Figura 6.6.)

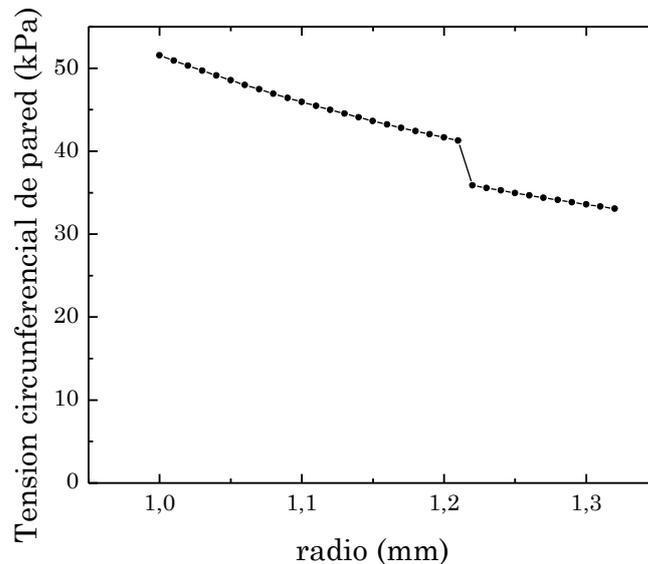


Figura 6.6. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para el injerto bicapa de espesor #3 con 2 mm de diámetro interno y el doble de espesor.

La figura 6.6 muestra como al modificar el espesor y el diámetro en simultáneo resulta en valores de CWS en el orden de las arterias naturales. Sin embargo, se obtiene un valor de CWS superior para la capa interna en relación a la externa, aunque estos son muy próximos entre sí.

6.3.2. Análisis de la tensión circunferencial de pared con el modelo de tres capas

Por último, se modeló el agregado de una tercera capa al injerto vascular. Si bien está estudiado que sólo la capa media y la adventitia son las responsables de la respuesta mecánica de las arterias (Holzapfel, 2000b), la tendencia actual se dirige hacia el desarrollo de injertos tricapa. Una tercera capa puede mejorar el efecto observado en la sección 6.3.1. donde el valor de CWS cambia abruptamente entre cada capa.

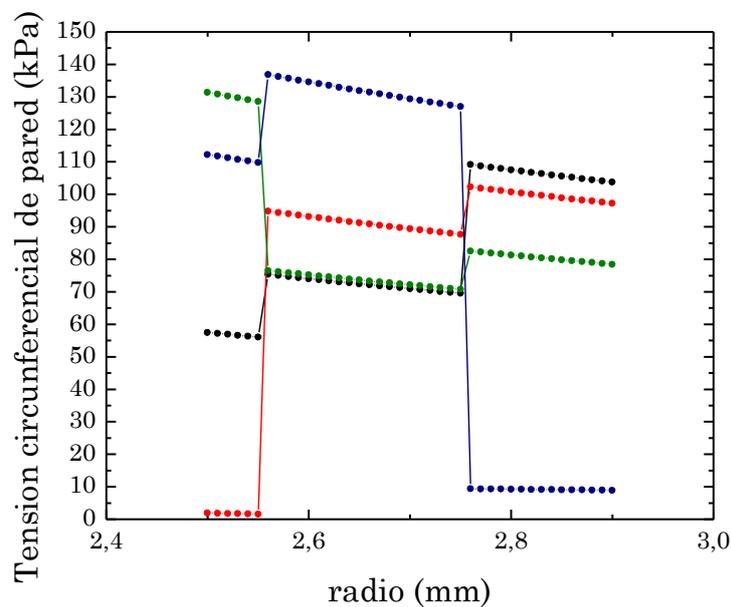


Figura 6.7. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para un injerto tricapa con la capa externa de la mezcla externa, la capa media de la mezcla interna y la capa interna de PLLA (verde) y PHD (rojo), y capa externa de PLLA (negro) y PHD (azul), capa media de mezcla externa y capa interna de mezcla interna.

