Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

ELABORACIÓN DE INJERTOS VASCULARES SINTÉTICOS DE BAJO CALIBRE Y SU CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, MECÁNICA Y BIOLÓGICA

Tesis que presenta

Omar de Jesús Castillo Cruz

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

MATERIALES POLIMERICOS

Diciembre de 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales, métodos experimentales, resultados y discusión de este documento provienen de las actividades realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México a 03 de Diciembre de 2013

Omar de Jesús Castillo Cruz

CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado:

PREPARACIÓN DE UN BIOCOMPOSITO DE POLIURETANO SEGMENTADO Y NANOPARTICULAS DE VIDRIO BIOACTIVO PARA REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS MAXILO-MANDIBULARES

Perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

DEDICATORIAS

A **Dios** por regalarme la vida y salud

A mis padres **José** y **Socorro** por motivarme e inspirarme

A mis hermanos **Darling** y **José** por todo el tiempo que hemos compartido juntos

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado mediante la beca No. 314857.

A mi director de tesis, Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez que a través de su gran apoyo, orientación, consejos, paciencia y dedicación se ha logrado concluir el presente trabajo.

A mis tutores Dr. Francis Avilés Cetina y al Dr. Dr. Birzabith Mendoza Novelo, por sus correcciones y orientaciones, y a mi honorable comité revisor integrado por Dr. Lerma Chan y Dr. Iván Oliva.

Al Dr. Showan N. Nazhat por su colaboración y aceptación durante mi estancia en la Universidad de McGill-Canadá para la caracterización biológica.

A la Dr. Patricia Quintana Owen por los espectros de DRX los cuales fueron realizaron en LANNBIO CINVESTAV Mérida en apoyo de los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160 y CONACYT LAB-2009-01 No. 123913. Al M.C. Daniel Aguilar y a la IBQ Carolina Castillo por la ayuda técnica.

Al Dr. Iván Oliva Arias por las caracterizaciones de AFM, las cuales fueron realizadas en el CINVESTAV Mérida.

A QI Rossana F. Vargas Coronado por su apoyo técnico en las caracterizaciones fisicoquímicas, térmicas y topográficas.

A mis compañeros del laboratorio de química, Lerma Chan, Saydi Cetina, Adrián Perales, Celín Lozano, Zenayda Aguilar, Mario Ucan.

Especialmente a mis compañeros de maestría Nancy G, Soledad P, Lizie H, Joel G, Obed R, con los que he compartido agradables momentos.

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD ii

RECONOCIMIENTO ..... ¡Error! Marcador no definido.v

DEDICATORIAS vi

AGRADECIMIENTOS viiii

LISTADO DE FIGURAS xiii

GLOSARIO DE TÉRMINOS xv

GLOSARIO DE SÍMBOLOS xviii

RESUMEN xix

ABSTRACT xx

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES 3

1.1 Perspectiva histórica y panorama 3

1.2 Anatomía vascular de las arterias 4

1.3 Fisiología de las enfermedades cardiovasculares 7

1.4 Propiedades mecánicas de las arterias 9

1.5 Injertos vasculares 13

1.6 Requerimientos para un injerto vascular 14

1.7 Injertos vasculares naturales 15

1.7.1 Injertos vasculares *in vitro* e *in vivo* 17

1.7.2 Injertos vasculares sintéticos 20

1.9 Poliuretanos 24

1.9.1 Aspectos generales 24

1.9.2 Síntesis de poliuretanos segmentados 24

1.9.3 Segmentos flexibles biodegradables 26
1.9.4 Segmentos rígidos biodegradables 28
1.9.5 Propiedades mecánicas de los poliuretanos segmentados 28
1.9.6 Biodegradabilidad de los poliuretanos segmentados 30
1.9.7 Poliuretanos segmentados en el campo médico 32

1.10 Estado del arte 33

1.11 Aplicaciones de la L-Arginina en injertos vasculares 37

1.12 HIPÓTESIS 39

1.13 OBJETIVOS 39

1.13.1 Objetivo general 39

1.13.2 Objetivos específicos 39

CAPÍTULO 2 PARTE EXPERIMENTAL 40

2.1 Síntesis de los poliuretanos segmentados 40

2.2 Elaboración de películas y tubos de poliuretanos segmentados 45

2.2.1 Películas de PUUS 45
2.2.2 Fabricación de un tubo de PUUS 45

2.3 Caracterización fisicoquímica y superficial 46

2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier 46
2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido 46
2.3.3 Difracción de rayos X 47
2.3.4 Análisis termogravimétrico 48
2.3.5 Microscopia electrónica de barrido 48
2.3.6 Microscopia de fuerza atómica 48
2.3.7 Cromatografía de permeación en gel 48
2.3.8 Ángulo de contacto 49

2.4 Caracterización mecánica 49

2.4.1 Ensayo a tensión longitudinal 49

2.4.2 Ensayo a tensión circunferencial 50
2.4.3 Resistencia a la sutura 51

2.5 Biocompatibilidad con fibroblastos 52
2.5.1 Cultivo celular 53
2.5.2 Preparación de las superficies 53
2.5.3 Microscopía celular 54

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 55
3.1 Síntesis de los poli (uretano ureas) segmentados 55

3.2 Caracterización fisicoquímica y superficial 56
3.2.1 FTIR 56
3.2.2 DSC 61
3.2.3 DRX 62
3.2.4 TGA 66
3.2.5 SEM 68
3.2.6 AFM 71
3.2.2 Pesos moleculares 78
3.2.6 Ángulo de contacto 79

3.4 Caracterización mecánica 82
3.4.1 Tensión longitudinal 82
3.4.3 Tensión circunferencial 86
3.4.3 Resistencia a la sutura 93

3.5 Estudios de biocompatibilidad 94

CONCLUSIONES 97

SUGERENCIAS 99

ANEXOS 100

BIBLIOGRAFÍA 101

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades relevantes entre arterias y venas humanas [11]. 11
Tabla 1.2 Propiedades mecánicas de diferentes tejidos humanos [16]. 13
Tabla 1.3 Resumen de los injertos vasculares in vitro e in vivo. 17
Tabla 1.4 Injertos vasculares sintéticos aprobados para su uso en USA [11]. 23
Tabla 1.5 Principales reactivos empleados para la síntesis de PUs [37]. 26
Tabla 1.6 Algunas propiedades físicas y mecánicas de la PCL [8, 37]. 27
Tabla 1.7 Propiedades mecánicas y degradación de algunos PUs [37]. 32
Tabla 1.8 Resumen del estado del arte en el desarrollo de injertos vasculares sintéticos a base de PUs. 34
Tabla 3.1 Propiedades térmicas de PUUR y PUUK. 62
Tabla 3.2 Pesos moleculares de los PUU sintetizados y Tecoflex®. 79
Tabla 3.3 Propiedades mecánicas de películas de PUUS y Tecoflex®, n = 10 84
Tabla 3.4 Propiedades mecánicas de tubos de PUUS y Tecoflex® a tensión longitudinal, n = 10. 86
Tabla 3.5 Resultados de los esfuerzos circunferenciales, radiales y cortantes de tubos de PUUS y Tecoflex®. 89
Tabla 3.6 Propiedades mecánicas para tubos de PUUS y Tecoflex® a tensión circunferencial, n = 10. 91
Tabla 3.7 Comparación entre E_{LP}, E_{LT} y E_{CT}. 92

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Muertes por CAD en los Estados Unidos en el 2002 [10]. 3
Figura 1.2 Estructura de una arteria sana que consta de tres túnicas [13]. 6
Figura 1.3 Células en el flujo sanguíneo [11]. 7
Figura 1.4 Esquema de la teoría de respuesta a lesiones en vasos sanguíneos [15]. 8
Figura 1.5 Arteria coronaria con dos trombos en el lumen [2]. 9
Figura 1.6 Diagrama Tensión–Deformación de una arteria humana [16]. 10
Figura 1.7 Tipos de aneurisma [11]. 14
Figura 1.8 Injertos vasculares naturales según su origen [23]. 16
Figura 1.9 Sugerencia para reemplazar vasos sanguíneos [11]. 22
Figura 1.10 Esquema general de la síntesis de un PUs segmentado [35]. 25
Figura 1.11 Comportamiento mecánico (A) Segmentos flexibles y rígidos antes de aplicarse un esfuerzo tensión; (B) alineación de los segmentos flexibles a bajos esfuerzos; (C) alineación de los segmentos rígidos a altos esfuerzos [39]. 30
Figura 2.1 Estructuras químicas de: (A) PCL: poli-ε-caprolactona; (B) HMDI: 4, 4'-metilen bis (ciclohexil isocianato); (C) Oct-Sn: 2-etilhexanoato de estaño. (D) DMF: Dimetilformamida. 41
Figura 2.2 Reactivos empleados en la segunda etapa de la síntesis: (A) monocloruro de L-Arginina; (B) dihidrocloruro de L-Lisina. 42
Figura 2.3 Interior de la caja de guantes. 43
Figura 2.4 Esquema para la obtención de PUUS. 44
Figura 2.5 (A) Molde de Teflón empleado para la elaboración de películas de PUUS; (B) Película de PUUS después de 24 h de secado. 45
Figura 2.6 (A) Película de PUUS alrededor de la varilla de teflón, (B) Tubo de PUUS recuperado de la varilla, donde se puede observar la sección transversal. 46
Figura 2.7 Esquema del ensayo a tensión longitudinal en: (A) Caso 1 (película); (B) Caso 2 (en tubo). 50
Figura 2.8 Esquema del ensayo a tensión circunferencial. 51

Figura 2.9 Esquema de la resistencia a la sutura..... 52
Figura 2.10 Plato de cultivo de 24 pozos con muestras tipo (A) y (B)..... 54
Figura 2.11 (A) Microscopio CLSM 5; (B) El plano Z se utilizó en muestras tipo B. 54
Figura 3.1 Enlaces urea (rojo) que se pueden formar entre la reacción de los extensor de cadena [L-Arginina: (I) o L-Lisina: (II)] y el HMDI..... 56
Figura 3.2 Espectros de FTIR de PUUR y PUUK..... 57
Figura 3.3 Acercamiento de la región entre 3500 y 3100 cm^{-1} de los espectros de FTIR de PUUR y PUUK..... 58
Figura 3.4 Acercamiento de la región entre 1800 y 1600 cm^{-1} de los espectros de FTIR de PUUR y PUUK..... 59
Figura 3.5 Formas de enlace entre ureas y uretanos presentes en los PUUS [8, 59]. 60
Figura 3.6 Termogramas de DSC para PUUR y PUUK. 61
Figura 3.7 Difractogramas obtenidos de los PUUR, PUUK y Tecoflex..... 63
Figura 3.8 (A) Estructura de la PCL; (B) Esquema de 3 fases en la PCL [61]. 65
Figura 3.9 Análisis termogravimétrico de PUUR y PUUK (A) Masa residual; (B) Derivada de la masa residual. 67
Figura 3.10 Resultados de SEM en películas: (A) PUUR; (B) PUUK y (C) Tecoflex®. 69
Figura 3.11 Resultados de SEM en superficies exteriores: (A, C y E); superficies interiores (B, D y F) de tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex® respectivamente. 70
Figura 3.12 Resultados de AFM en películas de: (A) PUUR; (B) PUUK y Tecoflex®. 72
Figura 3.13 Resultados de AFM en superficie exterior de tubos de: (A) PUUR (B) PUUK y (C) Tecoflex® 74
Figura 3.14 Resultados de AFM en superficie interior de tubos de: (A) PUUR; (B) PUUK y (C) Tecoflex® 75
Figura 3.15 Esfuerzo en vigas: (A) Viga recta; (B) Flexión pura; (C) Fuerzas resultantes de compresión y tensión [67]. 76

Figura 3.16 Análisis de secciones planas (f-g) y (h-i) en vigas [67]..... 77
Figura 3.17 Ángulo de contacto en superficies de películas de PUUS y Tecoflex®, n = 10. 80
Figura 3.18 Ángulo de contacto en: (A) Superficie exterior; (B) Superficie interior de tubos de PUUS y Tecoflex®..... 81
Figura 3.19 Curvas representativas esfuerzo-deformación para películas de PUUS y Tecoflex®. 83
Figura 3.20 Curvas representativas esfuerzo-deformación para tubos de PUUS y Tecoflex®. 85
Figura 3.21 Distribución de la fuerza y momento circunferencial que actúan en una sección de una viga curva [73]. 88
Figura 3.22 Puntos donde se determinaron los esfuerzos circunferenciales, radiales y cortantes. 89
Figura 3.23 Curvas representativas de esfuerzo circunferencial - deformación circunferencial para tubos PUUS y Tecoflex®. 91
Figura 3.24 Fuerza necesaria para retirar una sutura a través de la pared de injertos de PUUS y Tecoflex®, n = 10..... 94
Figura 3.25 Fibroblastos de ratón a 3 días de cultivo en: películas (A, B y C) y superficies exteriores de tubos (D, E y F) de PUUR, PUUK y Tecoflex®. 95

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AFM	Microscopia de fuerza atómica
AP	Arteria pulmonar
BDI	1,4 Butileno diisocianato
BDO	Butanodiol
BSE	Encefalopatía Espongiforme Bovina (por sus siglas en inglés)
CE	Células endoteliales
CAD	Enfermedades cardiovasculares (por sus siglas en inglés)
DMF	Dimetilformamida
DRX	Difracción de rayos x
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)
E_{LP}	Módulo elástico a tensión longitudinal en películas
E_{LT}	Módulo elástico a tensión longitudinal en tubos
E_{CT}	Módulo elástico a tensión circunferencial en tubos
$E_{100\%}$	Módulo secante calculado al 100% de deformación
EG	Etilen glicol
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HDI	1,6 Hexametileno diisocianato
HMDI	4,4-metilen-bis-ciclohexil diisocianato
HUVECs	Células endoteliales del cordón umbilical humano (por sus siglas en inglés)
L-Arg	L- Arginina
LAEG	2-hidroxietil-2 hidroxipropanoato
LDI	Ester lisina
L-Lys	L-Lisina
MDI	4,4 difenilmetano

MPa	Megapascal (1×10^6 N/m^2)
NO	Óxido nítrico (por sus siglas en inglés)
Oct-Sn	2-etilhexanoato o Octanoato de estaño
P	Putrescina
PBS	Buffer de fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PCUs	Poliuretanos segmentados basados en carbonatos
PDI	Índice de polidispersidad
PEEU	Poliuretanos segmentados basados en poliéter
PET	Poli (etilen) tereftalato o Dacron
PEO	Poli (óxido de etileno)
PEU	Poliuretanos segmentados basados en poliéster
PGA	Ácido poliglicólico
PEGMA	Poli (etilen glicol) con metacrilato
PLA	Ácido láctico
PLGA	Ácido poliglicólico co polimerizado con ácido láctico
PPO	Poli (óxido de propileno)
ePTFE	Politetrafluoroetileno o teflón expandido
PTMO	Poli (óxido de tetrametileno)
PTMC	Poli (carbonato de trimetileno)
PUs	Poliuretanos
PUUK	Poli (uretano-urea) segmentado con L-Lisina como extensor de cadena
PUUR	Poli (uretano-urea) segmentado con L-Arginina como extensor de cadena
PUUS	Poli (uretano-ureas) segmentados
PVA	Alcohol de polivinilo
Rrms	Rugosidad media cuadrática (por sus siglas en inglés)
SF	Segmento flexible
SR	Segmento rígido

SEM	Microscopia electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)
SMC	Células musculares lisas (por sus siglas en inglés)
TGA	Análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés)
THF	Tetrahidrofurano
Tm	Temperatura de fusión
Xc	Porcentaje de cristalinidad relativa de la PCL

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

υ	Relación de Poisson
σ_c	Esfuerzo de cedencia
σ_r	Esfuerzo radial
σ_{rup}	Esfuerzo de ruptura
σ_θ	Esfuerzo circunferencial
ΔH_f	Entalpia de fusión de la PCL
ΔH^o_f	Entalpia de la PCL 100% cristalina
$\tau_{\theta r}$	Esfuerzo cortante
ε_{max}	Deformación unitaria máxima

RESUMEN

Poli (uretano-ureas) segmentados (PUUS) fueron sintetizados empleando aminoácidos de L-Arginina (PUUR) y L-Lisina (PUUK) como extensores de cadena y pre polímero de poli-ε-caprolactona diol (PCL) con 4,4'-metilen-bis-ciclohexildiisocianato (HMDI). Películas delgadas y tubos de estos mismos materiales fueron caracterizados mediante FTIR, DSC, DRX, AFM, SEM y propiedades mecánicas. La composición química de los PUUS, obtenida por FTIR, mostró absorciones características del grupo uretano (-NHCOO-) alrededor de 1500 cm^{-1}, NH alrededor de 3300 cm^{-1}, y los C=O de la PCL alrededor de 1730 cm^{-1}. Difracción de rayos X reveló que los PUUS pueden ser considerados como semicristalinos al presentar un pico de $2\theta = 19.9°$. Mediante DSC sé determino la una temperatura de fusión (Tm) a 49.6 °C y 47.8 °C para PUUR y PUUK respectivamente. A través de AFM se encontró que las películas PUUK son más rugosas (0.644 μm) que las de PUUR (0.309 μm). Sin embargo la rugosidad en las superficies exteriores de los injertos de PUUR y PUUK fue de 0.296 μm y 0.121 μm respectivamente. La caracterización mecánica determinó que el módulo elástico a tensión longitudinal en películas (E_{LP}), de PUUR y PUUK fue de 6.42 ± 0.01 MPa y 6.31 ± 0.92 MPa respectivamente, mientras que los módulos elásticos de los tubos de PUUR y PUUK ensayados a tensión longitudinal (E_{LT}), fue de 5.53 ± 0.99 MPa y 4.34 ± 0.55 MPa respectivamente, y los módulos elásticos de los tubos de PUUR y PUUK ensayados a tensión circunferencial (E_{CT}) fue de 3.76 ± 0.77 MPa y 4.44 ± 1 MPa respectivamente. Estos resultados indican que los injertos vasculares presentan anisotropía geométrica. Los ensayos de resistencia a la sutura mostraron que PUUK presentó una menor resistencia al utilizar sutura de seda 3-0. La adhesión y proliferación celular a 3 días de cultivo con fibroblastos de embrión de ratón en la superficie exterior de PUUR y PUUK mostró que estas células se orientaron sobre los patrones longitudinales observados por SEM.

ABSTRACT

Segmented poly (urethane-ureas) (PUUS) based on polycaprolactone diol and 4,4'-methylene-bis (cyclohexyl isocyanate) prepolymers were synthesized using L-Arginine (PUUR) and L-Lysine (PUUK) as chain extenders. Films and tubular grafts were prepared and characterized by FTIR, DSC, DRX, AFM and SEM. The chemical composition, as obtained by FTIR, showed urethane group absorptions (-NHCOO-) at 1500 cm^{-1}, NH at 3300 cm^{-1} and C=O from the PCL at 1730 cm^{-1}. X-ray diffraction showed that PUUS can be considered as semicrystalline polymers due to the presence of reflections at $2\theta = 19.9°$. Crystallinity was confirmed by DSC as these polymers exhibited a melting temperature (Tm) at 49.6 °C and 47.8 °C for PUUR and PUUK respectively. By AFM was observed that the PUUK films had a rougher surface (0.644 µm) than PUUR (0.309 µm). However, the roughness in the outer surfaces of the grafts was 0.296 µm and 0.121 µm for PUUR and PUUK respectively, indicating that the preparation of the grafts reduced their roughness.

The mechanical characterization determined that the elastic modulus of longitudinal stress in films (E_{LP}) of PUUR and Puuk was 6.42 ± 0.01 ± 0.92 MPa and 6.31 MPa respectively. While the elastic modulus of the tubes tested at longitudinal stress (E_{LT}) was 0.99 ± 5.53 MPa and 4.34 ± 0.55 MPa, respectively for PUUR and PUUK. And the elastic modulus of the tubes tested at circumferential stress (E_{CT}) was 3.76 ± 0.77 MPa and 4.4 ± 1 MPa, respectively for PUUR and PUUK. These findings suggest that vascular grafts present geometric anisotropy. Suture resistance, measured using silk 3-0, of PUUK was lower compared to PUUR.

Adhesion and 3 day cell proliferation of mouse embryo fibroblasts showed orientation on the outer surface of PUUR and PUUK as observed by SEM.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares a menudo afectan el flujo de la sangre ya sea mediante el bloqueo o el debilitamiento de los vasos sanguíneos. Entre las enfermedades cardiovasculares se encuentran las: cardiopatías coronarias (ataques cardiacos), enfermedades cerebrovasculares (apoplejía), el aumento de la tensión arterial (hipertensión), vasculopatías periféricas, cardiopatías reumáticas, cardiopatías congénitas e insuficiencia cardiaca [1], entre otras. A pesar de los avances alcanzados durante la década pasada se estima que en los próximos años continuarán siendo la primera causa de muerte en los países industrializados [2]. Actualmente existen injertos vasculares sintéticos de poli (etilen) tereftalato (PET) conocido como Dacron y de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) conocido como Teflón expandido, pero dichos materiales fracasan rápidamente debido a sus altos ritmos de oclusión en aplicaciones de bajos calibres (< 6 mm) [3, 4]. Por esta razón es importante obtener nuevos materiales sintéticos que puedan ser usados como injertos vasculares de bajo calibre. A partir de 1980 los poliuretanos segmentados (PUs) han ganado popularidad como injertos vasculares. Entre las características que los han convertido en candidatos primarios para esta aplicación se encuentra su biocompatibilidad y sus propiedades físicas [5], entre otras. Los PUs consisten en tres diferentes monómeros: un poliol que constituye el segmento flexible, un diisocianato, y un monómero extensor de cadena, que forman el segmento rígido [6]. Gracias a sus aceptables propiedades en medicina los PUs han sido empleados en: válvulas de corazones artificiales, injertos vasculares, para fijar fracturas, para uniones artificiales, en dispositivos de liberación controlada de fármacos, [7] etc. Sin embargo, los PUs tradicionales presentan pobres propiedades de fatiga, degradación no controlada y una pobre adhesión celular, pero gracias a la versatilidad en su síntesis permite mejorarlos y adecuarlos de acuerdo a las características deseadas [8].

Una desventaja que presentan los injertos vasculares sintéticos es que comúnmente inducen a la formación de trombos. Por lo tanto, numerosos estudios han sido dirigidos para mejorar el desempeño de los injertos vasculares sintéticos y recientemente existe un interés significativo en L-arginina (L-Arg) debido a su capacidad de anti agregación plaquetaria y su inhibición a la formación de trombos [9].

Con base en lo anterior se propone en este trabajo el desarrollo de PUs para una posible aplicación como un injerto vascular de bajo calibre, utilizando materiales biodegradables como la policaprolactona (PCL), diisocianatos anti cancerígenos como el 4,4-metilen-bis-ciclohexil diisocianato (HMDI) y extensores de cadena aminoácidos como la L- lisina (L-Lys) y L-Arginina (L-Arg). La selección de estos aminoácidos se basa en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, en donde se encontró que los poli (uretano-ureas) segmentados (PUUS) preparados a base de amino ácidos ayudan significativamente a la proliferación de células endoteliales, además de poseer buenas propiedades mecánicas, adecuado tiempo de coagulación, baja citotoxicidad y productos de degradación no tóxicos, lo cual lo convierten en un buen candidato para su uso en aplicaciones cardiovasculares [8]. Este trabajo de tesis está organizado de la siguiente manera. En el capítulo 1 se describen aspectos generales relacionados con las enfermedades cardiovasculares, las propiedades mecánicas de las arterias y aplicaciones médicas de los poliuretanos segmentados. En el capítulo 2 se detalla la metodología de la síntesis de los poliuretanos segmentados seguido de las diferentes técnicas de caracterización empleadas. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos y se discuten los factores involucrados en las propiedades mecánicas de los PUUS, el efecto de las propiedades fisicoquímicas, superficiales y la compatibilidad biológica. Finalmente, se incluye una sección de conclusiones y de sugerencias para trabajos futuros.

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

1.1 Perspectiva histórica y panorama

Hace 100 años las enfermedades cardiovasculares (CAD, por sus siglas en inglés) representaban el 10% de las muertes pero en los últimos años las CAD representan aproximadamente el 30 % de la mortalidad en el mundo y casi el 50 % en el mundo industrial, donde la mayoría de las muertes por CAD son relacionadas con la arteria coronaria, (ver Figura 1.1), debido a la acumulación de tejido fibroso, lípidos y compuestos de calcio originando que las arterias se bloqueen parcialmente conduciendo a la ateroesclerosis [10]. La ateroesclerosis es una forma de arterioesclerosis (endurecimiento de las arterias) la cual es una enfermedad multifuncional y está influenciada por la dieta alimenticia, tabaquismo, diabetes, alta presión sanguinea, falta de ejercicio y otros factores [1, 2].

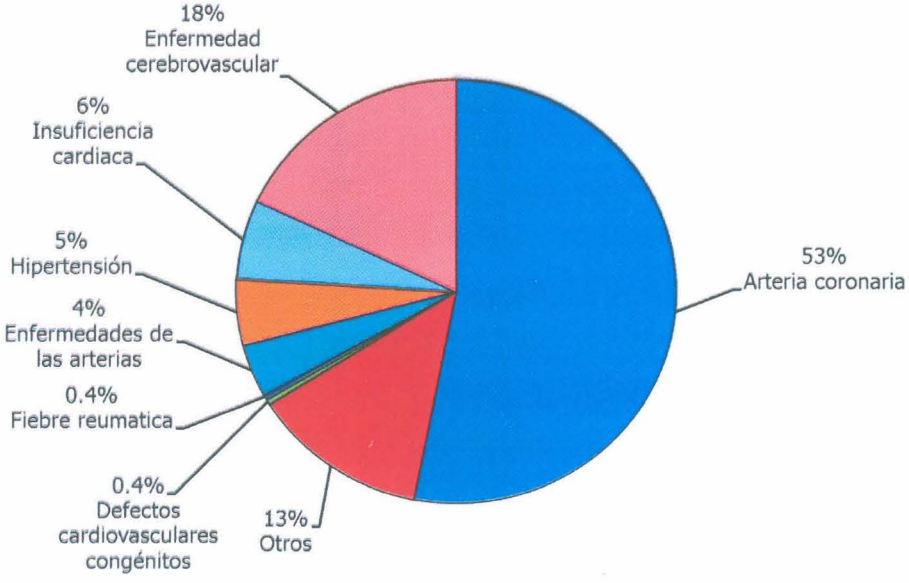

Figura 1.1 Muertes por CAD en los Estados Unidos en el 2002 [10].

Algunas personas nacen con las CAD y otras la desarrollan a lo largo de su vida. Las CAD incluyen: la cardiopatía coronaria (falta de circulación de la sangre hacia el corazón y sus alrededores), insuficiencia cardiaca congestiva (incapacidad del corazón para bombear suficiente sangre a través de todo el cuerpo) y la enfermedad valvular (cuando las válvulas cardiacas experimentan insuficiencia), entre otras [1]. En el 2006 la Asociación Americana del Corazón estimó que 1 de cada 6 muertes estaba relacionada con esta enfermedad y que entre 1996 al 2006 el número de casos registrados por padecimientos vasculares aumentó de 5.4 millones a 7.2 millones, es decir un 33%, y se estima que para el 2020 la enfermedad coronaria superará las enfermedades infecciosas como la principal causa de muerte y morbilidad [11]. Por otra parte, el costo directo o indirecto de las CAD en los Estados Unidos fue estimado en $ 503.2 billones para el 2010 y se cree que más de 81 millones de adultos americanos tienen uno o más tipos de enfermedad cardiovascular, lo que ha convertido a estas enfermedades en una carga económica [12]. Esta tendencia muestra que las CAD están creando la necesidad de nuevos tratamientos como por ejemplo implantes, productos farmacéuticos o cambios radicales en los hábitos de vida.

1.2 Anatomía vascular de las arterias

Para comprender como las CAD afectan al sistema vascular es necesario conocer la anatomía vascular de los vasos sanguíneos y los principales componentes del flujo sanguíneo. Como se sabe la sangre es transportada hacia y desde el corazón por los vasos sanguíneos, los cuales pueden ser clasificados en arterias y venas. Las arterias transportan la sangre desde el corazón y las venas transportan la sangre hacia el corazón; tanto las arterias como las venas tienen una estructura similar formada por tres túnicas, (ver Figura 1.2), las cuales son: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia [13]. A continuación, se describe cada una de estas túnicas.

1) **Túnica íntima:** Esta es la capa interior de la arteria y está formada por células endoteliales (CE) por lo tanto también es llamada endotelio, cuya función es prevenir la trombosis espontánea y regular el tono vascular de las células musculares lisas (SMC, por sus siglas en inglés). La mayoría de los anatomistas y biólogos celulares definen que la íntima, además de estar formada de CE, contiene una membrana basal (aproximadamente 80 nm de espesor) y una capa llamada sub endotelio compuesta de capas de colágeno, fibras elásticas, SMC, y quizás algunos fibroblastos. Sin embargo, la capa sub endotelial está usualmente presente en grandes arterias como la aorta, mientras que en la mayoría de otros vasos sanguíneos, la túnica íntima consiste en CE y una membrana basal.

2) **Túnica Media:** Esta es la capa media de la arteria, la cual está compuesta de SMC que secretan una matriz extracelular como el colágeno y la elastina. La elastina contribuye a la elasticidad de las arterias y tiene la capacidad para deformarse reversiblemente hasta 220% de su longitud original. Por otra parte, el colágeno confiere la resistencia a la tracción de los vasos y se asegura de que el recipiente no se extiende más allá de su capacidad [14]. Por ello, la elastina y el colágeno contribuyen a las propiedades viscoelásticas de una arteria.

3) **Túnica Adventicia:** Esta es la capa externa de la arteria, se compone principalmente de fibroblastos y de matriz extracelular, en esta capa se encuentra el suministro de sangre microscópica a la arteria (*vasa vasorum*), así como su inervación simpática, fibras de colágeno, macrófagos, nervio mielinizado y nervio amielínico.

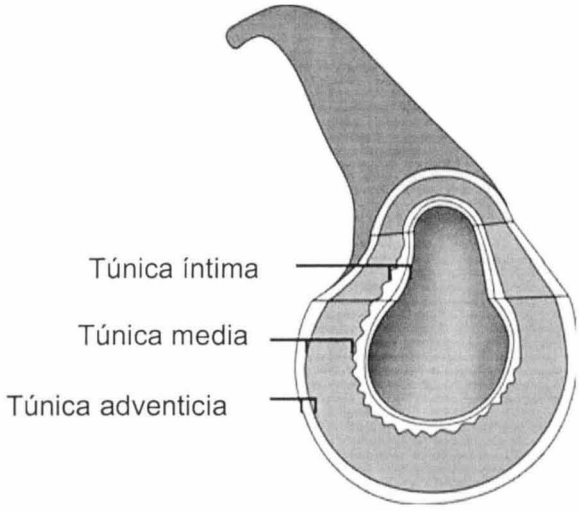

Figura 1.2 Estructura de una arteria sana que consta de tres túnicas [13].

Por otra parte, aproximadamente la mitad del volumen de la sangre humana está compuesta de células, la otra mitad está compuesta de agua, albúmina, fibrinógeno e iones (Na, K, P, Ca, etc.). Las células en la sangre incluyen a los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, (ver Figura 1.3). En donde los glóbulos rojos presentan una geometría en forma de discos cóncavos con aproximadamente 8 μm de diámetro, y en ellas se encuentra la hemoglobina que son las responsables de transportar el O_2 desde los pulmones hacia el cuerpo y de regresar a los pulmones CO_2. Un trauma o cambios en la presión pueden provocar en estas células la liberación de hemoglobina que conduce a su vez a una disminución de la capacidad de transportar CO_2 [11]. Por otra parte, los glóbulos blancos presentan una geometría esférica y tienen un diámetro entre 7 – 22 μm defienden al cuerpo contra sustancias extrañas y enfermedades [11]. Mientras que las plaquetas son discos entre 2 – 4 μm de diámetro y estas contienen factores de crecimiento que son liberados tras una activación para limitar una hemorragia, ya que después de ocurrir una lesión en la arteria las plaquetas se adhieren con el fin de reducir la pérdida de sangre a través de la formación de coágulos. En donde un

coágulo fijo se denomina trombo mientras que un coágulo flotante se le conoce como émbolo [11].

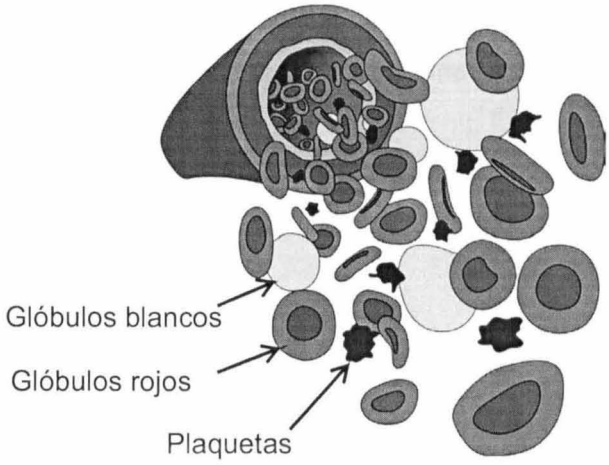

Figura 1.3 Células en el flujo sanguíneo [11].

1.3 Fisiología de las enfermedades cardiovasculares

En el siglo XVI las CAD fueron reconocidas por primera vez como una "degeneración de los huesos" por Fallopius. Esto, condujo a Lobstein en el siglo XIX a la terminología de arterioesclerosis (derivado de las palabras griegas "airpipe" es decir arteria y de "scleros" que significa duro). Sin embargo, este término fue modificado a ateroesclerosis (derivado en la palabra griega "gruel" que significa ateroma) para reflejar el descubrimiento de Anitschow en 1914. Desde entonces varias teorías han sido desarrolladas para poder explicar la ateroesclerosis incluyendo la de teorías de agregación plaquetaria, la degenerativa, la de estrés oxidativo, de respuesta a lesiones, la inflamatoria, la monoclonal, etc. Actualmente prevalece la teoría de respuesta a lesiones, (ver Figura 1.4), promovida por Russel Ross y por John Glomset en 1973 y que subsecuentemente ha sido modificada a lo largo de las décadas posteriores. Esta

teoría sugiere que la ateroesclerosis se desarrolla como una respuesta proliferativa inflamatoria a una lesión en la túnica íntima [15].

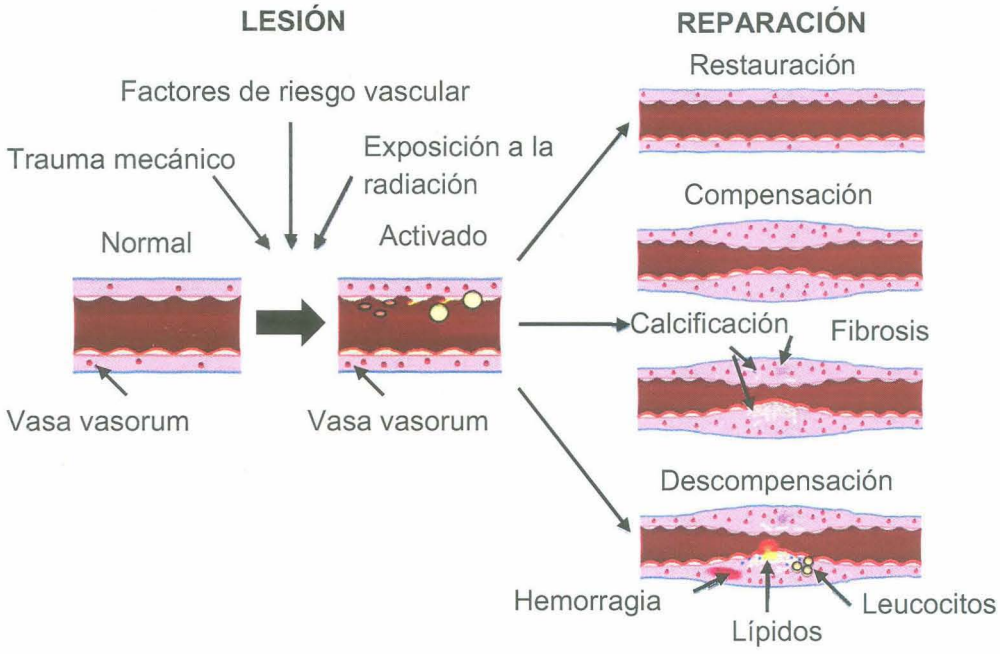

Figura 1.4 Esquema de la teoría de respuesta a lesiones en vasos sanguíneos [15].

El resultado de esta lesión está determinado por los mecanismos de reparación distinguiéndose entre: una completa restauración, una compensación con una remodelación estable incluyendo fibrosis y calcificación o por una remodelación inestable incluyendo inflamación, neovascularización y trombosis. Esta teoría establece que la activación o disfunción de la túnica íntima (endotelio) marca el inicio de la ateroesclerosis [15], ya que el endotelio desempeña un papel central en la homeostasis vascular mediante la producción balanceada de moléculas vasodilatadoras y antimitógenas (óxido nítrico y prostaciclina, respectivamente) y

de factores vasoconstrictores y mitógenos [2]. Por otra parte, el engrosamiento de la túnica íntima y la neovascularización del vasa vasorum son los primeros cambios estructurales en la arteria coronaria, y finalmente se puede observar el crecimiento de la placa en la arteria ateroesclerótica y que puede ser hacia dentro (remodelado negativo) o hacia fuera (remodelación positiva) [15]. En la Figura 1.5 se puede apreciar dos trombos que sobresalen en el lumen de la arteria coronaria [2].

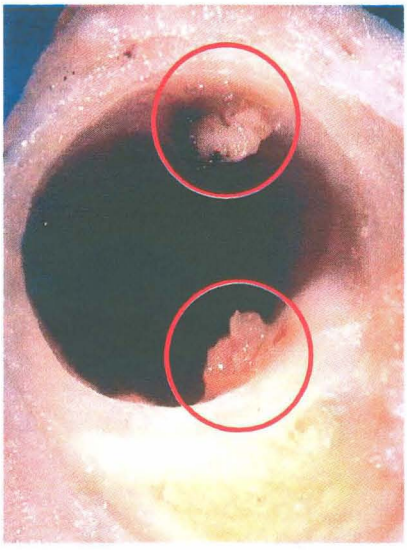

Figura 1.5 Arteria coronaria con dos trombos en el lumen [2].

1.4 Propiedades mecánicas de las arterias

Una de las características importantes de las arterias sanas es que poseen la capacidad de adaptarse a la naturaleza del flujo sanguíneo pulsátil, debido a que es un compuesto biológico formado por diferentes túnicas como se mencionó anteriormente. En la Figura 1.6 se puede aprecia la diferencia del desempeño mecánico de los componentes de un compuesto biológico como es el caso de las

arterias humanas. Ante un estímulo externo (presión sanguínea), la elastina muestra inicialmente una baja rigidez mientras que el colágeno provee una mayor rigidez para altos niveles de esfuerzo [16]. Es decir la fuerza elástica en las paredes de una arteria a presiones biológicas normales depende de la contribución de ambos (elastina y colágeno) [16].

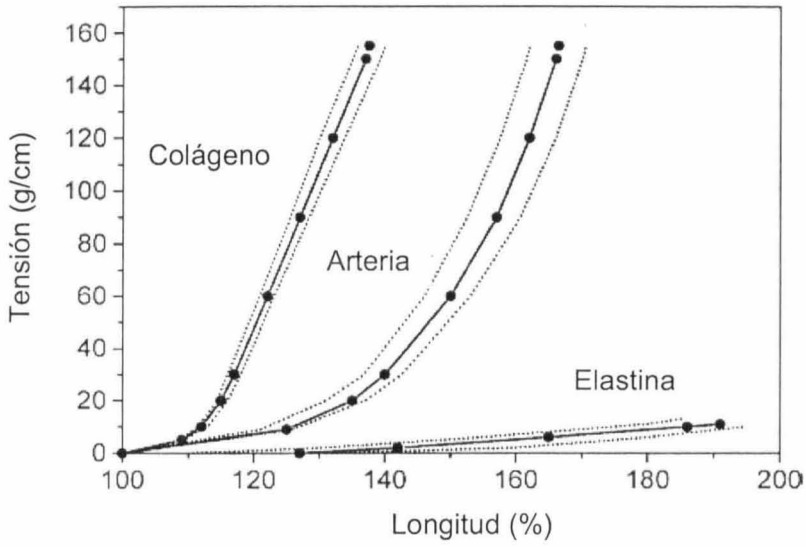

Figura 1.6 Diagrama Tensión–Deformación de una arteria humana [16].

Algunas de las dimensiones y esfuerzos relevantes en arterias y venas humanas se encuentran en las Tabla 1.1 [11].

Tabla 1.1 Propiedades relevantes entre arterias y venas humanas [11].

VASO SANGUÍNEO	Diámetro del lumen (mm)	Espesor de la pared (mm)	Esfuerzo en la pared (Pa)	Presión (kPa)
Aorta	25	2	19,000	13.3
Arteria	4	1	6,000	12
Arteriola	0.03	0.02	50-120	8
Capilar	0.008	0.001	1.6	4
Vénula	0.002	0.002	2.6	2.7
Vena	5	0.5	40	2
Vena cava	30	1.5	2,100	1.3

Otra propiedad importante en las arterias es la complianza, usualmente se define como el cambio del volumen del injerto vascular por unidad de cambio en la presión transmural, es decir la complianza es un índice aproximado de la rigidez y de la facilidad con que se puede deformar [17]. Por lo tanto, es considerada como el cambio del volumen al incrementar la presión interna del vaso sanguíneo y se expresa como el porcentaje de cambio del diámetro por mm Hg^{-1}. Por ello, la complianza en un injerto ideal debería ser idéntico al de las arterias, pero una complianza mayor o menor puede ser negativo ya que puede causar diferentes deformaciones mecánicas y diferentes esfuerzos hemodinámicos de corte [16]. Por ejemplo, al incrementarse el esfuerzo hemodinámico cortante se produce un daño en las CE y también un incremento del esfuerzo en la sutura quirúrgica en donde el 40 % de la energía del flujo pulsátil se refleja en esta zona [18]. Por

último, la complianza depende de la configuración de la arteria, es decir del diámetro y espesor de la pared, así como de propiedades fundamentales tales como el módulo elástico o de Young (E) y la relación de Poisson (υ).

El módulo elástico caracteriza la respuesta elástica de la pared viscoelástica del tejido y la relación de Poisson es por definición el valor absoluto de la relación entre la deformación transversal y la deformación axial. La relación de Poisson característica en las arterias naturales es de 0.5, y el intervalo típico de la complianza en las arterias es de 0.08 – 0.12 % mm Hg $^{-1}$ mientras que en los injertos sintéticos tradicionalmente empleados como el Dacron y ePTFE es de 0.014 – 0.019 % mm Hg $^{-1}$. Por lo tanto, en los injertos sintéticos la complianza es de 4 a 8 veces menos compatibles con una arteria [16].

A diferencia de las arterias, los injertos sintéticos no pueden adaptar su diámetro a los cambios de presión (sístole/diástole). Por lo tanto, un nivel óptimo de esfuerzos hemodinámicos de corte no se puede mantener dentro del injerto sintético a menos que el tamaño del injerto sea adecuado. Para evitar esto, el tamaño del injerto sintético debe de coincidir exactamente con el tamaño de la arteria a substituir ya que si un injerto sintético es más grande que la arteria se creará un estado de flujo sanguíneo bajo produciendo un bajo esfuerzo hemodinámico de corte lo cual promoverá el fracaso del injerto. Por otro lado, cuando un injerto es demasiado pequeño se desarrolla una capa de fibrina sobre la superficie artificial lo cual puede obstruir el lumen del injerto. En la Tabla 1.2 se encuentran algunas diferencias mecánicas entre las principales arterias y venas del cuerpo humano [16].

Tabla 1.2 Propiedades mecánicas de diferentes tejidos humanos [16].

Vaso sanguíneo	Resistencia a la tensión (MPa)		Elongación (%)	
	Transversal	Longitudinal	Transversal	Longitudinal
Vena cava inferior	3.03	1.17	51	84
Aorta ascendente	1.07	0.069	77	81
Uretra	0.47	1.03	98	36
Tráquea	0.35	2.16	81	61

Finalmente hacer que los cirujanos se concienticen sobre estas diferencias mecánicas puede ayudar en la toma de decisiones quirúrgicas y a inspirar nuevos diseños de materiales o técnicas que mejoren la relación entre las propiedades mecánicas de los injertos vasculares y los vasos sanguíneos nativos.

1.5 Injertos vasculares

Los injertos vasculares pueden ser definidos como tubos o conductos y pueden ser clasificados de acuerdo a su origen en: naturales y sintéticos [8]. Dichos injertos son necesarios cuando el paciente sufre ateroesclerosis severa y cuyos efectos no pueden ser aliviados a través de otras prácticas. En casos extremos cuando las arterias coronarias son bloqueadas el corazón deja de recibir la sangre adecuada, bajo estas condiciones se le conoce como angina de pecho y la cirugía que se practica se denomina cirugía de revascularización coronaria [11]. Los

injertos vasculares también pueden ser utilizados cuando se produce un aneurisma, el cual es una protuberancia en un vaso sanguíneo debido a un adelgazamiento y debilitamiento de la pared del vaso como se muestra en la Figura 1.7 [11]. Existen otras formas para clasificarlos y son de acuerdo a su geometría (recto, cónico, bifurcado, pared estándar, pared delgada, poroso, etc.), de acuerdo a su diámetro interno en alto calibre ≥ 6 mm y bajo calibre ≤ 6mm o de acuerdo a la vasculatura que va a reemplazar.