La figura 6.7. presenta los resultados del modelado para el agregado de una tercera capa externa o interna al injerto bicapa desarrollado en esta tesis, fijando un diámetro interno de 5 mm y 0,45 mm de espesor. Se utilizó un mayor espesor en base a los resultados observados en la sección 6.3.1.3. y se estudió el efecto una la tercera capa de PLLA o PHD, ya que ambos

materiales fueron caracterizados en el capítulo 4. Esto permite en un trabajo futuro, el estudio experimental del comportamiento mecánico. El PHD, tanto como capa externa o interna, condujo a un aumento en la CWS de las otras dos capas. A su vez, los valores de CWS entre las distintas capas presentaron valores de diferentes órdenes de magnitud. En cuanto al PLLA, se observó un mejor comportamiento cuando se utiliza como capa externa. En esta configuración, se logró obtener un valor de CWS para las capas interna y media cercano a las arterias naturales y sin cambios abruptos entre cada capa.

Nuevamente se modeló un injerto con menor diámetro interno para predecir la respuesta de reemplazos para arterias más pequeñas. En este caso se empleó un injerto tricapa con PLLA en la capa externa, mezcla externa en la capa media y mezcla interna en la capa interna, de 2 mm de diámetro interno y 0,45 mm de espesor.

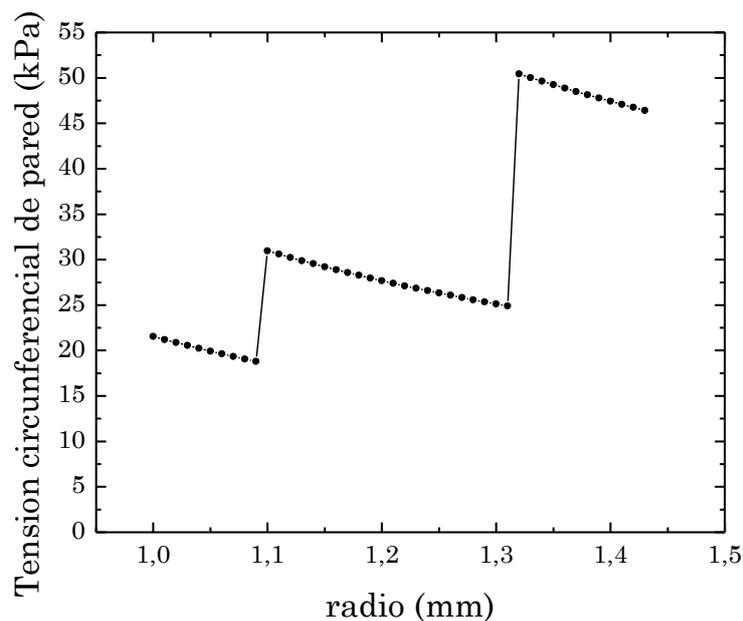


Figura 6.8. CWS obtenido mediante el modelado mecánico para un injerto tricapa de 2 mm de diámetro interno y 0,45 mm de espesor, con capa externa de PLLA, capa media de mezcla externa y capa interna de mezcla interna.

El valor de CWS obtenido se encuentra en el orden de los observados para arterias naturales (Figura 6.8). Más aún, la CWS es mayor en el exterior y menor en el interior como se observa para la aplicación de este mismo modelo a arterias coronarias naturales (McClure, 2010). Se considera entonces que el agregado de una tercera capa es fundamental para obtener un comportamiento mecánico más biomimético.

6.4. Conclusiones parciales

Este capítulo presenta la aplicación de un modelo simple para predecir la tensión circunferencial de pared al modificar la composición, espesor y diámetro interno del injerto bicapa, así como también al agregar una tercera capa al mismo. El modelo fue validado con resultados experimentales de los injertos bicapa y se obtuvo una buena representación a pesar de las simplificaciones tomadas. Se logró estudiar el efecto de las variables mencionadas y se encontró que el agregado de una tercera capa externa más rígida, en conjunto con el incremento del espesor de pared resulta en un injerto con mayor distensibilidad. Por otro lado, el desarrollo de un injerto de menor diámetro para reemplazo de arterias coronarias de menor tamaño, también presenta valores de CWS dentro del orden biomimético.

Este capítulo es una primera aproximación al estudio de modelos más complejos, los cuales serán desarrollados durante los estudios postdoctorales.

6.5. Bibliografía

- Bia D., Zócalo Y., Armentano R.L., de Forteza E., Cabrera-Fischer E., 2007. Acute increase in reversal blood flow during counterpulsation is associated with vasoconstriction and changes in the aortic mechanics. Conference Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2007:3986-3989.

- Bustamante R., Holzapfel G.A., 2010. Methods to compute 3D residual stress distributions in hyperelastic tubes with application to arterial walls, *International Journal of Engineering Science*, 48: 1066-1082.
- Claes E., 2010. Estudio mecánico de las arterias coronarias humanas y sus sustitutos vasculares, Tesis doctoral, Escuela técnica superior de ingenieros de caminos, canales y puertos, Universidad Politécnica de Madrid.
 - Courtney T., Sacks M.S., Stankus J., Guan J., Wagner W.R., 2006. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy, *Biomaterials*, 27: 3631-3638.
 - Craiem D.O., Armentano R.L., 2006. Arterial viscoelasticity: a fractional derivative model. *Conference Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1: 1098-1101.
 - El-Kurdi M.S., Hong Y., Stankus J.J., Soletti L., Wagner W.R., Vorp D.A., 2008. Transient elastic support for vein grafts using a constricting microfibrillar polymer wrap, *Biomaterials*, 29: 3213-3220.
 - Fung Y.C., 1993. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. 2nd ed., Springer, Heidelberg.
 - Gamero L.G., Armentano R.L., Barra J.G., Simon A., Levenson J., 2001. Identification of arterial wall dynamics in conscious dogs. *Experimental Physiology*, 86: 519-528.
 - Gamero L.G., Armentano R.L., Levenson J., 2002. Arterial wall diameters and viscoelastic variability. *Computing in Cardiology*, 29: 513-516.
 - Gasser T.C., Ogden R.W., Holzapfel G.A., 2006. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations, *Journal of the Royal Society Interface*, 3: 15-35.
 - Gurtin M.E., 1981. *An Introduction to Continuum Mechanics*, Academic Press, London, Oxford, Boston, New York, San Diego.

- Holenstein R., Niederer P., Anliker M., 1980. A viscoelastic model for use in predicting arterial pulse waves. *Journal of Biomechanical Engineering*, 102: 318-325.
- Hollister S.J., Lin C.Y., 2007. Computational design of tissue engineering scaffolds. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 196: 2991-2998.
 - Holzapfel G.A., 2000. *Nonlinear Solid Mechanics-A Continuum Approach for Engineering*, Wiley, Hoboken.
 - Holzapfel G.A., Gasser T.C., Ogden R.W., 2000b. A New Constitutive Framework for Arterial Wall Mechanics and a Comparative Study of Material Models. *Journal of Elasticity*, 61: 1-48.
 - Holzapfel G.A., Gasser T.C., Stadler M., 2002. A structural model for the viscoelastic behavior of arterial walls: continuum formulation and finite element simulation, *European Journal of Mechanics A/Solids*, 21: 441-463.
 - Holzapfel G.A., Ogden R.W., 2006, (Editors). *Mechanics of Biological Tissue*. Springer, Heidelberg.
 - Holzapfel G.A., Kuhl E., 2013, (Editors). *Computer Models in Biomechanics: From Nano to Macro*. Springer, Heidelberg.
 - Horgan C.O., Saccomandi G., 2003. A Description of Arterial Wall Mechanics Using Limiting Chain Extensibility Constitutive Models, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 1: 251-266.
 - Kanyanta V., Ivankovic A., 2010. Mechanical characterization of polyurethane elastomer for biomedical applications, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 3: 51-62.
 - Langewouters G., Wesseling K., Goedhard W., 1984. The static elastic properties of 45 human thoracic and 20 abdominal aortas in vitro and the parameters of a new model. *Journal of Biomechanics*, 17: 425-435.
 - Malvern L.E., 1969. *Introduction to the Mechanics of a Continuous Medium*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
 - McClure M.J., Sell S.A., Simpson D.G., Walpoth B.H., Bowlin G.L., 2010. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial

architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study, *Acta Biomaterialia* 6: 2422-2433.