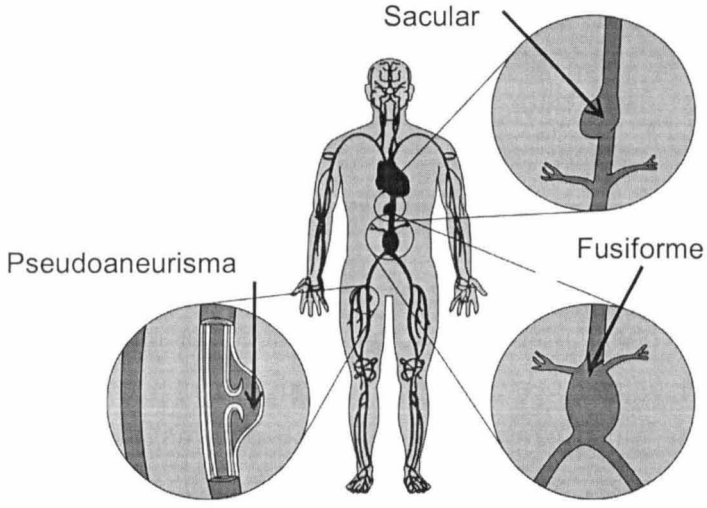

Figura 1.7 Tipos de aneurisma [11].

1.6 Requerimientos para un injerto vascular

Cuando se considera reemplazar una arteria, deben considerarse varios requerimientos; por ejemplo, las arterias son anisotrópicas, compatibles con el sistema pulsátil del flujo sanguíneo y son resistentes a la trombosis, entre otras. Sin embargo, en los injertos vasculares sintéticos algunos de estos requisitos no se cumplen. Por ello dos factores pueden ser considerados claves para el fracaso del mismo. Uno es la hiperplasia que se desarrolla entre la unión del injerto rígido y la arteria nativa y el otro factor puede ser la pérdida de "auto limpieza" en el

injerto vascular rígido, con lo que las pulsaciones del flujo ya no pueden evitar los depósitos de fibrillas y plaquetas formadas en el lumen del injerto vascular. Pero ¿cuáles son exactamente los requerimientos ideales para substituir una arteria? Éstos se pueden enlistar en dos tipos: críticos y deseables [17, 19]. Para los requerimientos tipo críticos se encuentra que deben ser biocompatibles en varios aspectos (no trombogénico, no inflamatorio, no inmunogénico, por mencionar los tres más importantes); deben de acercarse a la naturaleza viscoelástica de las arterias, particularmente importante para las arterias de bajo calibre; deben ser capaces de soportar presiones fisiológicas normales de 80 – 120 mm Hg, una resistencia a la explosión (burst strength) de 1680 ±307 mm Hg, una resistencia a la sutura de 273 ± 31 g [20], una resistencia a la tensión transversal de 0.78 – 1.37 MPa, exhibir una deformación del 65-83 % [21] y una complianza entre 0.08–0.12 % mm Hg $^{-1}$ [16]; deben de adaptarse a los cambios de presiones sistólica y diastólica [19]; también, deben ser capaces de "remodelarse", es decir permitir el crecimiento de una capa CE, ya que el endotelio participa en el proceso de hemostasia que es el proceso que el cuerpo utiliza para detener el flujo de sangre cuando el sistema vascular ha sido dañado. Para los requerimientos tipo deseables se encuentran que deben de ser suturable en su lugar, además se desea una facilidad de fabricación, adicionalmente deben ser de fácil esterilización y de igual manera disponibles en varios diámetros [19], entre otros requerimientos. Estos requerimientos son abrumadores y con toda certeza se puede afirmar que ningún material sintético o las venas satisfacen estas necesidades.

1.7 Injertos vasculares naturales

Existen alternativas naturales para substituir arterias, (ver Figura 1.8), como por ejemplo, injertos autólogos o autoinjertos, es decir, que pertenecen al mismo paciente. Este tipo de injerto vascular plantea muy pocas dificultades en cuanto al comportamiento inmunológico y a las posibles cuestiones éticas. Sin embargo, tiene importantes limitaciones en cuanto a disponibilidad, la morbilidad de la zona

donde se obtiene el tejido, problemas de infecciones y en ocasiones de resorción [15, 22]. Los avances experimentales sobre la manipulación, tratamiento y conservación de tejidos y órganos permiten ampliar las posibilidades de utilizar órganos a partir de donantes humanos, ya sea vivos o postmorten, conocidos como homoinjertos. Las limitaciones en esta práctica vienen impuestas por el requisito de la administración de medicamentos inmunosupresores para evitar el rechazo y la contaminación vírica dependiendo de su procedencia y manipulación; así como por aspectos éticos, religiosos y legales [22].

Otra alternativa es la utilización de heteroinjertos o xenoinjertos es decir, tejidos u órganos procedentes de especies animales. Sin embargo, los problemas asociados a la enfermedad de las vacas locas o Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE, por sus siglas en inglés) y su asociación a la enfermedad de Creutzfeldt – Jakob, aparecida en la segunda mitad de los años 90 han impuesto una serie de limitaciones [22].

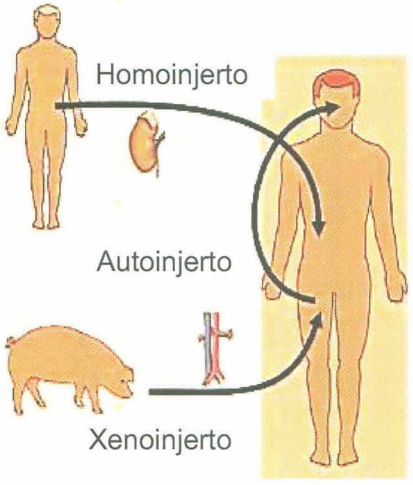

Figura 1.8 Injertos vasculares naturales según su origen [23].

1.7.1 Injertos vasculares *in vitro* e *in vivo*

A continuación, se describen algunos de los trabajos más destacados en la búsqueda de un injerto vasculares y en la Tabla 1.3 se presenta un resumen

Tabla 1.3 Resumen de los injertos vasculares *in vitro* e *in vivo*.

Año	Autor	Modelo/ Materiales	Aportación	Referencia
1985	Weinberg y Bell	*in vitro*/CE, SMC, fibroblastos, Dacron, (células de bovino)	Demostró tener características similares a las arterias.	[24]
1993	L´Heureux	*in vitro*/CE, SMC, fibroblastos, colágeno tipo I y II (células exclusivamente humanas)	Presentó características fenotípicas de las células vasculares.	[25]
1997	Niklason	*in vitro*/PLGA, CE, fibroblastos, PGA (células de bovino)	Se aplicó fuerzas pulsátiles a la construcción del polímero/célula durante el cultivo.	[26]
1998	Shinoka	*in vitro e in vivo*/poliglactina, PGA (células de la arteria carótida corderos)	Después de 7 días de cultivo in vitro substituyeron 2 cm de la arteria pulmonar en corderos.	[27]
1998	L´Heureux	*in vitro*/CE, SMC, fibroblasto, ácido ascórbico. (células exclusivamente humanas)	Resistencia a la ruptura de 2000 mm Hg comparable a los vasos sanguíneos.	[28]
1999	Niklason	*in vitro* e *in vivo*/ CE, SMC, PGA (células de bovino)	La resistencia a la ruptura fue de 2150 ± 709 mm Hg similar al de la vena safena.	[29]

En 1985, Weinberg y Bell [24] desarrollaron un modelo *in vitro* que consta de CE de la aorta de bovino, SMC, fibroblastos y de una malla de Dacron que sirve como un soporte mecánico. Los resultados del modelo construido con dos mallas alcanzó una resistencia a la ruptura de 120 a 180 mm Hg, mientras que con una malla alcanzaron 40-70 mm Hg aunque sin malla tuvo un valor menor a 10 mm Hg. También se encontró que las CE produjeron prostaciclina que es un potente inhibidor de la adhesión plaquetaria y un preventivo de trombosis *in vivo*. Este modelo *in vitro* demostró tener características similares a las arterias humanas y ser apropiado para estudiar las interacciones entre las células vasculares. Por lo tanto, este trabajo es considerado como pionero ya que inspiró a trabajos posteriores.

En 1993, L´Heureux y colegas [25], desarrollaron un modelo de bajo calibre exclusivamente con células humanas tales como CE, SMC, fibroblastos y colágeno tipo I (46 %) y III (54 %) en un intento de respetar la naturaleza de las arterias humanas. Este trabajo intentó determinar el comportamiento e interacciones *in vitro* de diferentes células humanas, y los resultados mostraron que las SMC crecieron en dirección circular y desarrollaron una compleja red tridimensional, mientras que los fibroblastos crecieron aleatoriamente, aunque si se observó una capa homogénea de endotelio en el lumen del modelo. Este modelo presentó varias características fenotípicas de las células vasculares *in vivo* y a su vez podría ser útil en el estudio que conduzca a la determinación de la formación de la placa ateroesclerótica.

En 1997, Niklason [26] utilizó poliésteres biodegradables como ácido poliglicólico (PGA) y PGA copolimerizado con ácido láctico (PLA) conocido como (PLGA), los cuales fueron cultivados bajo condiciones estáticas con CE de la aorta de bovino y SMC. Los resultados mostraron que las películas de PGA cultivado con SMC tuvieron una similitud con los tejidos naturales, pero tubos hechos con películas de PGA presentaron una pobre resistencia. Para mejorar los resultados del constructo polímero/célula se aplicaron fuerzas pulsátiles durante el cultivo lo

más cercano a las condiciones *in vivo*. Para ello se utilizaron andamios tubulares de PGA sobre el cual se cultivó SMC y en su interior se revistió con una película de PLGA en donde se cultivaron CE; los resultados mostraron que la fuerza física es mejor que los obtenidos bajo condiciones estáticas.

Para 1998 Shinoka y colaboradores [27] determinaron la viabilidad de injertos vasculares formados de poliglactina/PGA (20 mm de longitud y 15 mm de diámetro) como sustitutos de la arteria pulmonar (AP), los cuales fueron cultivados con células de la arteria carótida de cerdos y con células de la vena yugular de corderos. Después de 7 días de cultivo *in vitro* estos injertos vasculares fueron utilizados para substituir 2 cm de AP en corderos, los cuales posteriormente fueron sacrificados y entonces fue retirado el injerto vascular. Los resultados mostraron que no hubo formación de trombos, aunque si hubo un incremento en el diámetro y se encontró que después de 2 semanas de implantación el PGA casi había desaparecido por completo.

En 1998 nuevamente L´Heureux y colegas [28] presentaron un novedoso enfoque para la elaboración de substitutos vasculares basado exclusivamente en el cultivo de células humanas. SMC cultivadas en ácido ascórbico produjeron una hoja cohesiva de células, donde esta hoja fue colocada alrededor del soporte tubular para producir la túnica media del vaso. Una hoja similar de fibroblastos humanos se colocó alrededor de la túnica media para producir la adventicia. Después el soporte tubular se removió y las células endoteliales fueron cultivadas en el lumen. Los resultados revelaron que esta estructura completa tiene una resistencia a la ruptura por encima de 2000 mm Hg que es comparable a los vasos sanguíneos humanos. Estos resultados sugieren que esta técnica reúne los requisitos fundamentales para producir injertos vasculares completamente biológicos.

En 1999 Niklason y colaboradores [29] determinaron que un injerto vascular biológico debe ser capaz de poseer una capa de CE, SMC, para obtener una

suficiente integridad mecánica y un módulo elástico apropiado. En 8 semanas se cultivaron bajo condiciones pulsátiles SMC de la aorta de bovino que fueron depositadas sobre PGA cuya superficie fue modificada con hidróxido de sodio para incrementar la: hidrofilicidad, la absorción de las proteínas del suero y mejorar la fijación de las SMC y posteriormente se depositaron en el lumen CE de la aorta de bovino bajo flujo pulsátil. Para mejorar las propiedades fueron suplementados con aminoácidos y los resultados mostraron que la resistencia a la ruptura fue de 2150 ± 709 mm Hg. En este estudio, se observó que el espesor de la pared fue de 0.038 ± 0.004 cm similar al de los vasos nativos y la resistencia a la sutura fue de 91 ± 26 g.

1.7.2 Injertos vasculares sintéticos

En la lucha por encontrar el injerto vascular sintético ideal se han desarrollado una gran cantidad de trabajos. En 1954, Blakemore y Voorhess [6] fueron los primeros en reportar el tratamiento de 10 pacientes los cuales recibieron un injerto vascular sintético fabricado de fibras Vinyon N en un intento de reproducir la estructura anatómica de las arterias pero a pesar de los resultados clínicos prometedores el Vinyon N no mostró una buena bioestabilidad a largo plazo.

Actualmente el ePTFE y el Dacron son los materiales sintéticos comúnmente empleados como injertos vasculares sintéticos. En 1958, los primeros injertos vasculares de Dacron fueron implantados por Julian en 1957 y DeBakey [6]. Estos injertos de tejido o de punto incorporan un acabado de terciopelo que orientan los loops perpendicularmente a la superficie del tejido para incrementa el área superficial disponible y mejora el anclaje de las células que promueven la integración del tejido. Como una alternativa para incrementar su flexibilidad y elasticidad son rizadas longitudinalmente. Sin embargo, esta característica se pierde rápidamente después de la implantación como consecuencia del crecimiento del tejido. Anillos protésicos o bobinas se aplican en la superficie externa de los injertos como apoyo externo para resistir torceduras y posibles

compresiones mecánicas. El Dacron tiene una buena estabilidad y puede resistir durante más de 10 años después de su implantación sin deterioro significativo. Sin embargo, los injertos de Dacron han sido propensos a dilatarse una vez implantadas en el medio ambiente arterial.

El PTFE fue patentado por DuPont en 1937 como Teflón, y debido a que es relativamente inerte se consideró como un aislante eléctrico ideal. Su uso médico se inició con la aplicación en las válvulas del corazón artificial en la década de 1960. En 1969 Gore patentó el ePTFE como Gore-Tex que es un material usado en los injertos vasculares, siendo este polímero un material micro-poroso lo cual favorece la firme adhesión del tejido. La molécula de ePTFE es bioestable, y además su superficie es electronegativa con lo cual minimiza su reacción con los componentes sanguíneos. Varias modificaciones se han propuesto para mejorar el desempeño del Teflón expandido, como por ejemplo, Nishibe y colegas [30] encontraron en un modelo de aorta implantado en perros que los enlaces de fibronectina mejoran la cicatrización de los injertos de ePTFE con una alta porosidad. Por otra parte Li y colegas [31] estudiaron que por medio de una secuencia de adhesión de péptidos como el P15 que se encuentra en el colágeno tipo I incrementaron la adhesión de células endoteliales en los ePTFE. En la Figura 1.9 se sugieren que los vasos sanguíneos de 12 a 30 mm de diámetro se deben substituir por injertos de Dacron, y que para 5 a 11 mm se debe utilizar Dacron, ePTFE o materiales biológicos. Sin embargo, debido a que la formación de trombos se produce fácilmente en los injertos sintéticos comúnmente empleados en diámetros inferiores a 6 mm, éstos no son empleados [11]. Finalmente, ambos polímeros (Dacron y ePTFE) son considerados materiales rígidos y consecuentemente tienden a formar trombos, a dificultar la fijación de las células en sus superficies, a una pobre complianza lo que conlleva a un excesivo esfuerzo en las líneas de sutura, engrosamiento de la íntima [32], entre otras desventajas.

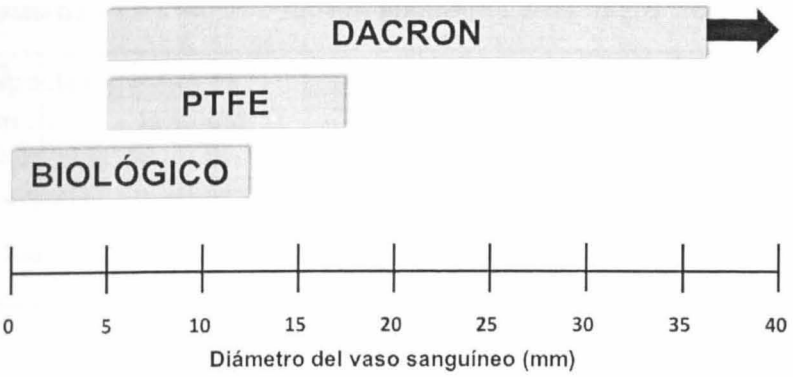

Figura 1.9 Sugerencia para reemplazar vasos sanguíneos [11].

El desafío de crear el substituto ideal de un vaso sanguíneo es muy grande, es por ello que los modelos *in vitro*, *in vivo* y materiales sintéticos empleados como substitutos vasculares representa un importante avance en la medicina del siglo XX ya que proporcionan nuevos conocimientos sobre la compleja interacción de los procesos celulares, bioquímicos y biomecánicos que conducen al fracaso o éxito del injerto, aunque una solución duradera para injertos de bajo calibre sigue siendo difícil de alcanzar. Por otra parte, gracias a la colaboración continua entre cirujanos, biólogos, científicos en materiales e ingenieros biomédicos las barreras existentes en la elaboración de un substituto arterial sin lugar a dudas se romperán. En la Tabla 1.4 se muestra algunos de los injertos vasculares sintéticos y stent (como soporte) que son utilizados actualmente [11].

Tabla 1.4 Injertos vasculares sintéticos aprobados para su uso en USA [11].

Dispositivo	Fabricante	Material	Diámetro disponible (mm)
Exclude© (stent)	W.L. Gore & Associates, Inc. (Flagstaff,AZ)	ePTFE con Nitinol	19-29
Strectch© (injerto vascular)		ePTFE	4-10
Propaten© (injerto vascular)		ePTFE con heparina	5-8
Lifespan (injerto vascular)	Edwards Lifesciences LLC (Irvine, CA)	ePTFE	6-10
Ultramax™ (injerto vascular)	Atrium Medical Corp. (Hudson, NH)	Gelatina-impregnada	6-24
Avanta™ (injerto vascular)		Dacron	4-10
Flixene™ (injerto vascular)		PTFE	6-8
Zenit Flex© (injerto vascular)	Cook Medical, Inc (Bloomington, IN)	PTFE con acero inoxidable	22-36
Talent© (injerto vascular)	Metronic, Inc. (Santa Rosa, CA)	PET con Nitinol	22-36
Flair© (injerto vascular)	Bard Peripheral Vascula, Inc (Temple, AZ)	ePTFE con Nitinol	22-36
Debakey© (injerto vascular)		PET tejido	5-35
Dynaflo© (injerto vascular)		ePTFE con carbón impregnado	7-8

1.9 Poliuretanos

1.9.1 Aspectos generales

Los poliuretanos (PUs) han sido a lo largo de la historia uno de los materiales elastómericos más importantes. Fueron descubiertos en 1930 e introducido en el campo de los biomateriales en 1960 [33]. Debido a su resistencia mecánica y a sus propiedades elastoméricas, han llegado a ser uno de los más importantes materiales sintéticos con aplicaciones biomédicas hoy en día. Desde 1990 han sido ampliamente investigados y desarrollados para convertirse en biomateriales biocompatibles y biodegradables [34]. Se caracterizan por su grupo uretano en la cadena principal (-NHCOO-) y aunque sólo constituye un pequeño porcentaje de los grupos funcionales comprendidos, éste le confieren las propiedades mecánicas y anti trombogénicas que han conducido a sus aplicaciones en la regeneración cardiovascular [8].

1.9.2 Síntesis de poliuretanos segmentados

La síntesis de los poliuretanos segmentados incluye la reacción entre un poliol considerado como segmento flexible o suave, un diisocianato y un extensor de cadena, donde estos últimos forman el segmento rígido o duro [8] (ver Figura 1.10) [12, 35]. Por tal motivo, también son llamados poliuretanos en bloque o segmentados y son sintetizados en dos pasos.

Paso 1: Involucra la síntesis de un pre polímero a partir de: Un diisocianato y un poliol que puede ser poliéter o poliéster y un catalizador como octoato de estaño. Dicho pre polímero es terminado en isocianato.

Paso 2: En esta etapa, el pre polímero se hace reaccionar con un grupo hidroxi o amina del extensor de cadena, para obtener el PU final.

Con la variación de los segmentos (rígidos y suaves), los PUs pueden exhibir diversas propiedades fisicoquímicas, buena resistencia mecánica y buena compatibilidad con la sangre y tejidos [5].

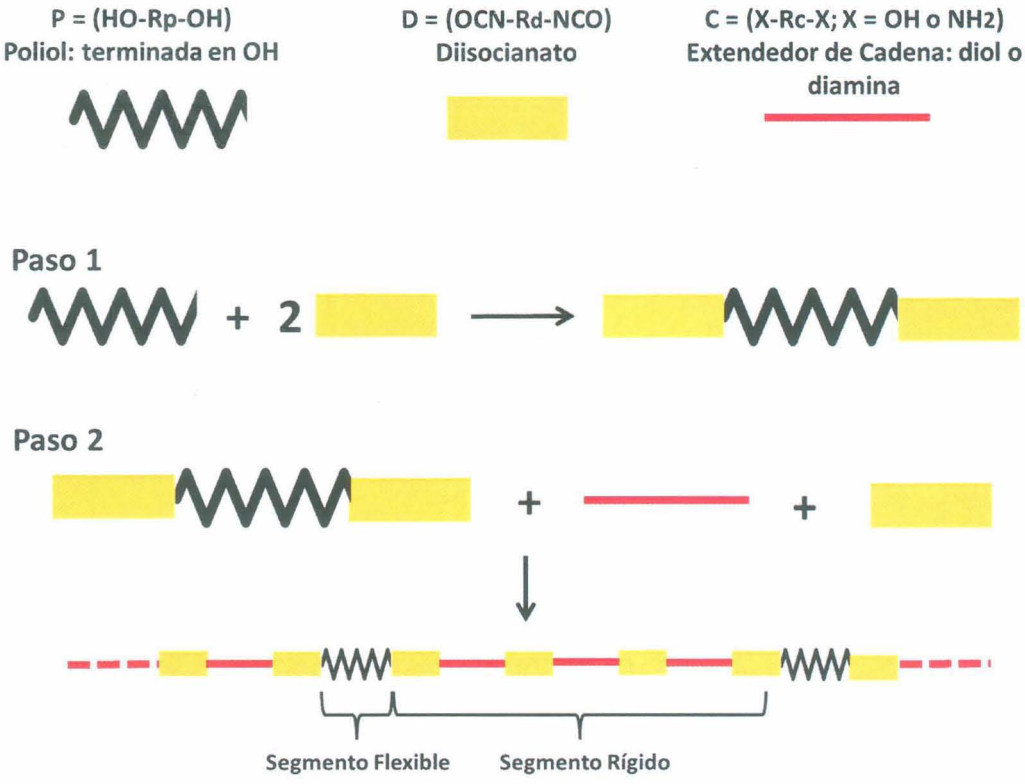

Figura 1.10 Esquema general de la síntesis de un PUs segmentado [35].