- Orosz M., Molnarka G., Monos E., 1997. Curve fitting methods and mechanical models for identification of viscoelastic parameters of vascular wall. A comparative study. *Medical Science Monitor*, 3: 599-604.
- Vorp D.A., Raghavan M.L., Borovetz H.S., Greisler H.P., Webster M.W., 1995. Modeling the transmural stress distribution during healing of bioresorbable vascular prostheses, *Annals of Biomedical Engineering*, 23:178-188.
- Yeoman M.S., Reddy B.D., Bowles H., Zilla P., Bezuidenhout D., Franz T., 2009. The use of finite element methods and genetic algorithms in search of an optimal fabric reinforced porous graft system. *Annals of Biomedical Engineering*, 37: 2266-2287.
- Zahedmanesh H., Mackle J.N., Sellborn A., Drotz K., Bodin A., Gatenholm P., Lally C., 2011. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development, *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B: 105-113.
- Zhang W., Chen H., Kassab G.S., 2007. A rate-insensitive linear viscoelastic model for soft tissues. *Biomaterials*, 28: 3579-3586.
- Zidi M., Cheref M., 2003. Mechanical analysis of a prototype of small diameter vascular prosthesis: numerical simulations, *Computers in Biology and Medicine*, 33: 65-75.

Capítulo 7

Conclusiones finales y Trabajos futuros

7.1. Conclusiones finales

En el desarrollo de esta tesis se exploró en profundidad la técnica de electrohilado de soluciones poliméricas para la producción de matrices porosas como matriz extracelular temporaria artificial para ingeniería de tejidos vasculares. Se obtuvo un injerto vascular bicapa nanofibroso mediante el electrohilado secuencial de soluciones de mezclas poliméricas. Se disminuyó la cristalinidad e incrementó la hidrofiliidad de los injertos nanofibrosos mediante la mezclas de poli(L-ácido láctico) (PLLA) y poli(éster uretano) segmentado (PHD).

Se estudió la degradación hidrolítica de los injertos de PLLA, PHD y las capas interna y externa. Se obtuvo una disminución en el peso molecular entre un 60-90% luego de 34 semanas de degradación. La degradación de las mezclas fue más acelerada obteniendo para éstas un tiempo de degradación en el cual se mantiene la integridad del injerto que concuerda con el tiempo de regeneración del tejido *in vitro*.

El comportamiento mecánico del PLLA y PHD, tanto en tracción como en presión-diámetro, corroboró la hipótesis planteada. Se encontró que el PLLA se comporta mecánicamente como el colágeno, mientras que el PHD presenta una respuesta más elástica como la elastina. Los injertos bicapa enfatizaron aún más estos resultados, donde la contribución de cada polímero al injerto, en conjunto con las cualidades de tener un material nanofibroso, en capas, y con separación entre estas, resultaron en un comportamiento mecánico tipo “J” de características biomiméticas cuando estos son sometidos a presiones internas. Los valores medidos de *compliance* resultaron en el orden de los encontrados en arterias coronarias humanas y en los vasos sanguíneos utilizados para reemplazo de las mismas. Los injertos presentaron resistencia a la sutura y presiones de reventado también en el orden de arterias y venas humanas. Además, las propiedades observadas son superiores a las que muestran los injertos sintéticos comerciales (Dacron® y ePTFE) actualmente utilizados.

Las matrices de las mezclas poliméricas correspondientes al injerto vascular bicapa resultaron biocompatibles logrando una mayor proliferación de células madre mesenquimales que el control para el caso de la capa externa. La capa interna, presentó menor proliferación. Sin embargo, la respuesta a estímulos topográficos, químicos y mecánicos estudiada en PLLA presentó formas de mejorar dicho comportamiento.

Se utilizó un modelo matemático simple para predecir como modificar la composición, espesor y diámetro interno del injerto bicapa, o el agregar una tercera capa al mismo afecta la tensión circunferencial de pared del injerto, la cual está relacionada con la distensibilidad del mismo. Se encontró que con el agregado de una tercera capa externa más rígida, en conjunto con el incremento del espesor de pared, el injerto presenta una mayor distensibilidad. Por otro lado, el desarrollo de un injerto de menor diámetro, para reemplazo de arterias coronarias menores, también presentó valores de CWS dentro del intervalo biomimético.

En general, las estructuras tubulares bicapa preparadas presentaron:

- un comportamiento mecánico que imita la respuesta frente a regímenes de presión pulsátil de arterias coronarias y los vasos sanguíneos utilizados para su reemplazo,
- una velocidad de degradación hidrolítica equivalente para sus dos capas y con un tiempo de degradación que concuerda con el tiempo de regeneración del tejido *in vitro*
- una biocompatibilidad aceptable, demostrada por la proliferación de células madre mesenquimales, con valores superiores al control positivo para la capa externa.

Todas estas cualidades son altamente deseadas para el diseño de una matriz polimérica para ingeniería de tejidos vasculares. Por lo tanto, los injertos bicapa electrohilados de PLLA/PHD resultan estructuras con un alto interés para la ingeniería de tejidos como injertos vasculares degradables de pequeño diámetro para reemplazo de arterias coronarias. Los resultados obtenidos son muy alentadores para el desarrollo de próximos estudios *in vivo*.

7.2. Trabajo futuro

Para mejorar el comportamiento biomimético de los injertos vasculares se proponen diferentes estudios adicionales.

En un primer análisis, se propone el estudio de la variación de las propiedades mecánicas del injerto en función del tiempo de degradación, para cuantificar el tiempo al cual la integridad del injerto disminuye considerablemente.

Para mejorar la biocompatibilidad y evitar la formación de trombos en el interior del injerto, se propone la modificación superficial del injerto mediante la incorporación de biomoléculas. En esta dirección, el grupo está estudiando diversas vías de modificación superficial de las matrices mediante la unión de heparina, polisacárido con propiedades anticoagulantes, para mejorar la respuesta frente a la formación de trombos de la capa interna. Por otro lado el agregado de factor de crecimiento de plasma rico en plaquetas (PRGF) dentro de las fibras incrementará la adhesión y proliferación celular como se observó para el caso del PLLA. De esta forma se obtendrá un injerto más bioactivo, que podría implantarse luego de un mínimo tiempo de cultivo *in vitro*, o inmediatamente como lo requieren las afecciones coronarias.

En conjunto con el Grupo de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Favaloro dirigido por el Dr. Ricardo Armentano Feijoo se prevé la realización de estudios *in vivo* en modelo animal de ovejas en el bioterio de la Universidad Favaloro, evaluando el comportamiento de los mejores injertos vasculares.

Se propone la obtención de injertos tricapa, con mayor espesor y menor diámetro, teniendo en cuenta los resultados del capítulo 6. Se propone también su caracterización mecánica para comprobar los resultados simulados.

Dentro de los estudios postdoctorales se estudiarán modelos constitutivos más complejos, para predecir el comportamiento del injerto en

todo el intervalo de presiones. Se realizarán estudios mediante modelos de interacción fluido-estructura para injertos vasculares. Se modelará el comportamiento de las matrices dentro del sistema circulatorio a través de acople de modelos 0D-1D-3D y se optimizarán los injertos biomiméticos a partir de la resolución de un problema inverso mediante la predicción de los parámetros constitutivos óptimos, y por lo tanto la composición y dimensiones de las matrices ideales para los mismos.