Algunos de los polioles, diisocianatos, y extensores de cadena más comunes utilizados en la elaboración de PUs se muestran en la Tabla 1.5 [37].

Tabla 1.5 Principales reactivos empleados para la síntesis de PUs [37].

Función	Nombre químico (abreviación)
Diisocianato	diisocianato de 1,4 Butano (BDI)
Diisocianato	diisocianato de éster de lisina (LDI)
Diisocianato	diisocianato de 1,6 Hexametileno (HDI)
Diisocianato	diisocianato de 4,4 difenilmetano (MDI)
Diisocianato	4,4-metilen-bis-ciclohexil (HMDI)
Poliol	Policaprolactona (PCL)
Poliol	Poli (óxido de etileno) (PEO)
Poliol	Poli (óxido de propileno) (PPO)
Poliol	Poli (carbonato de trimetileno) (PTMC)
Extensor de cadena	Lisina etil éster (Lys)
Extensor de cadena	1,4-ciclohexanodimetanol L-fenilalanina diéster (Phe)
Extensor de cadena	Putrescina (P)
Extensor de cadena	Ala-Ala-Lys (AAK)
Extensor de cadena	1,3-diaminopropano (1,3-DAP)
Extensor de cadena	Butanodiol (BDO)
Extensor de cadena	2,2 (metilimino) dietanol (MIDE)
Extensor de cadena	Sacarina (isosorbida) diol
Extensor de cadena	2-hidroxietil-2 hidroxipropanoato (LAEG)
Extensor de cadena	Etilen glicol (EG)
Extensor de cadena	L-Lisina (K)
Extensor de cadena	L-Arginina (R)

1.9.3 Segmentos flexibles biodegradables

La PCL es comúnmente empleada en la síntesis de PUs como segmento flexible [37]. Algunas de sus propiedades se encuentran en la Tabla 1.6 [8, 37].

Tabla 1.6 Algunas propiedades físicas y mecánicas de la PCL [8, 37].

Temperatura de fusión	55 - 60°C
Temperatura de descomposición	350°C
Transición vítrea	-54°C
Resistencia a la tensión	23 MPa
Elongación a la ruptura	~4700%
Estado físico	Semicristalino
Mecanismo de degradación	Hidrolítica y enzimática

La PCL es un poliéster utilizado para la regeneración de hueso, ligamentos, cartílago, piel, nervios y tejidos vasculares [38]. Se degrada mucho más lenta que el PLA y es por lo tanto adecuado para desarrollar sistemas implantables para la liberación de fármacos a largo plazo [35]. La PCL se puede degradar tanto en masa como por erosión de la superficie siendo el ácido 5-hidroxi hexanoico (ácido caproico) el producto de la degradación [8]. Los productos de la degradación de la PCL pueden ser metabolizados por medio del ciclo de Krebs o eliminados directamente por secreción renal por lo tanto es considerada como no tóxica y compatible [8]. Se distinguen dos etapas o fases en la degradación de la PCL: la primera consiste en la hidrólisis aleatoria lo cual trae una escisión de la cadena, en la segunda fase los fragmentos de bajo peso y pequeñas partículas del polímero son llevadas lejos del sitio de la implantación por su solubilización en los fluidos del cuerpo o por la fagocitosis.

Otra característica importante de la PCL es su cristalinidad la cual decrece con el incremento del peso molecular del polímero; si el peso de polímero es de 5 000 g/mol su cristalinidad es de 80 % mientras que para 60,000 g/mol su cristalinidad es de 45 % [39]. Otra propiedad interesante incluye su tendencia a formar mezclas con un amplio número de polímeros, además de poder ser *co-*

polimerizada con numerosos monómeros como el óxido de etileno, cloropreno, estireno, metacrilato de metilo y acetato de vinilo.

Su biocompatibilidad y toxicidad de la PCL ha sido probada en un anticonceptivo llamado Capronor™ que se encuentra dentro de una cápsula de PCL. A los 90 días en un estudio preliminar en ratas hembras y cobayos no se observaron efectos de toxicidad. La ausencia de una respuesta inflamatoria fue confirmada por implantes de esponjas de alcohol de polivinilo (PVA) impregnadas con polvo PCL en ratas; mientras que en un ensayo de Ames para evaluar el potencial mutagénico de la PCL el resultado fue negativo [39]. De igual manera la biocompatibilidad de la PCL ha sido estudiada en modelos de conejos y ratas.

1.9.4 Segmentos rígidos biodegradables

La síntesis de PUs biodegradables se caracteriza por la incorporación de disiocianatos alifáticos, para evitar la posible liberación de productos tóxicos de degradación [40] (ver Tabla 1.5), ya que comúnmente los PUs son sintetizados a base de disiocianatos aromáticos (MDI o TDI) cuyos productos de degradación son tóxicos. Los segmentos rígidos basados en BDI puede ser una alternativa no tóxica ya que su producto de desecho es la 1,4-butanodiamina que es una diamina no tóxica y entre otras funciones, fundamental para el crecimiento y la diferenciación celular [41].

1.9.5 Propiedades mecánicas de los poliuretanos segmentados

Los segmentos rígidos se entrecruzan entre sí de manera física para formar aglomeraciones que actúan como rellenos mejorando la resistencia mecánica del material. Por otra parte, los segmentos flexibles permanecen libres y con un arreglo aleatorio, (ver Figura 1.11 (a)). Bajo esfuerzos a tensión de 150 %, los segmentos flexibles (poliéter o poliéster) se alinean a lo largo del eje de la elongación, luego los segmentos flexibles se aproximan conduciendo a un estado más cristalino y este proceso se completa cuando la elongación alcanza

aproximadamente 250%, (ver Figura 1.11 (b)). Cuando la elongación se incrementa aún más (aproximadamente 500%) los entrecruzamientos químicos de los segmentos rígidos se rompen y ahora se alinean a lo largo del eje vertical, en este punto los segmentos flexibles se relajan debido al estiramiento del segmento rígido, (ver Figura 1.11 (c)). Los PUs presentan un comportamiento elástico a bajos esfuerzos y comienza a ser plástica cuando los segmentos rígidos se rompen. A mayor contenido de segmentos rígidos se tiene una mayor deformación plástica y a bajas concentraciones de segmentos rígidos el comportamiento elástico será mayor [39]. Las muestras deformadas no retornan inmediatamente a su forma original cuando el esfuerzo ha sido removido, sin embargo, el re-arreglo de los segmentos rígidos eventualmente resulta en un retorno total o parcial a su forma original dependiendo de la estructura del elastómero. Por otra parte, las propiedades químicas también dependen de la relación de los segmentos rígidos y flexibles; una gran proporción de segmentos rígidos hace que el material tenga una mejor resistencia pero decrece su elasticidad y su resistencia a la abrasión. La presencia de grandes segmentos flexibles ya sean del tipo poliéter o poliésteres provee una alta deformación antes de la ruptura pero hace al material más sensible a la oxidación y degradación por fluidos biológicos y a su falla bajo esfuerzos repetidos [39].

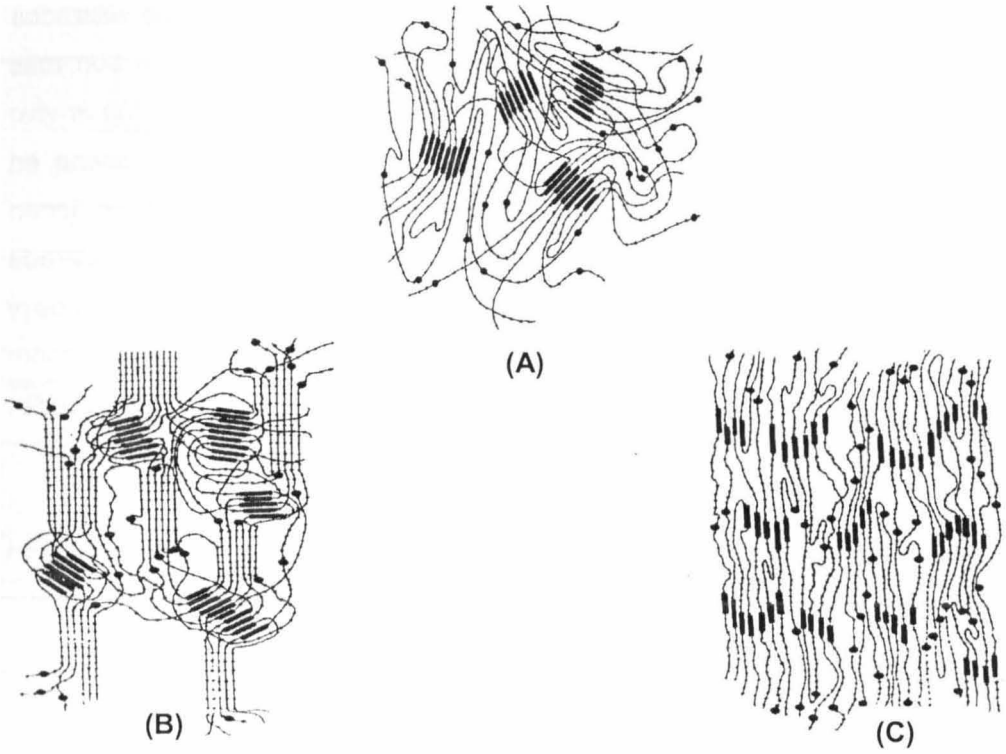

Figura 1.11 Comportamiento mecánico (A) Segmentos flexibles y rígidos antes de aplicarse un esfuerzo tensión; (B) alineación de los segmentos flexibles a bajos esfuerzos; (C) alineación de los segmentos rígidos a altos esfuerzos [39].

1.9.6 Biodegradabilidad de los poliuretanos segmentados

El uso de polímeros biodegradables es beneficioso ya que pueden ser degradados sin dejar materiales extraños y ser eliminados por el cuerpo una vez que su misión se ha completado. Por ello, un gran número de polímeros biodegradables se han estudiado para diversas aplicaciones biomédicas [42]. La biodegradabilidad de los PUs puede ser derivada por la selección de los segmentos rígidos y flexibles y el contenido entre ellos. Típicamente los segmentos flexibles son usados para modular la degradación de los PUs ya que, incrementando su longitud y su hidrofilicidad se incrementa la degradación del

polímero [37]. Por ejemplo, los PUs basados en poliéter (PEEU) son utilizados predominantemente como segmentos suaves, ya que hidrolíticamente son más estables que los basados en poliéster [19]. Por otra parte, la degradación *in vivo* de los PUs procede principalmente de la escisión hidrolítica de la cadena en grupos éster y uretano, mientras que las reacciones oxidativas siempre tienen lugar en los segmentos de poliéter. Además, la degradación puede ser acelerada por la acción de enzimas celulares, peróxidos, catálisis por iones metálicos y grupos carboxílicos formados, calcificación y acción de esfuerzos repetitivos sobre los implantes entre otros [8]. En Tabla 1.7 se presentan las propiedades mecánicas de algunos PUs así como su biodegradabilidad [37].

Tabla 1.7 Propiedades mecánicas y degradación de algunos PUs [37].

PUs	E (MPa)	σ (MPa)	ε (%)	Tiempo de degradación, masa perdida
PCL/BDI/Lys	14-38	9.2-13	841-895	56 d, 30-60%
PCL/BDI/P	54-78	25-29	600-686	56d, ~ 5%
PEO-co-PCl/BDI/P	4.6-75	8-20	325-560	56d, 10-30%
PEO-co-PCl/BDI/AAK	-	15-20	670-890	56d, 12-17% 56d, 18-35%
PCL/BDI/AAK	-	28	830	56d, ~11% 56d, ~26%
PEO-co-PTMC/BDI/P	3.5	1.8	53	42d, 32%
PPO-co-PEO-co-PTMC/BDI/P	5.5-7.4	8.1-17.9	363-711	42d, 2-6%
PCL/LDI/Phe	6.6-81.9	12.5-30.8	618-682	28d, 2-8% 28d, 0.7-3%
PEO-co-PCL/LDI/Phe	49-105	6-26	510-726	14d, 5-25%
PCL/MDI/BD	-	63.8	797	20d, 16%
PCL/MDI/MIDE	-	40.9	756	20d, 58%
PEO-co-PCL/HDI/BD	30.8	3.64	>500	-
PCL/LDI/LAEG	2.09-4.3	1.05-3.55	979-1,165	365d, ~25-80%
PCL/LDI/EG	4.2-11.2	1.02-4.74	263-1,519	365d, ~0-6.6%
PCL/HDI/LAEG	17.04	6.2	923	365d, ~4%
PCL/HDI/EG	21.12	29.0	1084	365d, 0%

1.9.7 Poliuretanos segmentados en el campo médico

Los PUs se utilizan en una gran variedad de dispositivos médicos que están en contacto con la sangre incluyendo dispositivos de soporte circulatorio, injertos vasculares, válvulas para el corazón, tuberías médicas, cortinas quirúrgicas,

apósitos para heridas. Sin embargo, su uso más común se encuentra a corto plazo en los implantes [35, 42]. Uno de los primeros PEEU fue comercializado bajo el nombre de Mitrathane® por la compañía Mitral quien tuvo un pobre desempeño. Los estudios histológicos confirmaron que la oclusión en los injertos basados en Miltrathane® fue aguda y atribuida a una variedad de factores incluyendo un agarre deficiente en el sitio anastomótico. Otra compañía como Newstec Vascular Products (Reino Unido) desarrolló un PEEU llamado Pulse-Tec® mientras que en el laboratorio Thoratec (U.S.A.) se presentaba el injerto Vectra®. Pulse-Tec® desapareció muy temprano por razones no del todo claras, mientras que Vectra® fue aprobado por la administración de alimentos y medicinas (FDA, por sus siglas en inglés) en el 2000 pero sólo para su uso vascular durante la hemodiálisis que es una aplicación a corto plazo [19]. En los PUs basados en poliéster (PEU) los ensayos iniciales en animales eran muy alentadores, pero la inestabilidad hidrolítica demostró ser un inconveniente. Versiones de poli (éster-uretanos) como el Estane® demostraron ser inestables a la hidrólisis o al ataque enzimático o a ambos y por ello no han sido utilizados más allá que en modelos de animales [19]. Los PUs a base de policarbonatos (PCUs) fueron desarrollados para resolver los problemas de inestabilidad que presentan los PEU y los PEEU, y la primera patente fue otorgada a L. Pinchuk de Corporación Corvita en 1992, y el primer prototipo fue llamado Vascugraft®. Sin embargo, Zhang descubrió que Vascugraft® no contenía segmentos suaves de policarbonato y con lo cual se detuvo el desarrollo de Vascugraft® después de decepcionantes resultados clínicos en un estudio de 15 pacientes [19]. Otros poliuretanos comerciales en aplicaciones médicas son Biomer®, Surethane®, Pellethane®, Corplex®, Toyobo TM5®, Tecoflex HR® y Cardiothane-51® [5].

1.10 Estado del arte

A continuación se presentan los trabajos que se han llevado a cabo en lucha por encontrar un injerto vascular, y en la Tabla 1.8 se presenta el resumen del estado del arte.

Tabla 1.8 Resumen del estado del arte en el desarrollo de injertos vasculares sintéticos a base de PUs.

Año	Autor	Scaffold (materiales/ método)	Aportación	Referencia
1999	Jeschke	PCU/ Inversión de fase	Decrece el espesor de la íntima y tiene una menor proliferación de la íntima	[44]
2003	Seifalian	Poli (carbonato-urea)uretano/ Extrusión	No existe diferencia de la complianza después de 36 meses de implantación	[45]
2008	Zhang	PLGA-PU-PLGA/ depósito alrededor de una varilla	La complianza, resistencia a la explosión y la sutura aumentan al incrementar el espesor	[46]
2009	Han	PUs, a base de: PCL, LDI y BDO/ Electrospinning	La pérdida de masa decrece al incrementa el contenido de PCL	[7]
2010	Yeganegi	PCU/ Electrospinning	Los productos de degradación son no tóxicos a células de anillo fibroso de bovino (AF)	[47]
2011	Wang	PUs-heparina-gelatina/ Electrospinning	Propiedades mecánicas similares a las arterias. Supresión significativa de la adhesión de plaquetas	[48]
2012	Xiao	PET-PUs/ Electrospinning	Modificación de las propiedades mecánicas en función del contenido de PU	[49]
2012	Wang	PUs-PEGMA/ Electrospinning	Biocompatibles y favorable para la fijación de las células HUVECs	[50]

En 1999 Jeschke y colaboradores [44] determinaron que los injertos de poli (uretano carbonato) (PCU) construidos por medio de la técnica de inversión de fase eran resistentes a la biodegradación, proporcionaban una mejor biocompatibilidad en términos de un rápida endotelización y disminución de la proliferación crónica de las células de la íntima en comparación con el ePTFE. A 4 semanas *post* implantación en la posición de la aorta abdominal en ratas se desarrolló una completa endotelización en el lumen del PCU mientras que para el ePTFE fue de 24 semanas, a los 56 días y 6 meses *post* implantación los PCU mostraron una menor proliferación celular neoíntima en comparación a ePTFE, y finalmente el espesor de la neoíntima fue menor en el PCU que en el ePTFE.

En el 2003 Seifalian y colaboradores [45] desarrollaron un poli (carbonato urea) uretano llamado *Myolink* por medio de extrusión, y lo colocaron en la posición de la arteria aorta e ilíaca en perros. El *Myolink* demostró favorecer el crecimiento de una capa íntima a 36 meses *post* implantación, el cambio de la complianza antes y después de la implantación fue de 6 % mientras que en injertos de ePTFE y Dacron fue de 14 % y 29 %.

En el 2008, Zhang y colaboradores [46] desarrollaron un injerto a base de PLGA/PUs/PLGA (6 mm de diámetro y 4 mm de longitud). Células estromales de médula ósea de perros fueron cultivadas sobre el lumen del injerto los cuales fueron rotados para favorecer una distribución uniforme de las células, y posteriormente fueron colocados en la aorta abdominal de perros. Los resultados mecánicos revelaron que la complianza, resistencia a la explosión y a la sutura aumentaron con forme se incrementaba el espesor del injerto. Después de 6 semanas los injertos fueron retirados y se observó la formación del *vaso vasorum*.

Para el 2009, Han y colaboradores [7] realizaron un injerto vascular de PUs no tóxico biodegradable por medio de electrospinning a base de PCL como poliol, LDI como diisocianato y BDO como extensor de cadena. La caracterización térmica mostró una temperatura de transición vítrea (T_g) asignada a la PCL de - 60°C, y la

caracterización mecánica reveló que la resistencia a la tensión y a la elongación se incrementaba con el aumento del contenido del segmento rígido, existiendo un máximo de resistencia a la tensión de 23 MPa y una máxima elongación de 1700 % para una combinación de PCL/BDO/LDI de 0.5/0.5/1.15. La pérdida de masa por degradación hidrolítica disminuyó conforme se incrementaba el contenido de PCL ya que la PCL es hidrofóbica, mientras que en la degradación enzimática se observó que la pérdida de masa se incrementó con el aumento de la PCL.

En el 2010, Yeganegi y colaboradores [47] desarrollaron un poliuretano policarbonato (PCU) por medio de electrospinning con y sin fibras alineadas, para estudiar su biodegradación. Los resultados demostraron que la biodegradación por medio de colesterol esterasa (una enzima derivada de monocitos) posee una tasa de 0.56 mg ± 0.05 mg por semana, que los productos de la biodegradación resultaron ser no tóxicos a células de anillos fibrosos de bovino y que la resistencia a la tensión y módulo elástico antes de la degradación resultaron ser más altos en las fibras alineadas (σ = 14 ± 1 MPa, E = 46 ± 3 MPa) que en los de fibras no alineadas (σ= 1,9 ± 0,4 MPa, E = 2,1 ± 0,2 MPa).

En el 2011, Wang y colaboradores [48] desarrollaron un injerto vascular bicapa por medio de electrospinning a base de PUs (capa externa) y de fibras de heparina/gelatina (capa interna). Los resultados mostraron que existe una buena adhesión entre las dos capas. Las propiedades mecánicas a tensión del scaffold a base de PUs mostraron un alto esfuerzo a la ruptura (10 ± 1 MPa), una alta elongación (400 ± 20%) y un bajo módulo elástico (0.9 ± 0.01 MPa). Por otra parte los scaffolds de heparina/gelatina mostraron un alto módulo elástico (122 ± 18 MPa), un bajo esfuerzo a la ruptura (2.8 ± 0.2 MPa) y una pequeña elongación a la ruptura (19 ± 3 %). Sin embargo, cuando las fibras de PUs y de heparina/gelatina se entrecruzaron el esfuerzo a la ruptura fue de 3.7±0.1 MPa y la elongación a la ruptura fue de 110 ± 8 % siendo estas últimas propiedades mecánicas similares a la de los vasos sanguíneos. Los resultados de adhesión plaquetaria demostraron en este sistema una supresión significativa de la adhesión de plaquetas [48].

En el 2012, Xiao y colaboradores [49] desarrollaron un nuevo injerto vascular por medio de electrospinning utilizando fibras de PET/PU. Los resultados mostraron que al incrementar el contenido de PUs disminuía la porosidad del injerto, mientras que el tamaño de las fibras del injerto de PU/PET se incrementaba cuando el contenido de PUs es mayor. Las propiedades mecánicas fueron diferentes dependiendo del contenido del PUs. El módulo elástico mostró gradualmente una disminución cuando se incrementaba el contenido de PU, esto es, para un 15 % el módulo elástico fue de 18.77±1.12 MPa mientras que para el 5 % fue de 59.71 ±2.20 MPa. Estas modificaciones en las propiedades mecánicas de los injertos dependiendo del porcentaje en peso del PUs es un gran avance en la lucha por obtener injertos vasculares con propiedades mecánicas similares a las arterias.