Capítulo 8

Publicaciones científicas

Los resultados relacionados con distintos aspectos de esta tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

8.1. Publicaciones científicas en revistas internacionales

1. Díaz-Gómez L., **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., 2015. *Random and aligned PLLA:PRGF electrospun scaffolds for tissue engineering*. Journal of Applied Polymer Science, ISSN: 1097-4628, 132(5): 41372.
2. Suarez Bagnasco D., **Montini Ballarin F.**, Cymberknop L.J., Balay G., Negreira C., Abraham G.A., Armentano R.L., 2014. *Elasticity assessment of electrospun nanofibrous vascular grafts: a comparison with femoral ovine arteries*. Materials Science and Engineering Part C, ISSN: 0928-4931, 45: 446–454.
3. **Montini Ballarin F.**, Caracciolo P.C., Blotta E., Ballarin V.L., Abraham G.A., 2014. *Optimization of poly(L-lactic acid)/segmented polyurethane electrospinning process for the production of bilayered small-diameter nanofibrous tubular structures*. Materials Science and Engineering Part C, ISSN: 0928-4931, 42: 489–499.
4. **Montini Ballarin F.**, Blackledge T.A., Capitos Davis N.L., Frontini P.M., Abraham G.A., Wong S-C., 2013. *Effect of Topology on the Adhesive Forces between Electrospun Polymer Fibers Studied using a T-peel Test*. Polymer Engineering & Science, ISSN: 1548-2634, 53: 2219-2227.
5. Caracciolo P.C., Cortez Tornello P.R., **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., 2013. *Development of electrospun nanofibers for biomedical applications: State of the art in Latin America*. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, ISSN: 2157-9083, 3: 39-60.
6. Gonzalez M.A., **Montini Ballarin F.**, Brun M., Abraham G.A., Ballarin V.L., 2012. *Morphological Quantification of Polymer Nanofibers in*

Tissue Engineering Images. Latin American Applied Research (LAAR), ISSN 0327-0793, 42(1): 89-95.

En preparación:

7. **Montini Ballarin F.**, Caracciolo P.C., Rivero G., Abraham G.A., *In vitro degradation behaviour of electrospun poly(L-lactic acid)/segmented polyurethane blends*.
8. **Montini Ballarin F.**, Calvo D., Caracciolo P.C., Rojo F., Frontini P.M., Abraham G.A., Guinea-Totuelo G., *Mechanical behaviour of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts*.
9. **Montini Ballarin F.**, Suarez Bagnasco D., Cymberknop L.J., Balay G., Caracciolo P.C., Negreira C., Armentano R.L., Abraham G.A., *Elasticity response of electrospun biodegradable polymeric vascular grafts: towards a biomimetic mechanical response*.

8.2. Capítulos de libros

1. **Montini Ballarin F.**, Cortez Tornello P.R., Abraham G.A., *Nanofibras electrohiladas para usos terapéuticos. Módulo II: Tecnologías aplicadas al diseño y producción de sistemas terapéuticos*, en: Biomateriales Aplicados al Diseño de Sistemas Terapéuticos Avanzados (Souza H., Braga M., Sosnik A., Editores). Coimbra University Press. Press version ISBN: 978-989-26-0880-8, Digital version ISBN: 978-989-26-0881-5. En prensa 2015.
2. Cortez Tornello P.R., **Montini Ballarin F.**, Caracciolo P.C., Abraham G.A., *Micro/nanofiber-based structures for soft tissue engineering applications: potential and current challenges*, in: Volume V: NanoBioMaterials in Soft Tissue Engineering, in: Applications of NanoBioMaterials (I-XI) Multi-Volume Set (Grumezescu A.M., Editor). Elsevier. Aceptado 2015.

En preparación:

3. **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Caracciolo P.C., *Mechanical properties of polyurethane-based small-diameter vascular grafts*, in: *Advances in Polyurethane Biomaterials* (Cooper S.L., Guan J., Editors). Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier.