En el 2012, Wan y colegas [50] desarrollaron un scaffold por electrospinning a base de PUs y de poli (etilen glicol) con metacrilato (PUs/PEGMA), con el objetivo de que el PEGMA proporcionara una superficie biocompatible. Su biocompatibilidad fue ensayada utilizando células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVECs, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron que cuando el contenido de PEGMA fue de 20% y 30 % p/p, las células se adhirieron significativamente cubriendo más del 40% y 50% del área de los scaffolds (andamios) respectivamente. Los resultados demostraron que los scaffolds son altamente biocompatibles sin efectos tóxicos y que la superficie del material fue favorable para la fijación de HUVECs (ángulo de contacto de 55-75°).

1.11 Aplicaciones de la L-Arginina en injertos vasculares

Recientemente existe un gran interés por la L-Arg debido a su activación anti-plaquetaria y promoción de la hemostasia. A esto se debe añadir que el producto de degradación de la arginina es el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) y que dicha molécula es un importante inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria además de promover el crecimiento de las células endoteliales. Estas

observaciones sugieren que la producción de NO podrían tener un valor terapéutico en la prevención de la ateroesclerosis. Y dado que la producción de NO es dependiente de la disponibilidad de la L-Arg algunos investigadores han planteado la hipótesis de que la suplementación de L-Arg podría tener un papel terapéutico.

En el 2012 Liu y colaboradores [9] realizaron estudios acerca de la modificación superficial en el PET el cual fue modificado con L-Arg con la finalidad de estudiar los efectos de la modificación superficial sobre la hidrofilicidad y la biocompatibilidad por medio de la adhesión de plaquetas, formación de trombos y la adsorción de proteínas. Los resultados de ángulo de contacto revelaron que la hidrofilicidad fue mejorada en las superficies modificadas (PET/L-Arg) en comparación con las superficies sin modificar (PET) siendo el ángulo de contacto de 43.7° y 78.5° respectivamente. En la caracterización de la adhesión plaquetaria se observó una gran cantidad de plaquetas que se adhirieron a la superficie del PET y únicamente unas cuantas plaquetas fueron adheridas en la superficie de PET/L-Arg. De igual manera las superficies modificadas con L-Arg mostraron que disminuía la cantidad de adsorción de proteínas. Por lo tanto los resultados de este trabajo sugieren que una manera eficaz para disminuir la adhesión de plaquetas y formación de trombos es emplear L- Arg.

En 1992 Cooke y colaboradores [51] fueron los primeros en investigar los efectos de la L-Arg en conejos. Los resultados revelaron que el endotelio de los conejos que fueron alimentados con una dieta alta en colesterol tenía un endotelio deteriorado pero el grupo de conejos alimentados con una dieta alta en colesterol más L-arginina mostraron una mejoría en la función endotelial. Este fue el primer estudio que demostró que la suplementación de la L-Arg mejora el funcionamiento del endotelio y reduce la aterogénesis en conejos hipercolesterolémicos.

1.12 HIPÓTESIS

Los poli (uretano-ureas) segmentados pueden ser sintetizados a partir de extensores de cadena como los aminoácidos de L-Arginina y L-Lisina junto con el pre-polímero de policaprolactona diol y 4,4-metilen-bis-ciclohexil diisocianato ya que pueden presentar adecuadas propiedades mecánicas, buena compatibilidad celular en comparación con el poliuretano alifático comercial Tecoflex®, para su potencial aplicación en la regeneración de tejidos especialmente en el campo cardiovascular.

1.13 OBJETIVOS

1.13.1 Objetivo general

Obtener poli (uretano-ureas) segmentados con aminoácidos como extensores de cadena, que posean propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas aceptables para su aplicación potencial en injertos vasculares.

1.13.2 Objetivos específicos

- Sintetizar poli (uretano-ureas) segmentados a partir de policaprolactona diol, 4,4-metilen-bis-ciclohexil diisocianato y aminoácidos como extensor de cadena (L-Arginina y L-Lisina).
- Obtener películas delgadas y con dichas películas elaborar tubos (injertos vasculares) con un diámetro interno menor a 6 mm.
- Realizar caracterizaciones fisicoquímicas, térmicas y superficiales a los poli (uretano-ureas) segmentados obtenidos tanto en forma de película como en geometría tubular (injertos).
- Estudiar el desempeño mecánico en las películas y los tubos de poli (uretano-ureas) segmentados.
- Determinar la biocompatibilidad de los poli (uretano-ureas) segmentados en su geometría de película delgada y de tubo

CAPÍTULO 2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis de los poliuretanos segmentados

El método de síntesis de los poliuretanos segmentados corresponde a una poliadición de 2 etapas. Los materiales utilizados y la metodología empleada para sintetizar los poliuretanos segmentados se describe a continuación:

La primera etapa consiste en la obtención de un pre-polímero a través de la reacción de la poli-ε-caprolactona diol (PCL, Sigma Aldrich, Mn = 2000 g/mol) con un exceso de 4, 4'- metilen bis (ciclohexil isocianato) (HMDI, Sigma Aldrich 90%, Mn = 262.35 g/mol) y con 2-etilhexanoato de estaño como catalizador (Oct-Sn, Sigma Aldrich 95%, Mn = 405.12 g/mol). Brevemente, la PCL (previamente secada a 60 °C bajo presión reducida, por 24 h) se añade al reactor cuando la temperatura del mismo se estabiliza entre 60 y 65 °C. Inmediatamente después, se agregan 5 ml de dimetilformamida como disolvente (DMF, Sigma Aldrich 99.5 %, Mn = 73.09 g/mol), seguidamente se agrega el HMDI y por último se añaden 0.15 % (con respecto al peso total del polímero) de Oct-Sn y se deja reaccionar por 4 h, bajo agitación mecánica (80 rpm). Las estructuras químicas de los reactivos empleados en la primera etapa de la síntesis se muestran en la Figura 2.1.

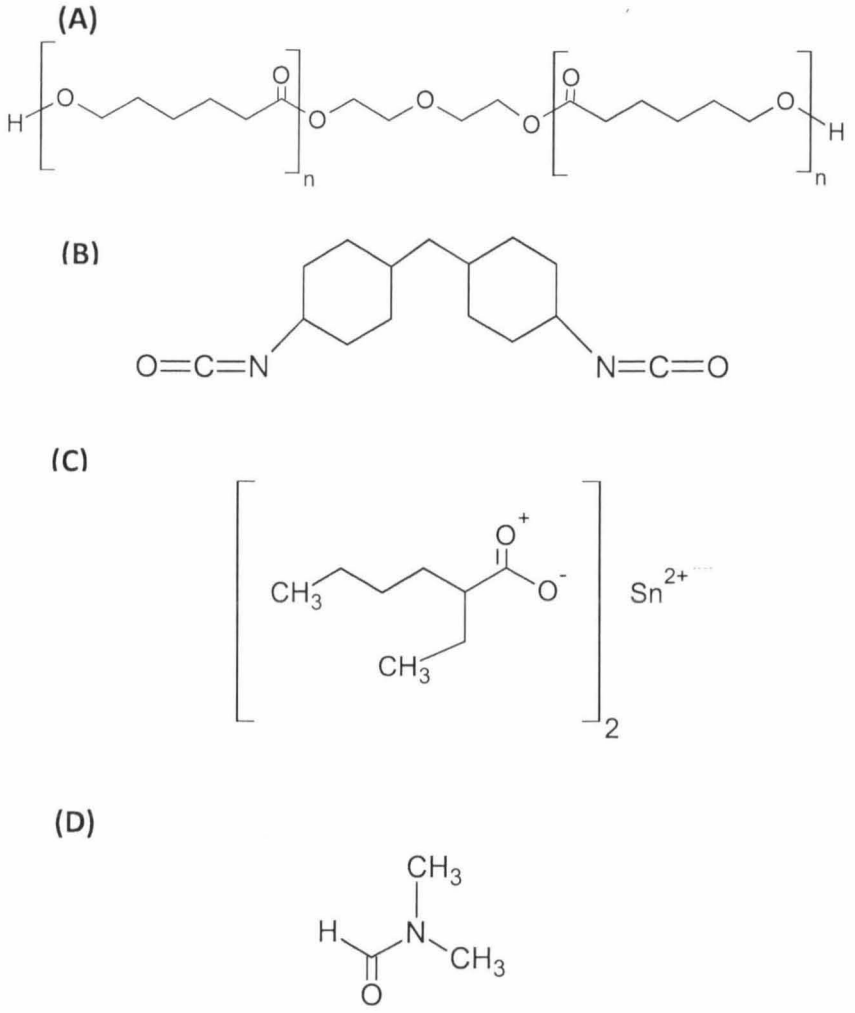

Figura 2.1 Estructuras químicas de: (A) PCL: poli-ε-caprolactona; (B) HMDI: 4, 4'- metilen bis (ciclohexil isocianato); (C) Oct-Sn: 2-etilhexanoato de estaño. (D) DMF: Dimetilformamida.

La segunda etapa consiste en hacer reaccionar el pre-polímero con cantidades equimolares del extensor de cadena, monocloruro de L-Arginina (Sigma Aldrich ≥ 98 %, Mn = 210.66g/mol) o dihidrocloruro de L-Lisina (Sigma Aldrich, ≥ 98%, Mn = 219.11 g/mol), durante 2 h, bajo agitación mecánica (80 rpm). Los extensores de cadena fueron elegidos con base a estudios previos donde se demostró una

buena proliferación de células endoteliales [8]. Es importante mencionar que la relación molar entre la PCL, HMDI y los extensores de cadena en todas las reacciones se mantiene constante siendo de 1:2:1 moles respectivamente. En la Figura 2.2, se presentan las estructuras químicas de los reactivos empleados como extensores de cadenas.

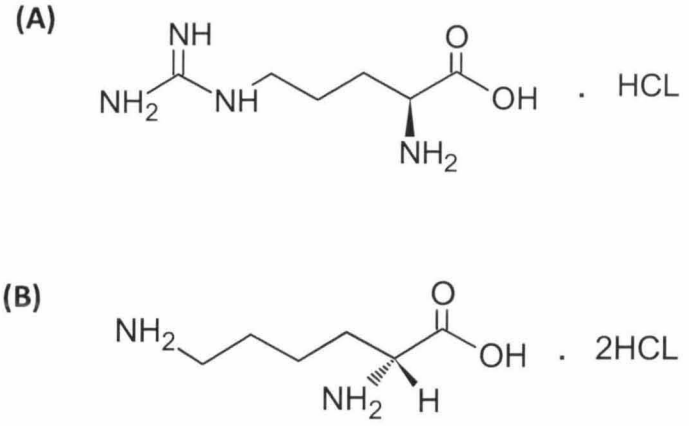

Figura 2.2 Reactivos empleados en la segunda etapa de la síntesis: (A) monocloruro de L-Arginina; (B) dihidrocloruro de L-Lisina.

Todos los reactivos utilizados se colocaron dentro de una caja de guantes y se realizaron varias purgas para evacuar el aire de la misma, por medio de un flujo de nitrógeno (N_2) que se mantiene durante las 6 h de la síntesis, esto con el objeto de mantener una atmósfera inerte y evitar reacciones secundarias como la formación de ureas. En la Figura 2.3, se muestra la caja de guantes, en cuyo interior se ensambla un sistema de calefacción formado por un reóstato y una canasta de calentamiento, así como sistema de agitación mecánica por medio de un Caframo RZR-1. Ambos sistemas de calentamiento y agitación se mantienen en operación durante las dos etapas de la poliadición.

Figura 2.3 Interior de la caja de guantes.

Al cabo de 6 h de síntesis, el PUUS obtenido se precipitó en 500 ml de agua destilada, para posteriormente dejarlo en reposo por 24 h. Finalmente, el PUUS se filtró para eliminar el exceso de agua y residuos de la reacción y se secó en la estufa a 60 °C a presión reducida por 24 h. En la Figura 2.4, se presenta el esquema propuesto para la síntesis de los poliuretanos segmentados.

Como material de referencia se empleó en este trabajo el Tecoflex® SG 80A (Lubrizol Company) que es un poliuretano alifático termoplástico basado en poliéter empleado en aplicaciones cardiovasculares, las propiedades mecánicas del Tecoflex® SG 80A se encuentran en el Anexo 2 [52].

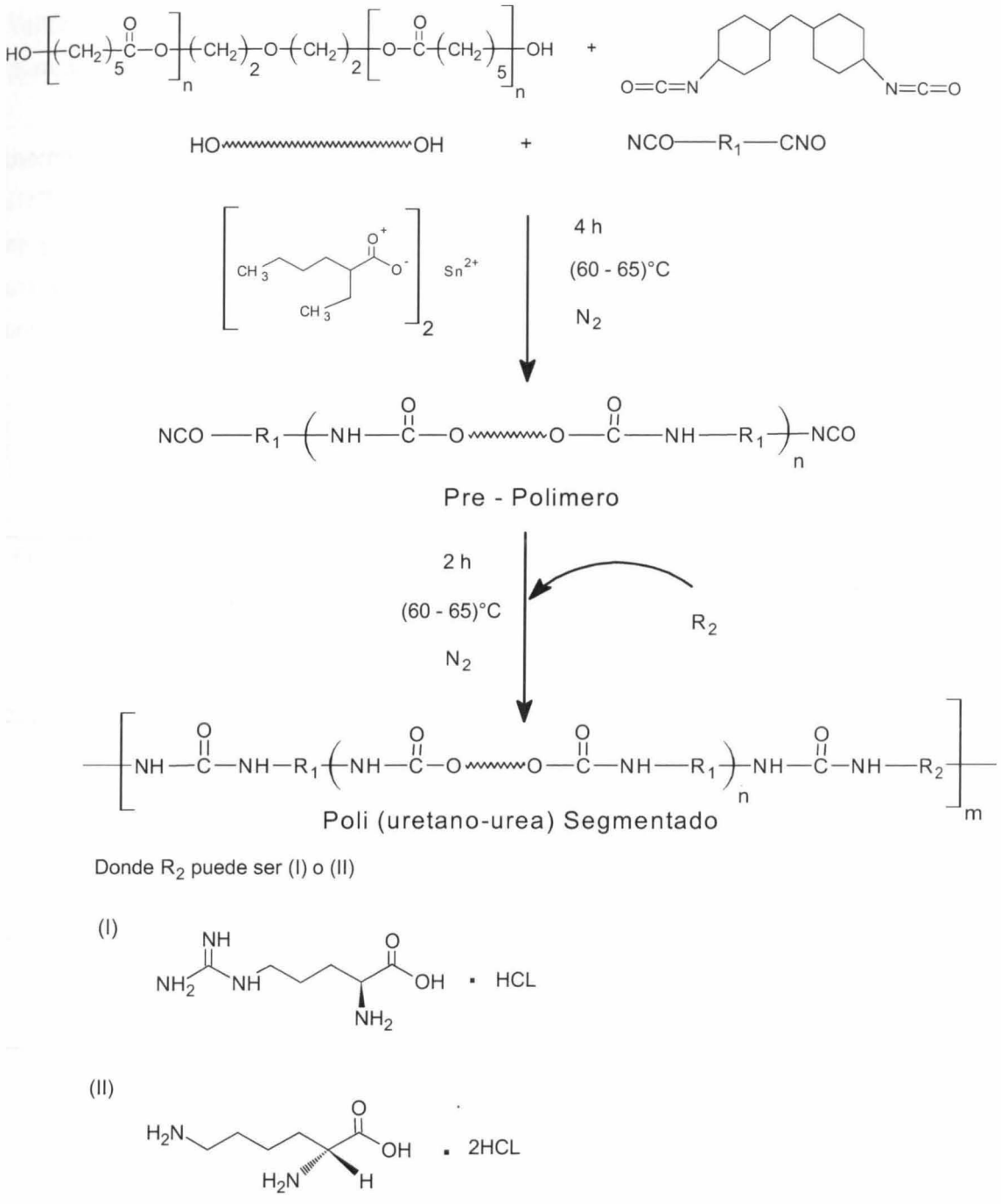

Figura 2.4 Esquema para la obtención de PUUS.

2.2 Elaboración de películas y tubos de poliuretanos segmentados

2.2.1 Películas de PUUS

Para elaborar películas de PUUS se preparó una solución de 2 g del polímero previamente sintetizado en 35-40 ml de Tetrahidrofurano (THF, J.T. Baker). Esta solución es vierte en un molde de Teflón como se muestra en la Figura 2.5, y se deja secar por 24 h a temperatura ambiente. Pasadas las 24 h, se retira cuidadosamente la película del molde y se guarda en un desecador durante una semana para su posterior caracterización.

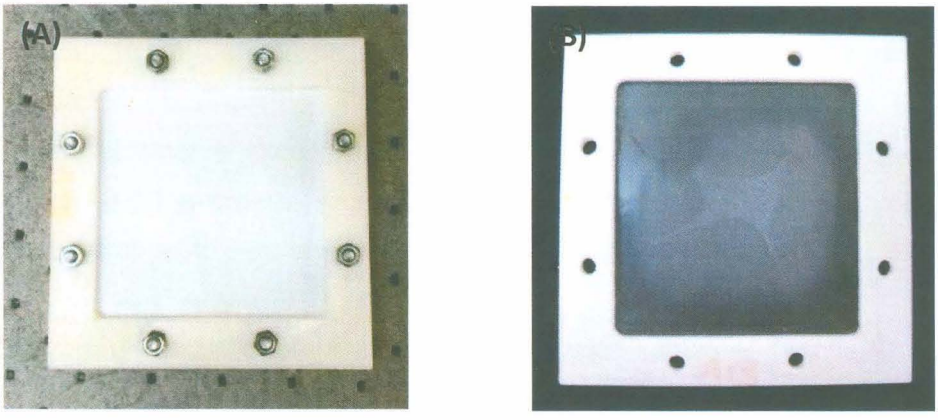

Figura 2.5 (A) Molde de Teflón empleado para la elaboración de películas de PUUS; (B) Película de PUUS después de 24 h de secado.

2.2.2 Fabricación de un tubo de PUUS

Para elaborar un tubo primeramente se retira la película de PUUS del molde de Teflón e inmediatamente se coloca cuidadosamente alrededor de una varilla de Teflón de 5.46 ± 0.06 mm de diámetro y 14 cm de largo y se deja secar durante 24 h a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del THF (Tetrahidrofurano) como se muestra en la Figura 2.6. Finalmente la varilla de

Teflón se retiró cuidadosamente y el tubo de PUUS se almacena en un desecador durante una semana para su posterior caracterización.

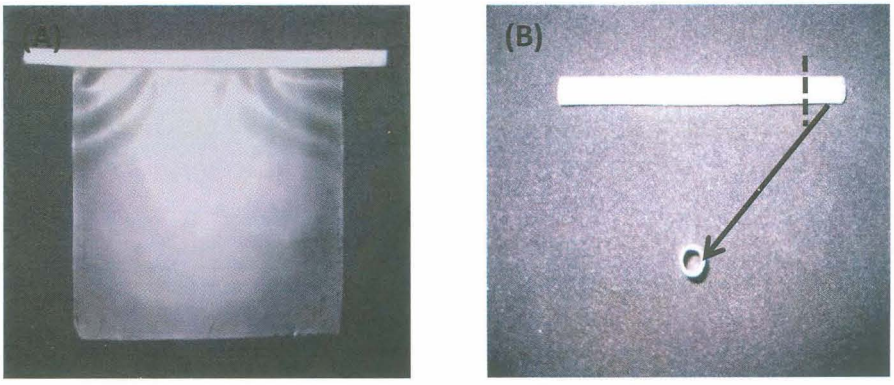

Figura 2.6 (A) Película de PUUS alrededor de la varilla de teflón, (B) Tubo de PUUS recuperado de la varilla, donde se puede observar la sección transversal.

2.3 Caracterización fisicoquímica y superficial

2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La composición de los poliuretanos fue verificada mediante análisis de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). 50 mg del PU obtenido se disolvieron en 1 ml de THF y se depositan sobre una pastilla de KBr de tal manera que se forme una película delgada sobre la superficie de la pastilla. Los FTIR se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Nicolete Protege 460, en el intervalo espectral de (4000-400) cm^{-1}, promediando 100 barridos y con 4 cm^{-1} de resolución.

2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

La temperatura de fusión (Tm) de los poliuretanos se determinó por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), por medio de un

equipo DSC–7 Perkin Elmer. Los termogramas fueron obtenidos de 0 °C a 150°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, 7 mg de muestra encapsulado en charolas de aluminio y bajo atmósfera de nitrógeno. Con esta caracterización también se determinó la cristalinidad relativa (Xc). Mientras que el porcentaje de segmentos rígidos (% SR) y flexibles (% SF), se calcularon a partir de los pesos moleculares de los reactivos empleados y su proporción estequiométrica de acuerdo con la ecuación [53]:

$$\% \, \mathbf{SR} = \frac{\mathbf{nM_{HMDI}+nM_{ex}}}{\mathbf{nM_{HMDI}+nM_{PCL}+nM_{ex}}} \tag{1.1}$$

Dónde: M es el peso molecular del reactivo (g/mol), n el número de moles, HMDI es 4, 4'- metilen bis (ciclohexil isocianato), PCL es Poli-ε-caprolactona diol, ex es el extensor de cadena (L-Arginina o L-Lisina).

Mientras que el porcentaje de cristalinidad relativa (Xc) de la PCL en los PUUS fue determinada a partir de la entalpía de fusión usando la siguiente ecuación [8]:

$$\% \, \mathbf{Xc} = \frac{\Delta H_f}{\mathbf{W_{ss} * \Delta H^\circ_f}} \, \mathbf{x \, 100} \tag{1.2}$$

Dónde: ΔH_f es la entalpía de fusión de la PCL obtenida experimentalmente de los PUU, w_{ss} la fracción en masa del segmento flexible y ΔH°_f la entalpía de PCL 100% cristalina tomada como 136 J/g.

2.3.3 Difracción de rayos X

Con la finalidad de determinar la estructura cristalina de las muestras se empleó difracción de los rayos-X (DRX) de ángulo amplio (WAXS, por sus siglas en inglés). Para ello se empleó un Difractometro Siemmens-5000 con radiación CuKα

(λ = 1.5416 Å), con un paso de 0.04 ° y tiempo de 6 s en un intervalo de 2θ = (5 a 60) grados.

2.3.4 Análisis termogravimétrico

La temperatura de descomposición fue obtenida por medio del análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) utilizando un TGA 7 Perkin-Elmer. Utilizando 7 mg de los PUUS los cuales fueron calentados en un intervalo de 40 a 600 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, bajo atmósfera de nitrógeno.

2.3.5 Microscopia electrónica de barrido

Para estudiar la morfología de los PUUS se empleó la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), con la ayuda de un microscopio Jeol JSM-6360LV, utilizando un voltaje de 5 a 20 KV. Para ello, las muestras fueron recubiertas con oro.

2.3.6 Microscopia de fuerza atómica

Con el objetivo de determinar la rugosidad del material y su topografía se realizó microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), por medio de un microscopio AMBIOS Universal. Utilizando el modo de tapping (dicho método disminuye el daño causado a la superficie en comparación con el modo de contacto), a 1 Hz y utilizando una punta estándar de silicio con diámetro de 50 nm.