8.3. Publicaciones en revistas de divulgación científica

1. Caracciolo P.C., Cortez Tornello P.R., Buffa F., **Montini Ballarin F.**, Cuadrado T.R., Abraham G.A., 2011. *Pequeñas fibras, grandes aplicaciones*. *Ciencia Hoy*, ISSN: 0327-1218, 21(121): 57-64.

8.4. Participación en congresos nacionales e internacionales

8.4.1. Congresos internacionales

1. Suarez-Bagnasco D., Cymberknop L.J., **Montini Ballarin F.**, Balay G., Negreira C.A., Abraham G., Armentano R.L., *An in vitro set up for the assessment of electrospun nanofibrous vascular grafts*, VI Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica (CLAIB), Paraná, Argentina. 29 – 31 de Octubre de 2014.
2. Armentano R.L., Cymberknop L.J., Suarez Bagnasco D., **Montini Ballarin F.**, Balay G., Negreira C.A., Abraham G.A., 2014. *Similarities of arterial collagen pressure-diameter relationship in ovine femoral arteries and PLLA vascular grafts*, 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS). 26 – 30 de Agosto, 2014. Chicago, United States. Publicado en *Conference Proceedings IEEE Engineering in Medicine Biology Society*, 2014: 2302-2305, 2014. doi: 10.1109/EMBC.2014.6944080.
3. **Montini Ballarin F.**, Suarez Bagnasco D., Cymberknop L.J., Caracciolo P.C., Balay G., Negreira C., Armentano R.L., Abraham G.A., *Mechanical*

- characterization of nanofibrous small-diameter vascular grafts*, 8vo Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, COLAOB, Rosario, Argentina. 20 - 23 Agosto de 2014.
4. **Montini Ballarin F.**, Caracciolo P.C., Frontini P.M., Abraham G.A., *Development of biodegradable polyurethane electrospun small-diameter vascular grafts*, 3º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, OBI, Viña del Mar, Chile. 26 - 28 Septiembre de 2013.
 5. **Montini Ballarin F.**, Cymberknop L.J., Armentano R.L., Frontini P.M., Abraham G.A., *In vitro Elastic Response of Aligned Electrospun Vascular Grafts*, 25th European Conference on Biomaterials, Madrid, España. 8 - 12 Septiembre de 2013.
 6. Diaz-Gomez L.A., **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., *Random and Aligned Platelet-Rich Plasma (PRP)-poly-(l-lactic acid) (PLLA) electrospun fibers as scaffolds for tissue engineering*, 25th European Conference on Biomaterials, Madrid, España. 8 - 12 Septiembre de 2013.
 7. Armentano R.L., Cymberknop L., Montini Ballarin F., Balay G., Suarez D., Negreira C., Abraham G.A., *A Novel Approach for Assessment of the Mechanical Properties of Synthetic Arterial grafts*, 19th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2013), Patras, Grecia. 25 - 28 Agosto de 2013.
 8. **Montini Ballarin F.**, Frontini P.M., Abraham G.A., *Aligned small-diameter vascular grafts via electrospinning*, 13er Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Materiales SAM – CONAMET, Puerto Iguazú, Argentina. 20 - 23 de Agosto de 2013.
 9. **Montini Ballarin F.**, Pietrani F., Vinderola G., Abraham G.A., Frontini P.M., *A simple novel mechanical setup for measurement the flexural modulus of femurs of mice in a model of dietary Ca absorption*, 13er Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Materiales SAM – CONAMET, Puerto Iguazú, Argentina. 20 - 23 de Agosto de 2013.