2.3.7 Cromatografía de permeación en gel

El peso molecular de un polímero es de primordial importancia en la síntesis y aplicaciones de los mismos [54]. Por lo tanto, los pesos moleculares de los poliuretanos fueron determinados por medio de cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés) usando un equipo Agilent 1100 GPC-SEC equipado con dos columnas acopladas (ZORBAX PSM 60S y ZORBAX PSM

1000S) y un detector de índice de refracción (Agilent Technologies Germany). Se utilizó DMF grado HPLC como la fase móvil con un flujo de 1 ml/min a 50 °C y la curva de calibración fue obtenida con estándares de poliestireno (PS) en el intervalo de 1050 a 420600 g/mol.

2.3.8 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto estático formado entre la superficie de PUUS sintetizados y un líquido fue determinado en un medidor de ángulo de contacto marca Tantec U.S (Patente No. 5268733), utilizando una gota de 10 µl de agua destilada con la ayuda de un micro jeringa marca Hamilton con capacidad de 100 µl.

2.4 Caracterización mecánica

2.4.1 Ensayo a tensión longitudinal

El ensayo a tensión longitudinal se realizó en dos casos diferentes, (ver Figura 2.7), dependiendo de la geometría de la probeta:

Caso 1. Probetas a partir de películas de los materiales sintetizados y Tecoflex® de (15 x 50) mm.

Caso 2: Probetas a partir de segmentos de tubos de los materiales sintetizados y Tecoflex ® de 50 cm de longitud.

El ensayo mecánico a tensión longitudinal, se realizó en una máquina universal Shimatzu AGS-X (Kyoto, Japón), con celda de carga de 1000 N y una velocidad de cabezal de 50 mm/min, de acuerdo a la norma ISO 7198 la cual está dirigida para implantes cardiovasculares sintéticos en el caso de la geometría tubular. Para éste ensayo mecánico, tanto para el caso 1 y caso 2, se determinaron las siguientes propiedades mecánicas: el módulo elástico (E), módulo secante ($E_{\%}$), esfuerzo de cedencia (σ_c), el máximo esfuerzo a la ruptura (σ_{rup}) y la deformación máxima (ε_{max}), las cuales se obtuvieron empleando la norma ASTM D638.

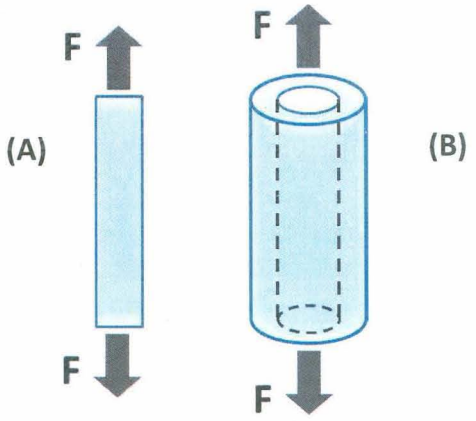

Figura 2.7 Esquema del ensayo a tensión longitudinal en: (A) Caso 1 (película); (B) Caso 2 (en tubo).

2.4.2 Ensayo a tensión circunferencial

Las condiciones del ensayo mecánico a tensión circunferencial se eligieron de acuerdo a la norma ISO 7198, empleando una máquina universal Shimatzu AGS-X (Kyoto, Japón), una celda de carga de 1000 N y una velocidad de cabezal de 50 mm/min. Las propiedades mecánicas determinadas incluyeron el módulo elástico (E), módulo secante ($E_{\%}$), esfuerzo de cedencia (σ_c), el máximo esfuerzo a la ruptura (σ_{rup}) y la deformación máxima (ε_{max}), las cuales se obtuvieron mediante la norma ASTM D638. Brevemente, se utilizó un segmento de 1 cm de longitud de los tubos sintetizados y se aplicó una carga en dirección transversal (ver Figura 2.8.).

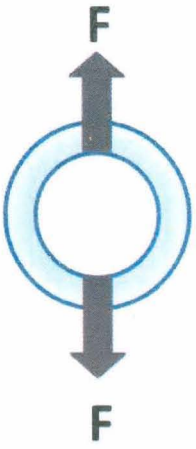

Figura 2.8 Esquema del ensayo a tensión circunferencial.

2.4.3 Resistencia a la sutura

Esta prueba tiene por objetivo determinar la fuerza necesaria para tirar de una sutura quirúrgica a través de la pared de injerto vascular, la sutura debe ser de uso clínico y ser lo suficientemente resistente para poder jalar de ella sin que se rompa. La sutura se inserta a 2 mm del extremo del injerto vascular a ensayar (sin anudar la sutura), luego se tira de la sutura hasta que ésta pasa a través de la pared del material. La resistencia a la sutura se realizó de acuerdo a la norma ISO 7198, utilizando una máquina universal Shimatzu AGS-X (Kyoto, Japón), con una celda de carga de 1000 N, una velocidad de cabezal de 50 mm/min y una sutura de seda multifilamento de 3-0 (Jhonson & Johnson). En la Figura 2.9, se presenta un esquema de dicha prueba.

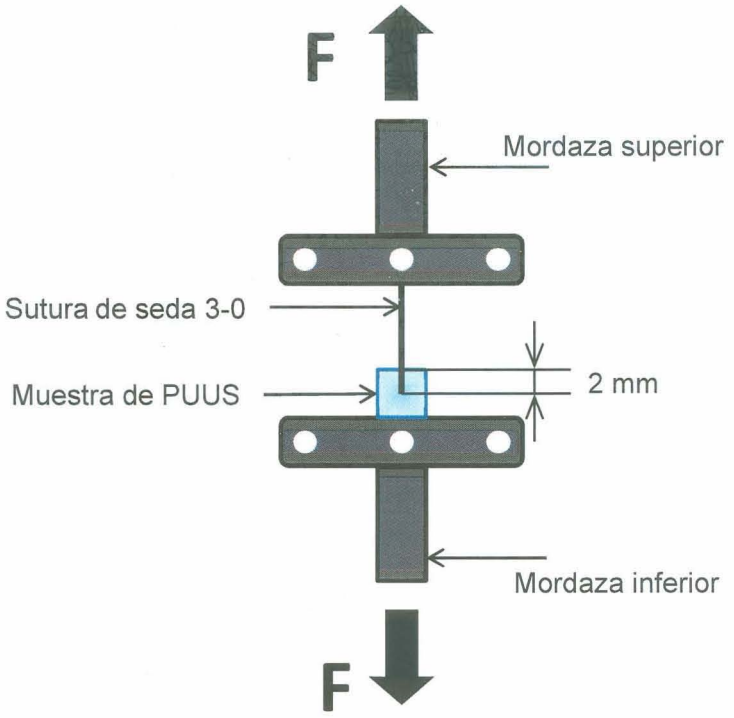

Figura 2.9 Esquema de la resistencia a la sutura.

2.5 Biocompatibilidad con fibroblastos

Para determinar el potencial de los poliuretanos sintetizados como injertos vasculares se realizaron pruebas iniciales de biocompatibilidad, por medio de células de fibroblasto de embrión de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA). Se utilizaron fibroblastos ya que la parte externa del injerto vascular está en contacto con este tipo de células mientras que la parte interna está en contacto con células endoteliales, lo cual ya ha sido reportado previamente [8]. El cultivo celular fue llevado a cabo usando el kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen).

2.5.1 Cultivo celular

Las células de fibroblasto de embrión de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA) fueron sembradas en frascos de cultivo usando Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM por sus siglas en inglés, HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en ingles), 1% L-Glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y 1% v/v de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se colocaron en una incubadora (Thermo Scientific, Serie II, Water Jacketed CO_2 Incubator) por 24 h a 37°C y 5% de CO_2. Posterior a las 24 h se despegaron los fibroblastos del frasco de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0.05% hasta que las células alcanzaran una morfología redondeada. La tripsina fue inhibida con medio de cultivo suplementado con suero. A continuación la suspensión celular fue centrifugada durante 7 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de la suspensión celular para contabilizarlas utilizando un hematocitómetro y un microscopio invertido. Finalmente, la concentración celular fue ajustada con medio de cultivo fresco a una concentración de 10 000 células/cm^2.

2.5.2 Preparación de las superficies

Las muestras empleadas para los estudios de biocompatibilidad se dividieron de acuerdo a su geometría. Para el primer caso, muestra A, se obtuvieron discos de r = 0.75 cm (área = 1.75 cm^2) de las películas de PUUR, PUUK y Tecoflex®. Para el segundo caso, muestra B, se obtuvieron segmentos de 1 cm de longitud a partir de tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex®. Ambas muestras se esterilizaron por medio de radiación UV durante 24 h en una campana biológica (Thermo Scientific* 1300 Serie A2 Clase II, Tipo A2) y posteriormente lavadas en una solución de 2 % de peróxido de benzoilo y enjuagados en buffer de fosfato salino 7.4 pH (PBS; Sigma Aldrich) con 8 cambios durante 3 días. Posteriormente, las muestras se depositaron en platos de cultivo de PS de 24 pozos, como se muestra en la Figura 2.10.

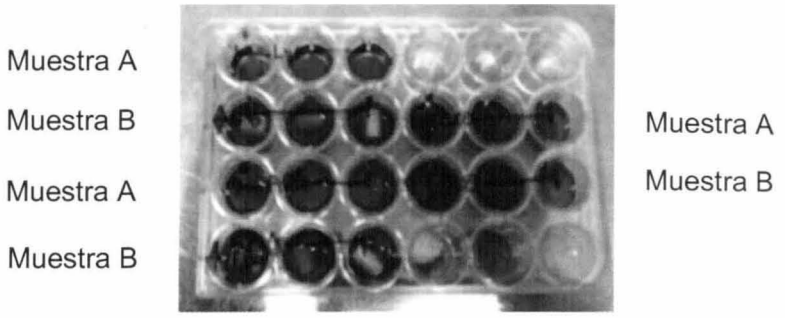

Figura 2.10 Plato de cultivo de 24 pozos con muestras tipo (A) y (B).

2.5.3 Microscopía celular

Las imágenes obtenidas de la distribución celular en la superficie de las muestras A y B, fueron obtenidas por medio de un microscopio confocal Carl Zeiss (LSM 5, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para teñir las células vivas se empleó 1 µl de calceina AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se colocaron nuevamente en la incubadora por 40 min antes de observarlas en el microscopio. Para las muestras tipo A las imágenes se obtuvieron empleando el plano X – Y, mientras que las muestras tipo B se agregó el plano Z, ver Figura 2.11, ambas muestras tipo A y B se analizaron a 3 días de cultivo.

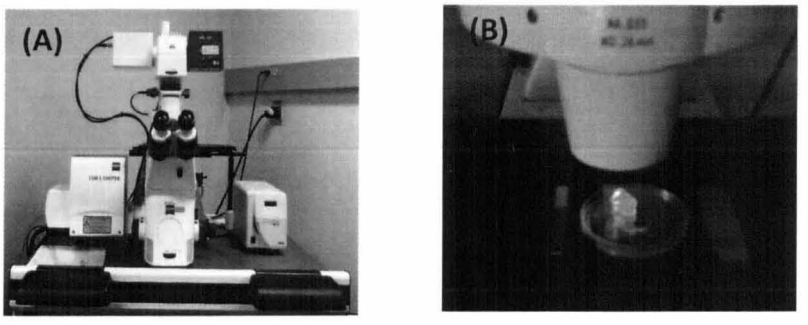

Figura 2.11 (A) Microscopio CLSM 5; (B) El plano Z se utilizó en muestras tipo B.

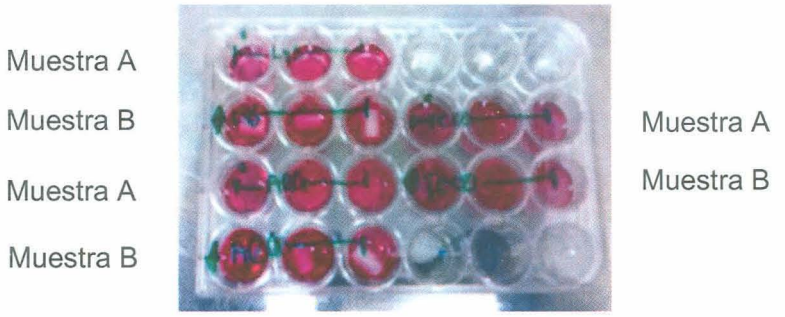

Figura 2.10 Plato de cultivo de 24 pozos con muestras tipo (A) y (B).

2.5.3 Microscopía celular

Las imágenes obtenidas de la distribución celular en la superficie de las muestras A y B, fueron obtenidas por medio de un microscopio confocal Carl Zeiss (LSM 5, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para teñir las células vivas se empleó 1 µl de calceina AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se colocaron nuevamente en la incubadora por 40 min antes de observarlas en el microscopio. Para las muestras tipo A las imágenes se obtuvieron empleando el plano X – Y, mientras que las muestras tipo B se agregó el plano Z, ver Figura 2.11, ambas muestras tipo A y B se analizaron a 3 días de cultivo.

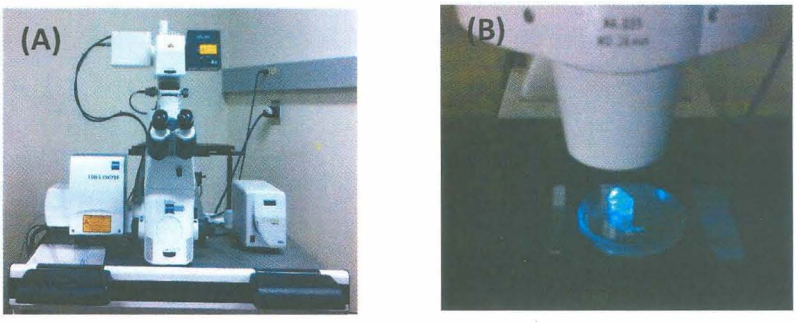

Figura 2.11 (A) Microscopio CLSM 5; (B) El plano Z se utilizó en muestras tipo B.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de los poli (uretano ureas) segmentados

Durante esta tesis se sintetizaron poli (uretano ureas) segmentados o también conocidos como PUUS a base de: HMDI, PCL y empleando diferentes extensores de cadena a base de amino ácidos como son L- Arginina y L- Lisina. Estos aminoácidos utilizados en este trabajo fueron elegidos previamente por nuestro grupo de trabajo ya que se ha encontrado que utilizando amino ácidos como extensores, por ejemplo L- Arginina, promueve significantemente la proliferación de las células endoteliales. Además, sus propiedades mecánicas, adecuado tiempo de degradación, baja citotoxicidad de lixiviados y productos de degradación no tóxicos, hacen de estos PUUS un buen candidato para su uso en aplicaciones cardiovasculares e ingeniería de tejidos [8]. Por otra parte, es reconocido que el endotelio juega un rol muy importante en la fisiología vascular. Es por ello, que la atención de muchos trabajos se ha centrado en la producción de un endotelio que sea capaz de producir óxido nítrico (NO) [15, 50]. La L-Arginina ha sido reconocida como un substrato para la enzima de sintasa de óxido nítrico (NOS), quien a su vez es la responsable de la producción endotelial del NO [51].

Por último, se ha encontrado que la L-Arginina posee la habilidad de formar especies cargadas en condiciones fisiológicas, lo cual tienden a promover la adhesión celular [8, 53]. Por lo tanto en este trabajo se emplearon como extensores de cadena la L-Arginina y la L-Lisina, (aminoácidos de carácter básico), esperando que dichos extensores de cadena formen junto con el HMDI enlaces urea, como se muestra en la Figura 3.1

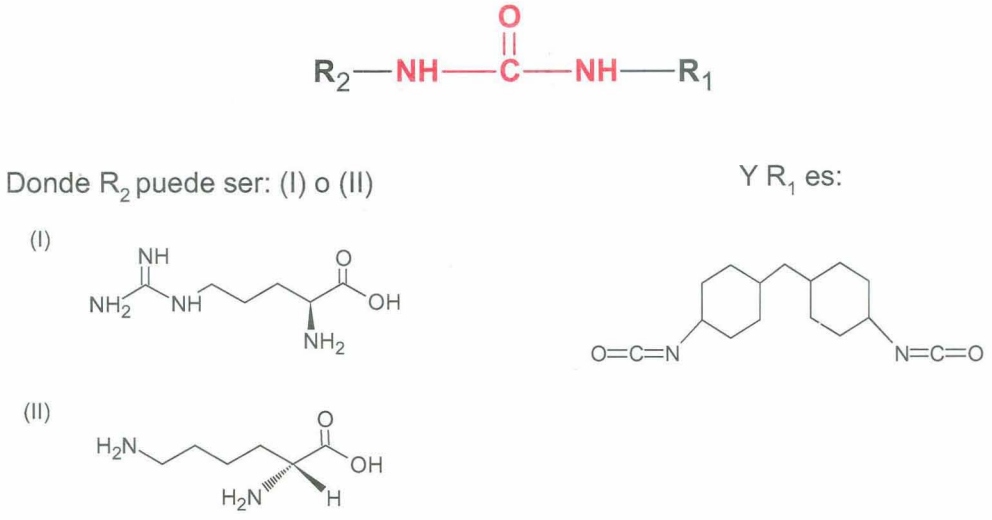

Figura 3.1 Enlaces urea (rojo) que se pueden formar entre la reacción de los extensor de cadena [L-Arginina: (I) o L-Lisina: (II)] y el HMDI.

3.2 Caracterización fisicoquímica y superficial

3.2.1 FTIR

En la Figura 3.2, se presentan los FTIR de los PUUR y PUUK los cuales fueron muy similares entre sí, debido a la alta proporción de PCL en las formulaciones (aprox. 71 %). A pesar de esto se encontraron picos característicos de los PUUS, como por ejemplo los correspondientes a los del grupo uretano del segmento rígido en 1523, 1525 y 1234 cm^{-1} y los grupos N-H alrededor de 3371 y 3374 cm^{-1} [8]. Los grupos carbonilo (C=O), del segmento flexible (PCL) de los PUUS se observaron en las bandas 1731 y 1735 cm^{-1} [56]. Debido a que estas bandas son anchas e intensas, es posible que grupos carbonilos del uretano y de la PCL se hayan traslapado.

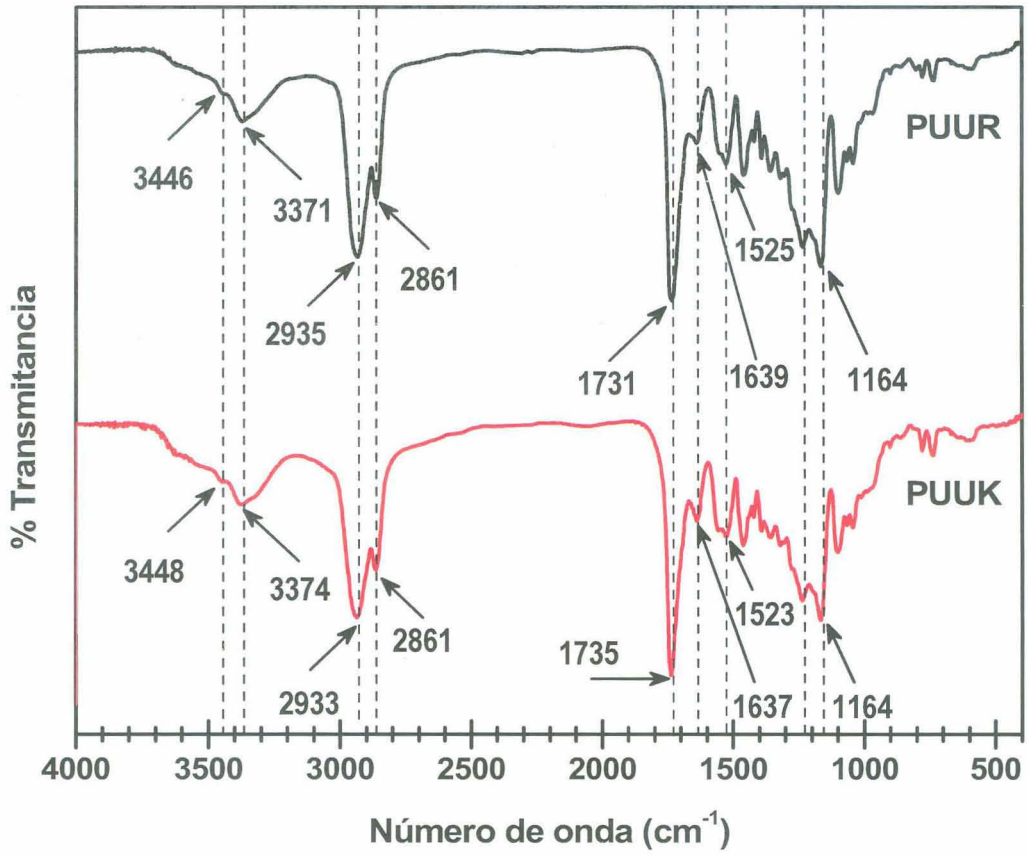

Figura 3.2 Espectros de FTIR de PUUR y PUUK

Un acercamiento más detallado de la región entre 3500 y 3150 cm^{-1}, (ver Figura 3.3), permite observar la presencia de las bandas en 3371 y 3374 cm^{-1} las cuales son atribuidas a los enlaces de hidrógeno entre los segmentos rígidos. Mientras que en las bandas correspondientes a 3446 y 3448 cm^{-1} representan una menor proporción de NH libres [57]. Por otra parte, (ver Figura 3.4), junto a las bandas de los C=O del segmento flexible de los PUUS, se aprecian bandas con una baja intensidad en 1639 y 1637 cm^{-1} indicando la formación de enlaces urea durante la reacción de extensión [58]. Para el caso del grupo urea, se sabe que puede enlazarse por medio de los puentes de H, y que a su vez éstos se presentan de

dos formas diferentes: bidentado (fuertemente enlazado), monodentado (débilmente enlazado), ver Figura 3.5 [8, 57].