10. **Montini Ballarin F.**, Cymberknop L.J., Armentano R.L., Frontini P.M., Abraham G.A., *Dynamic Compliance Measurement of Synthetic Nanofibrous Vascular Grafts*, Materials Today virtual conference: Nanotechnology. 11 - 13 Diciembre 2012.
11. **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Frontini P.M., Wong S-C., *Adhesión entre nanofibras hidrofóbicas*, 11° Congreso Binacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET 2011, Rosario, Sante Fé, Argentina. 18 – 21 de Octubre de 2011.
12. **Montini Ballarin F.**, Frontini P.M., Abraham G.A., *Study of nanofibrous morphology of small-diameter vascular grafts*, 2° Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, OBI, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 28 – 30 Septiembre de 2011. Publicado en revista Biocell, 36(1): A7(20), 2011.
13. Gonzalez M.A., **Montini Ballarin F.**, Brun M., Abraham G.A., Ballarin V.L., *Cuantificación de la morfología en imágenes de nanofibras poliméricas para Ingeniería de tejidos*, V Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica (CLAIB), Habana, Cuba. 16 – 21 de Mayo de 2011. Publicado en revista IFMBE Proceedings, Vol. 33, 2011, Springer.
14. **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Frontini P., Wong S-C., *Development of well-aligned nanofibrous membranes for wound healing*, MRS Fall Meeting, Boston, Massachusetts, United States of America. 29 – 03 de Noviembre – Diciembre de 2010.
15. **Montini Ballarin F.**, Buffa F., Abraham G.A., *Micro/nanofiber Polyurethane Scaffolds with Functional Properties*, V Argentine-Chilean Polymer Symposium (ARCHIPOL), Los Cocos, Córdoba, Argentina. 18 – 21 de Octubre, 2009.
16. **Montini Ballarin F.**, Buffa F., Abraham G.A., *Nanofibrous scaffolds containing conductive nanoparticles*, 1° Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, BIOOMAT, Rosario, Santa Fé, Argentina. 25 – 27 de Agosto, 2009. Publicado en revista Biocell, 33(3): A289(BM12), 2009.

8.4.2. Congresos nacionales

16. Blotta E., **Montini Ballarin F.**, Gonzales M.A., Ballarin V.L., Abraham G.A., *Medición de orientación predominante en nanofibras, basada en granulometrías normalizadas*, XIX Congreso Argentino de Bioingeniería y VIII Jornadas de Ingeniería Clínica, SABI, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. 4 – 6 Septiembre de 2013.
17. Cortez Tornello P.R., **Montini Ballarin F.**, Caracciolo P.C., Abraham G.A., *Sistemas poliméricos nanoestructurados para aplicaciones biomédicas*, Séptima edición anual de Biólogos En Red, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 15 – 16 de Noviembre de 2012.
18. **Montini Ballarin F.**, Cymberknop L., Armentano R., Frontini P., Abraham G.A., *Estudio preliminar del comportamiento mecánico de injertos vasculares sintéticos*, 4to Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 8 – 10 de Octubre 2012.
19. Cortez Tornello P.R., **Montini Ballarin F.**, Gonzalez M.A., Comas D.S., Cuadrado T.R., Abraham G.A., *Obtención y Caracterización de Estructuras Porosas para Aplicaciones Biomédicas*, 1er Congreso Argentino de Ingeniería - CADI 2012, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 8 – 10 de Agosto 2012.
20. Cortez Tornello P.R., Caracciolo P.C., **Montini Ballarin F.**, Buffa F., Cuadrado T.R., Abraham G.A., *Matrices nanofibrosas en el campo biomédico*, Tercer Encuentro de Materia Blanda, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 24 – 26 de Noviembre de 2010.
21. **Montini Ballarin F.**, Abraham G.A., Frontini P., Wong S-C., *Membranas poliméricas bioinspiradas para el tratamiento de heridas*, Tercer Encuentro de Materia Blanda, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 24 – 26 de Noviembre de 2010.
22. Gonzalez M.A., **Montini Ballarin F.**, Brun M., Abraham G.A., Ballarin V.L., *Caracterización de la morfología de imágenes de matrices*

poliméricas porosas para Ingeniería de Tejidos, JAIIO – CAIS 2010 Congreso Argentino de Informática y Salud, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 30 – 03 de Agosto – Septiembre de 2010.

23. **Montini Ballarin F.**, Frontini P., Abraham G.A., *Obtención y caracterización de membranas nanofibrosas de poli (ácido L-láctico)*, 3er Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina. 12 – 13 de Agosto 2010.