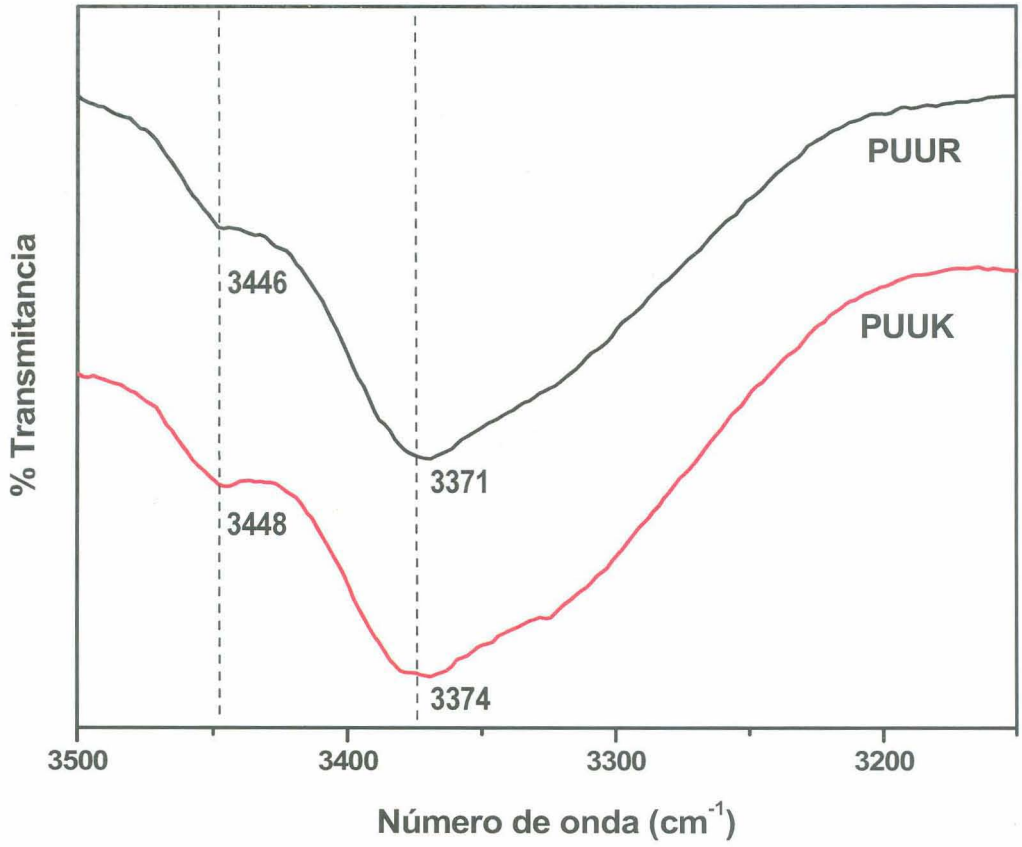

Figura 3.3 Acercamiento de la región entre 3500 y 3100 cm^{-1} de los espectros de FTIR de PUUR y PUUK.

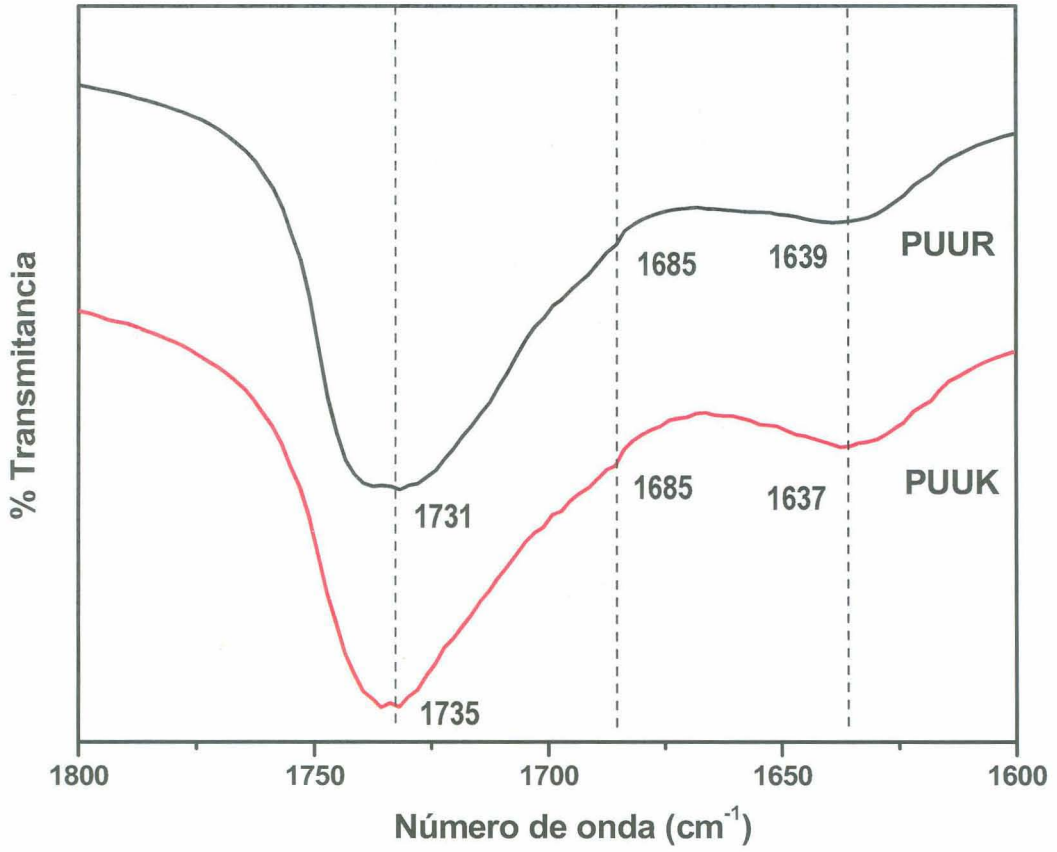

Figura 3.4 Acercamiento de la región entre 1800 y 1600 cm^{-1} de los espectros de FTIR de PUUR y PUUK.

Por lo tanto, las bandas en 1639 y 1637 cm^{-1}, pueden ser consideradas como enlaces de hidrógenos bidentados, mientras que las bandas con una menor intensidad en 1685 cm^{-1} son consideradas como enlaces de hidrógeno monodentado [59]. Por otra parte, en el intervalo entre (2861 y 2935) cm^{-1} se relacionan a los CH_2, siendo las bandas (2935, 2933) cm^{-1} estiramiento simétricos, mientras que en 2861 cm^{-1} representan los estiramientos asimétricos [7, 55, 58]. Dichos estiramientos (simétricos y asimétricos) de los CH_2 pueden ser atribuidos a la PCL o al HMDI. Y finalmente las bandas entre (1600 y 500) cm^{-1} se consideran como vibraciones características de grupos pertenecientes al segmento rígido [56].

Con base a las observaciones anteriores, se puede sugerir que los polímeros sintetizados en este trabajo presentan enlaces urea enlazados, del tipo bidentado y monodentado. Por lo cual, podemos confirmar que los aminoácidos de L-Arginina y L-Lisina reaccionaron con el HMDI para formar poli (uretano ureas) segmentados. Sin embargo, la formación de ureas debido al agua residual no es descartada.

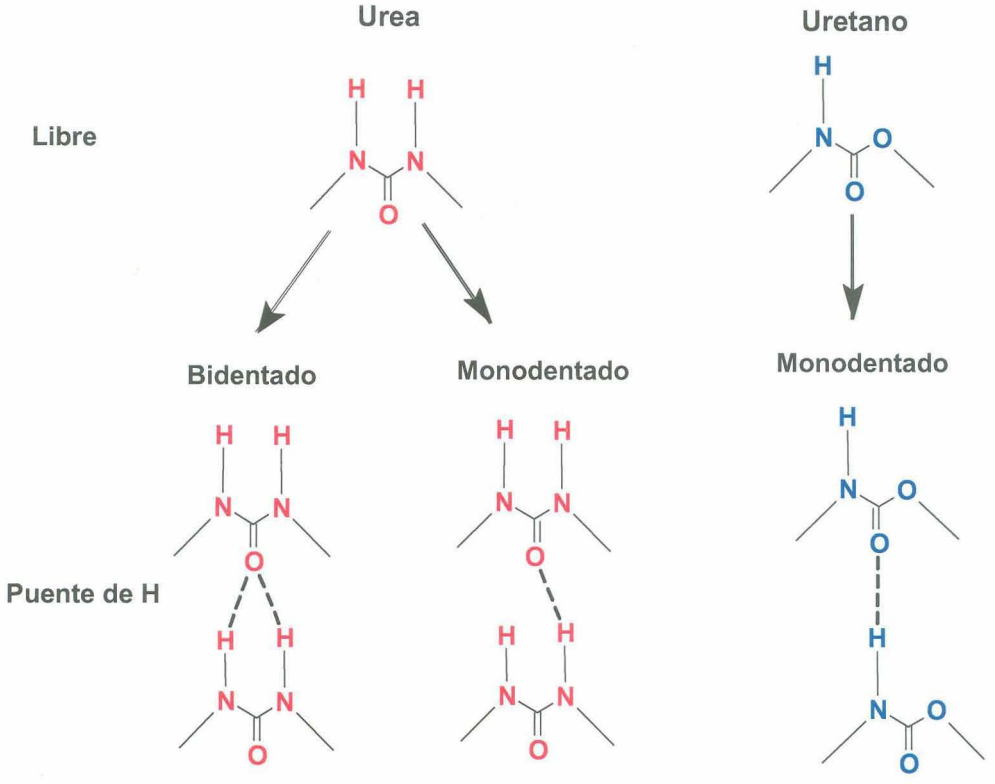

Figura 3.5 Formas de enlace entre ureas y uretanos presentes en los PUUS [8, 59].

3.2.2 DSC

Los termogramas de DSC de los PUU sintetizados se presentan en la Figura 3.6. Para el PUUR la temperatura de fusión (Tm) es de 49.63 °C y para el PUUK es de 47.83 °C. Estas temperaturas de fusión están relacionadas con los segmentos flexibles de la PCL. La presencia de la PCL cristalina desempeña un rol principal, ya que algunas propiedades como: la resistencia mecánica, degradación del material y su comportamiento biológico están relacionadas con la cristalinidad relativa.

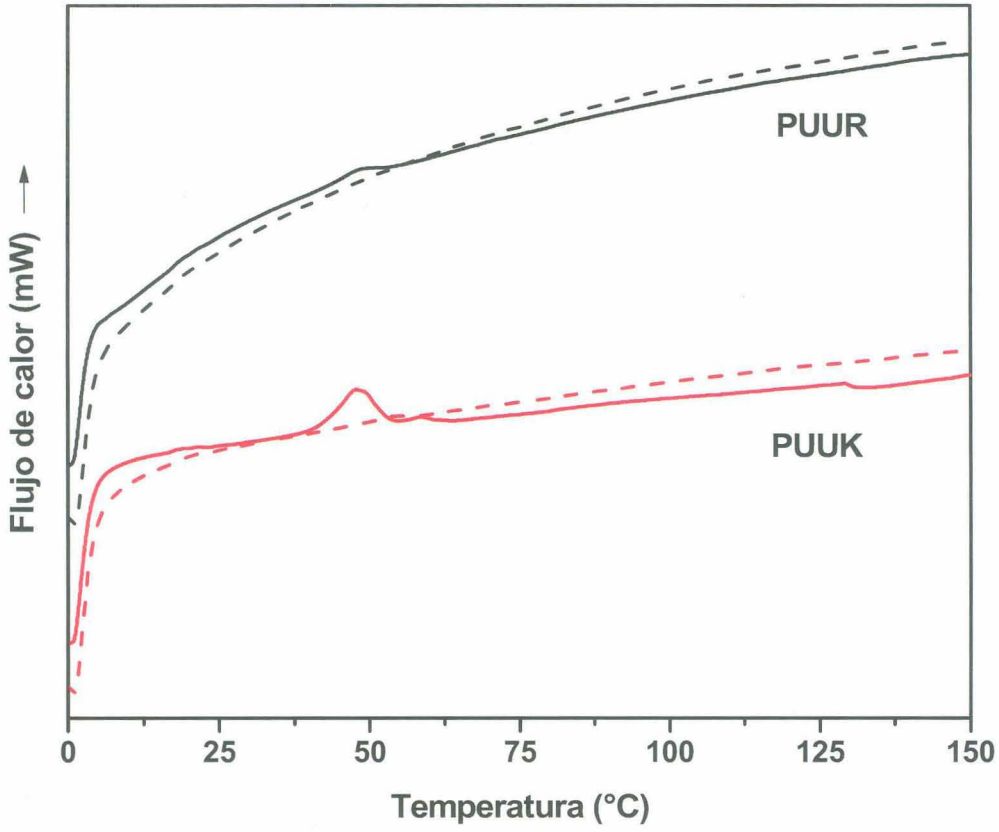

Figura 3.6 Termogramas de DSC para PUUR y PUUK.

De acuerdo con los resultados teóricos de los porcentajes de los segmentos rígidos de los PUUS sintetizados no varían significativamente (ver Tabla 3.1). Sin

3.2.2 DSC

Los termogramas de DSC de los PUU sintetizados se presentan en la Figura 3.6. Para el PUUR la temperatura de fusión (Tm) es de 49.63 °C y para el PUUK es de 47.83 °C. Estas temperaturas de fusión están relacionadas con los segmentos flexibles de la PCL. La presencia de la PCL cristalina desempeña un rol principal, ya que algunas propiedades como: la resistencia mecánica, degradación del material y su comportamiento biológico están relacionadas con la cristalinidad relativa.

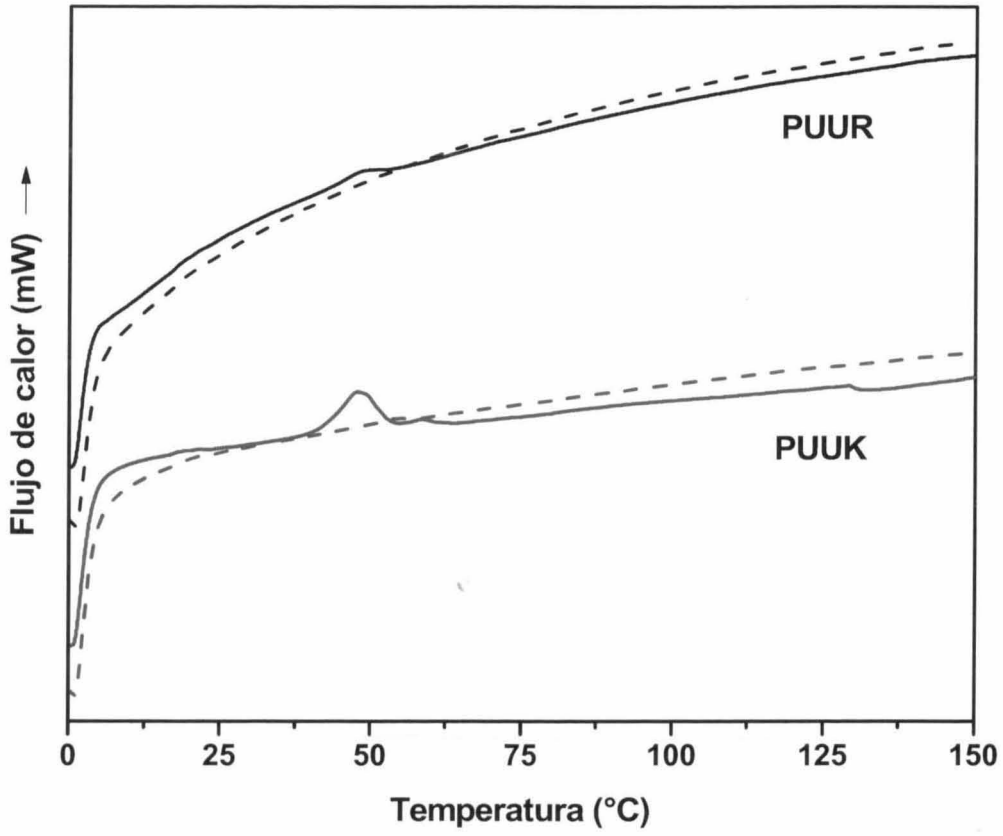

Figura 3.6 Termogramas de DSC para PUUR y PUUK.

De acuerdo con los resultados teóricos de los porcentajes de los segmentos rígidos de los PUUS sintetizados no varían significativamente (ver Tabla 3.1). Sin

embargo, se ha reportado en la literatura que los PUU elaborados con PCL 2000 g/mol poseen un porcentaje de SR alrededor de 26.0 % [61]. De manera particular, el porcentaje de SR en PUUR es muy similar a lo reportado por trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo en el 2012 (26.3%) [8]. La cristalinidad relativa muestra que existe una diferencia significativa siendo mayor en PUUK que en PUUR. Por lo tanto, los poli (uretano-ureas) segmentados elaborados con L-Arginina como extensor de cadena tienden a disminuir el grado de cristalinidad relativa del polímero.

Tabla 3.1 Propiedades térmicas de PUUR y PUUK.

Material	SR (%)	SF (%)	Tm (°C)	Xc (%)
PUUR	26.9	73.1	49.6	0.541
PUUK	27.1	72.9	47.8	20.5

SR = Segmento rígido, SF = Segmento flexible, Tm = Temperatura de fusión, Xc = Cristalinidad relativa

3.2.3 DRX

En la Figura 3.7 se muestran los difractogramas de los PUUS sintetizados y del Tecoflex®. Para el caso de los PUUR y PUUK se puede observar un pico en 2θ = 19.9 grados, por lo tanto los PUUS sintetizados a base de amino ácidos poseen cierto arreglo cristalino en su estructura [5, 60]. Por lo tanto, pueden ser considerados como poliuretanos segmentados semicristalinos [56]. Sin embargo, se conoce que la PCL (segmento flexible) posee dos picos cristalinos en 2θ = 21.5 y 23.6 ° [8, 55, 61], correspondientes a los planos cristalográficos (110) y (200) [63], los cuales no aparecen en los difractogramas de la Figura 3.7. Es por ello, que sugerimos 2 hipótesis a este comportamiento. En el primer caso, los segmentos rígidos de los PUUK y PUUR se encuentran fuertemente entrelazados físicamente con los segmentos flexibles (PCL) lo que impide su cristalización y que

los picos característicos de PCL puedan ser detectados con DRX. La segunda hipótesis está relacionada con la presencia del pico a 19.5° lo cual indica la presencia de una fase semicristalina [39]. Esto puede relacionare con el hecho de que la PCL puede presentar 3 fases diferentes en su estructura, ver Figura 3.8 (B) [63].

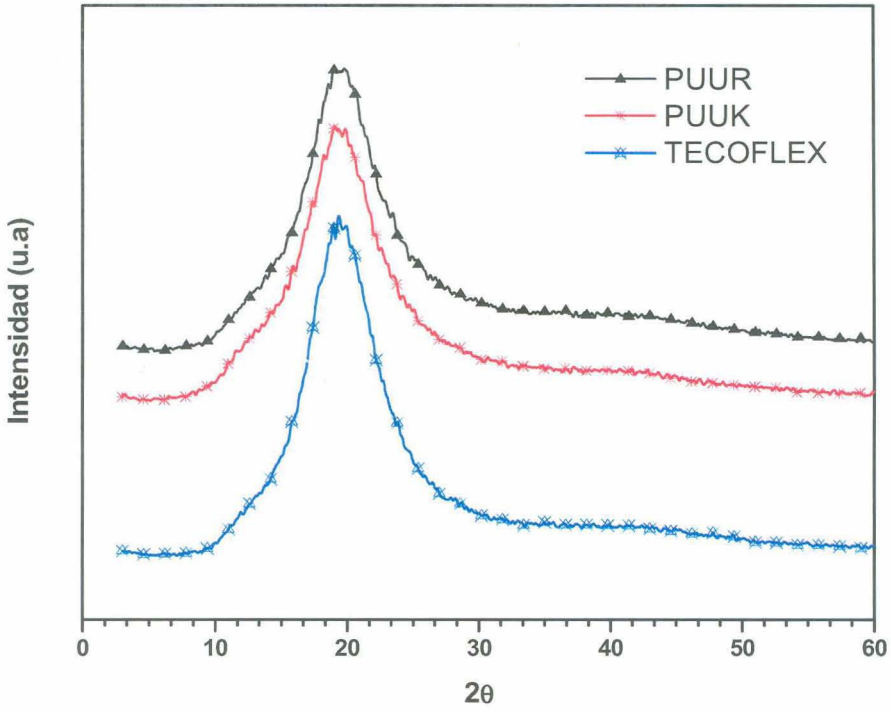

Figura 3.7 Difractogramas obtenidos de los PUUR, PUUK y Tecoflex®.

Fase 1 Cristales rígidos: Esta es la región más organizada de la PCL, por lo que los movimientos de las cadenas poliméricas son lentos y restringidos.

Fase 2 Región rígido-amorfa: Las cadenas de la PCL en esta región tienen movilidad intermedia, en esta región tiene probablemente cadenas poliméricas atrapados en las zonas cristalinas.

Fase 3 Regiones flexible-amorfas: Las cadenas de PCL son libres, mostrando movimientos rápidos y con mayor libertad.

Por lo tanto, para la hipótesis (2) se pudiera estar presentando con mayor intensidad la fase 2 rígido-amorfa y flexible amorfa sobre los cristales rígidos, lo que no permite reflejar los picos en $2\theta = 21.5°$ y $23.6°$.

Adicionalmente la PCL posee una estructura ortorrómbica [63] dentro de la cual la estructura química de la PCL cristaliza, (ver Figura 3.8 (A)). Estudios realizados por Kaji y Horii [63] encontraron que los CH_2 en las zonas cristalinas cambia rápidamente, y que los grupos carbonilo se encuentran prácticamente rígidos. Sin embargo, la secuencia de CH_2 de la parte amorfa posee más libertad, lo que le permite someterse a alguna torsión y de propagar este efecto a través de la cadena de polímero.

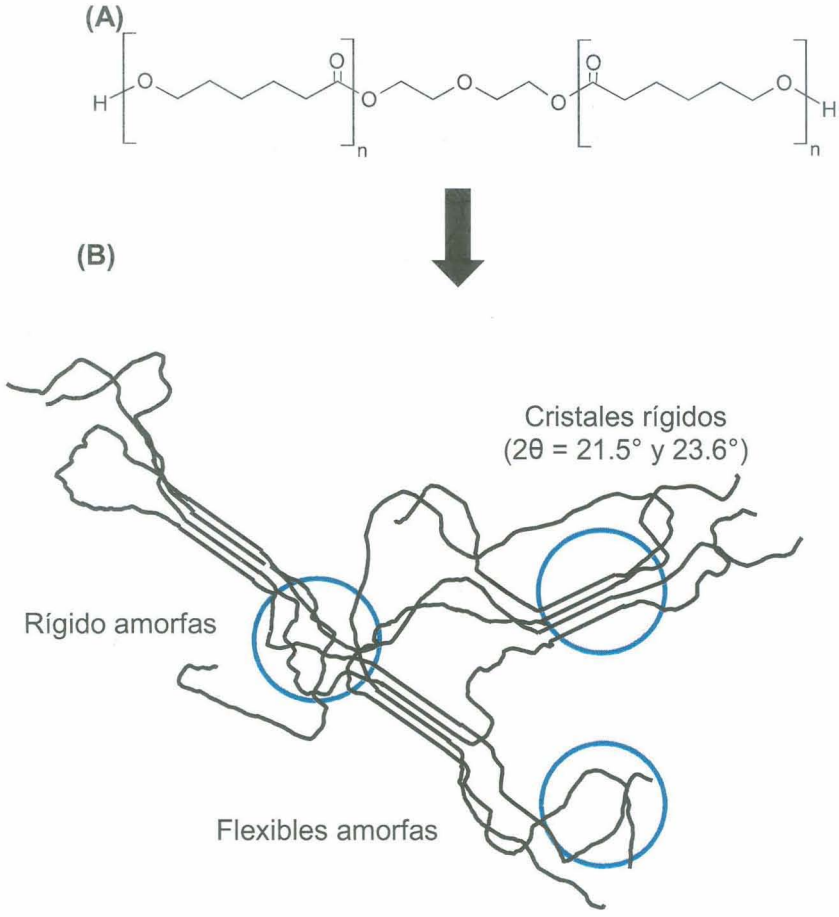

Figura 3.8 (A) Estructura de la PCL; (B) Esquema de 3 fases en la PCL [62].

Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha realizados estudios de degradación en poliuretanos segmentados en medios hidrolíticos (HCl 2M y NaOH 5 M) y oxidativos (H_2O_2 al 20 %) y se encontró que posterior a estas degradaciones los picos de 21.5° y 23.6° son detectados por DRX [64]. En resumen las posibles causas por las cuales los picos característicos de la PCL en los materiales sintetizados no aparece puede ser debido a que los segmentos rígidos en los PUUR y PUUK pueden estar enmascarando la zona cristalina de los mismos o que las regiones rígidas y flexibles amorfas predominen sobre los cristales rígidos

en la estructura en la PCL, aunado a las limitaciones impuestas a su naturaleza de una estructura ortorrómbica en la PCL. Para el caso del Tecoflex® se observó un pico a 2θ = 19.4°, el cual coincide con lo reportado en la literatura [65]. Para el caso del Tecoflex® se ha encontrado que su cristalinidad disminuye muy poco al ser expuesto a degradaciones con H_2O_2 [65].

3.2.4 TGA

En la Figura 3.9 (A) se presentan los termogramas de TGA de los materiales sintetizados, en la cual se puede apreciar una primera pérdida de masa alrededor de 300°C y 400 °C mientras que entre 400 °C y 500 °C se puede observar una segunda descomposición. La primera descomposición se puede relacionar con la descomposición de los segmentos flexibles y rígidos, ya que se ha reportado en la literatura que la temperatura de descomposición de los grupos uretano se encuentra alrededor de 250°C y 300°C mientras que para la PCL pura se ha reportado a 260ºC [8, 64]. La segunda caída de las curvas, puede ser atribuida como efectos de los extensores de cadena empleados en este trabajo, presentando PUUR un ligero desplazamiento hacia la derecha indicando una mayor estabilidad térmica en comparación con PUUK. Para mayor claridad se presenta la derivada de la masa residual, (ver Figura 3.9 (B)) indicando que la primera descomposición ocurre a 348 °C y 426 °C para el PUUK y PUUR, respectivamente, y que la segunda descomposición se presenta a 455 °C y 520 °C, respectivamente. Estos resultados confirman que los PUUS a base L-Arginina presentan una mayor estabilidad térmica.

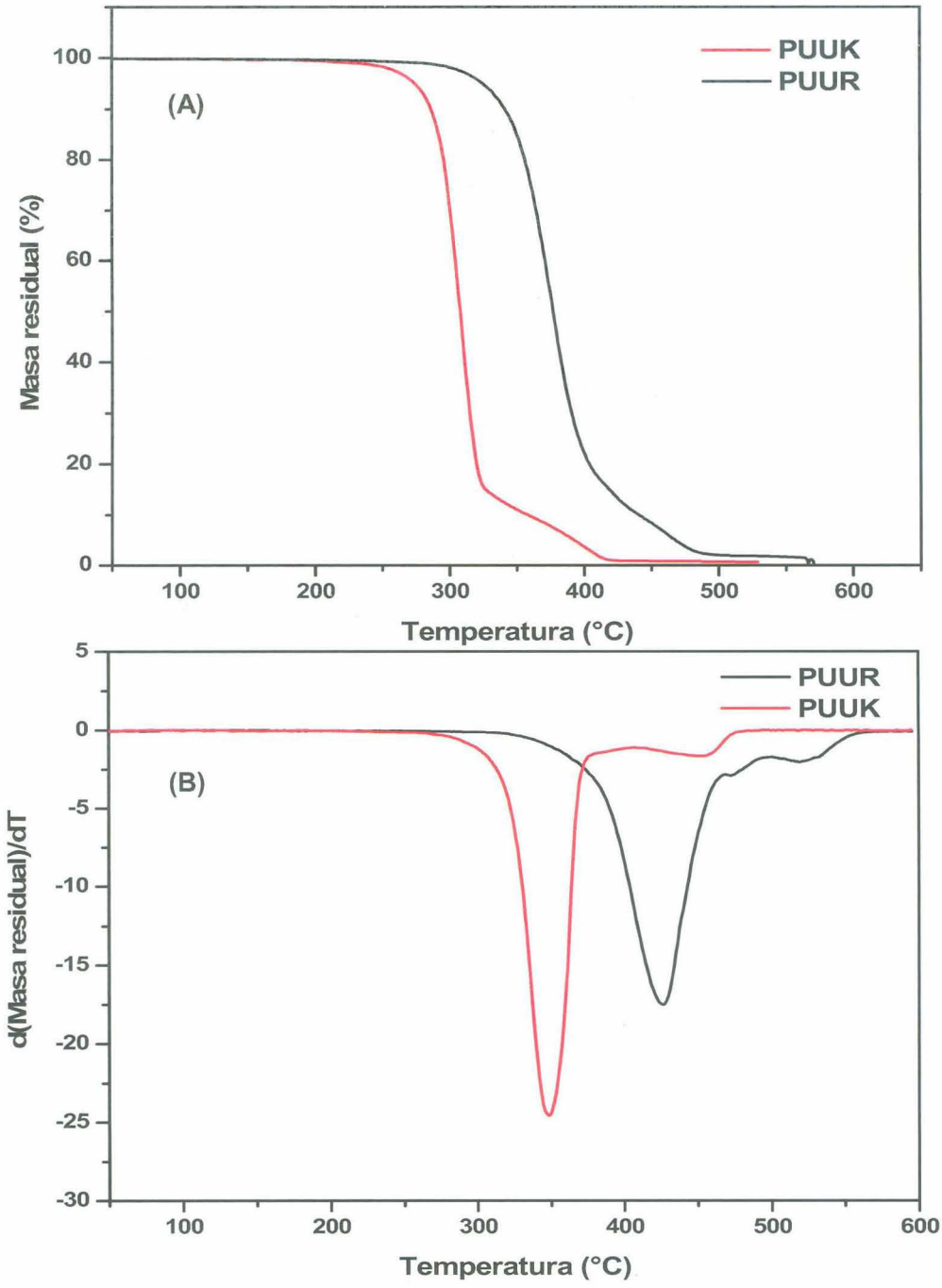

Figura 3.9 Análisis termogravimétrico de PUUR y PUUK (A) Masa residual; (B) Derivada de la masa residual.

3.2.5 SEM

Las micrografías obtenidas por SEM de las películas obtenidas de los diferentes materiales sintetizados se presentan en la Figura 3.10. A pesar de que las películas de PUUR y PUUK se elaboraron con las mismas condiciones la morfología superficial de estos materiales es diferente ya que para las películas de PUUR se observa una superficie granular (10 a 15 μm) la cual se atribuye a la PCL [56]; mientras que la superficie de PUUK presenta una superficie porosa y grietas. El Tecoflex® presenta una superficie lisa la cual corresponde a lo reportado en la literatura. Una de las ventajas de obtener superficies porosas es que éstas se asemejan a la matriz vascular de las arterias, en donde las células proliferan sobre estas superficies [67]. Por lo tanto, los injertos vasculares con un alto potencial para ser utilizados en ingeniería de tejidos deben de poseer una rugosidad que permita la adhesión y proliferación celular en la superficie del andamio [50].

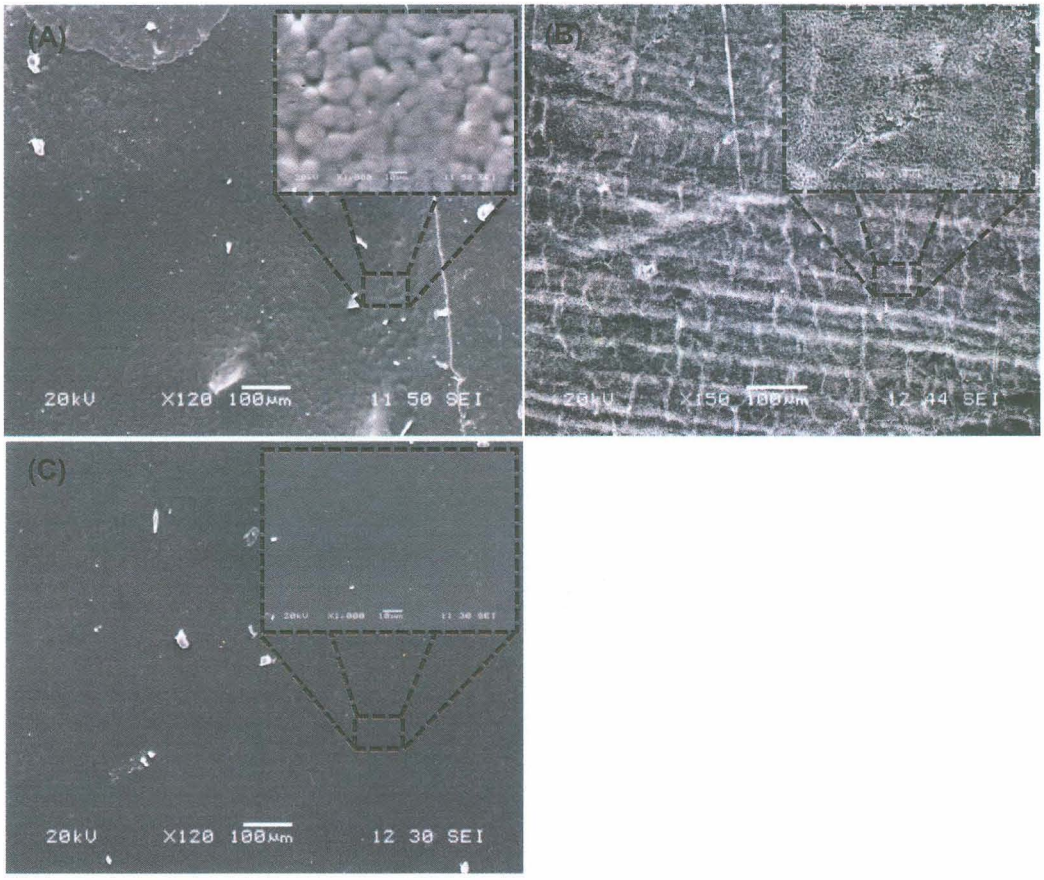

Figura 3.10 Resultados de SEM en películas: (A) PUUR; (B) PUUK y (C) Tecoflex®.

En la Figura 3.11 (A, C y E) se presentan los resultados de SEM de las superficies exteriores e interiores (Figura 3.11 (B, D y F)) de los injertos tubulares de PUUR, PUUK y Tecoflex® respectivamente. En todos los casos se observaron diferencias con respecto a la morfología de las películas. Para el caso de las superficies exteriores de PUUR y PUUK se pueden observar que existen alineaciones del material en dirección longitudinal de los tubos mientras que en sus respectivas superficies interiores se aprecian grietas para PUUR y PUUK.

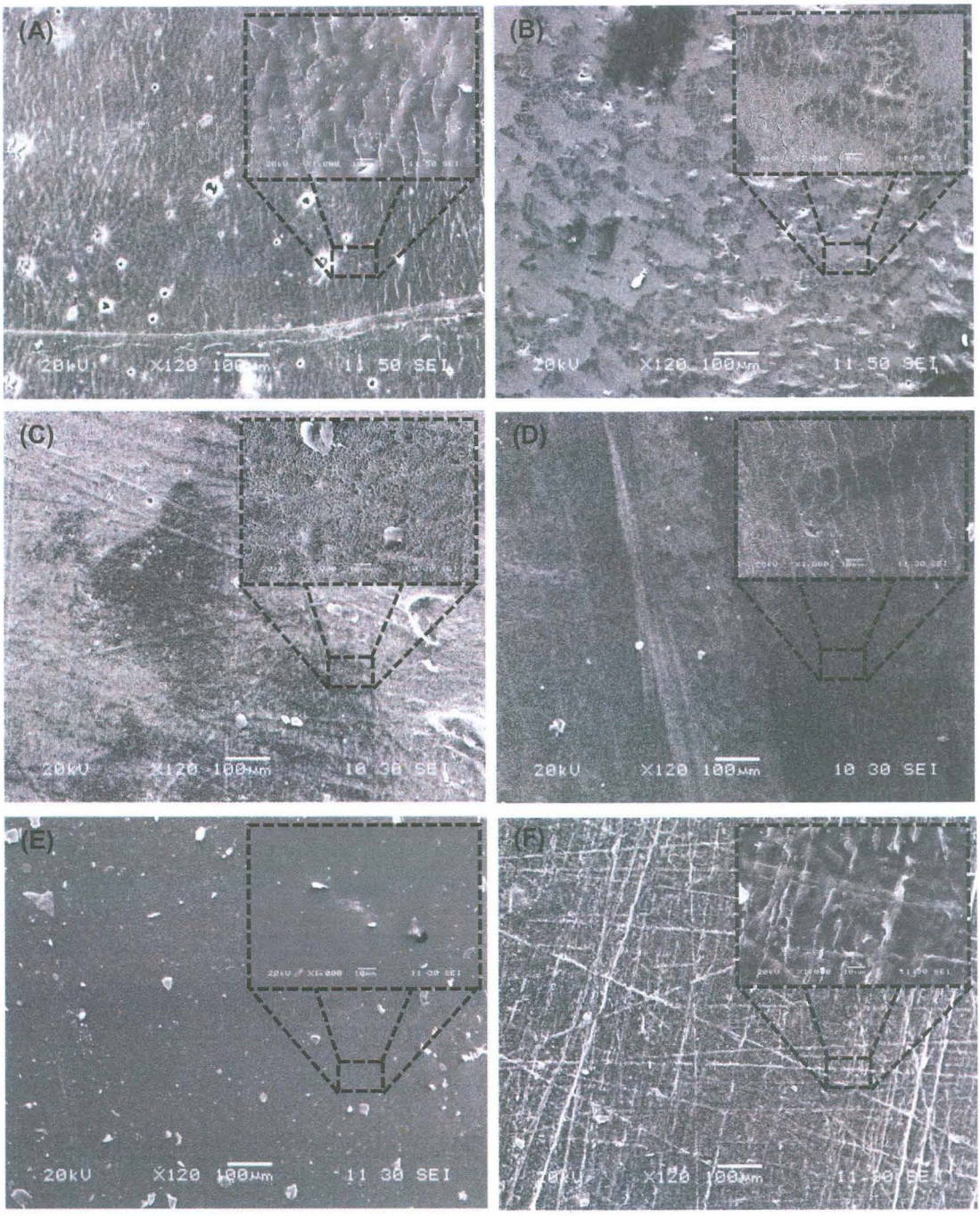

Figura 3.11 Resultados de SEM en superficies exteriores: (A, C y E); superficies interiores (B, D y F) de tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex® respectivamente.

Para el tubo de Tecoflex® no se observaron alineaciones del material en la superficie exterior pero si presenta alineaciones multidireccionales en la superficie interior. Finalmente, las alineaciones en la superficie exterior de PUUR y PUUK pueden tener un efecto sobre las células de los fibroblastos, es decir favorecer el crecimiento celular paralelo a dichas alineaciones [21] ya que de acuerdo con la literatura las células tienden a crecer sobre substratos que presentan un arreglo en su superficie.

3.2.6 AFM

Cuando un biomaterial se coloca en contacto con sangre u otros tejidos, las proteínas inmediatamente competirán para depositarse sobre la superficie del material; este evento es seguido por las interacciones célula/plaqueta [36]. Uno de los factores que afecta este comportamiento está relacionado con la rugosidad del biomaterial [68]. Con base en lo anterior, se realizaron estudios de AFM para determinar la rugosidad media cuadrática (Rrms) y conocer la topografía en los materiales sintetizados. En la Figura 3.12, se muestra que PUUR y PUUK presentaron topografías con crestas y valles, mientras que el Tecoflex® posee una topografía ondulada. Las películas de PUUK presentan la mayor rugosidad (Rrms = 0.644 μm), la cual es el doble de las películas de PUUR (0.309 μm), producto de poseer un mayor número de crestas y valles en su superficie las películas de PUUK. Sin embargo, la rugosidad de PUUR se encuentra cerca a lo reportado en la literatura (Rrms = 0.260 μm) [8].

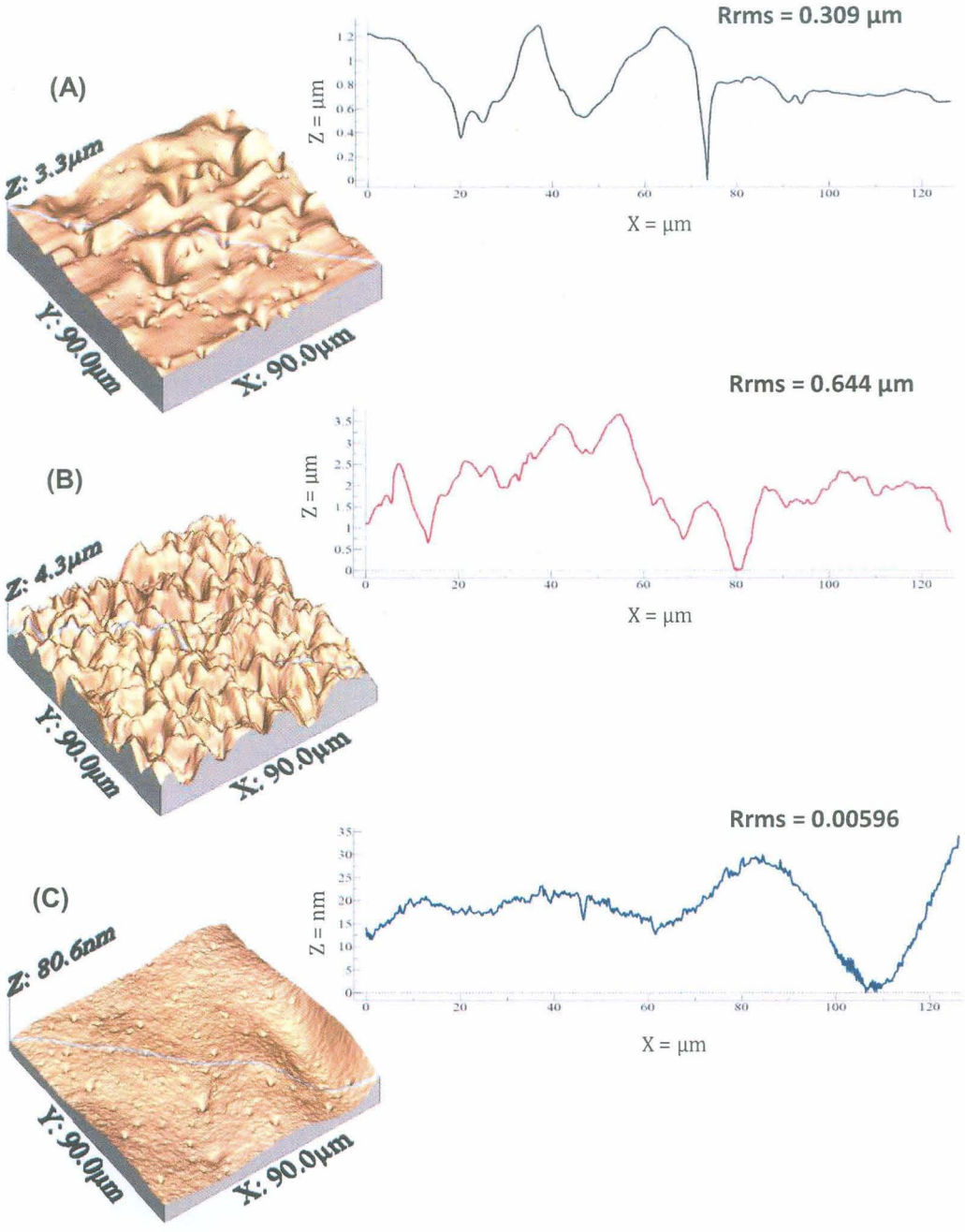

Figura 3.12 Resultados de AFM en películas de: (A) PUUR; (B) PUUK y Tecoflex®.

Algunos de los factores que puede influir en la rugosidad de los poliuretanos es la incompatibilidad termodinámica entre los segmentos rígidos y flexibles originando una separación de fases, otros fenómenos físicos son la cristalización, enlaces por puentes de hidrógeno entre ambos segmentos, etc. Por ello, para el caso de películas la rugosidad está influenciada por la incompatibilidad entre los segmentos, la cual es debida a la polaridad de los segmentos rígidos y la no polaridad de los segmentos flexibles causando una separación de fase [8, 67, 68], que a su vez depende de la formación de enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos uretano, el extensor de cadena empleado, la relación en peso de los dos segmentos, entre otros factores [69]. Por otra parte y con base en la literatura, las crestas en las imágenes de AFM están relacionadas a la PCL cristalina del segmento flexible [8, 68]. Sin embargo, en ambientes acuosos por ejemplo PBS se presenta un reacomodo de ambas fases debido a que se minimiza la energía superficial provocando que los segmentos flexibles no polares se muevan hacia dentro del material [36].

Por otra parte, los resultados de AFM en los injertos de PUUR, PUUK y Tecoflex®, respectivamente muestran que a pesar que se elaboraron bajo las mismas condiciones presentan diferencias en su rugosidad así como en sus perfiles topográficos, ver Figura 3.13 y Figura 3.14. Para PUUR los resultados de Rrms entre las superficies exteriores e interiores no presentan cambios significativos, por el contrario su perfil topográfico interior presenta crestas y valles más pronunciados. Para PUUK la Rrms en la superficie interior es 2.5 veces mayor en comparación con su superficies exterior, y su perfil topográfico en la superficie interior es similar a PUUR (crestas y valles pronunciados), mientras que su superficie exterior puede ser considerada plana con pequeñas crestas y valles. Mientras que para el Tecoflex® la Rrms es 2.1 veces mayor en la superficie interior, y su perfil topográfico interior y exterior presentan el mismo comportamiento que PUUR y PUUK.

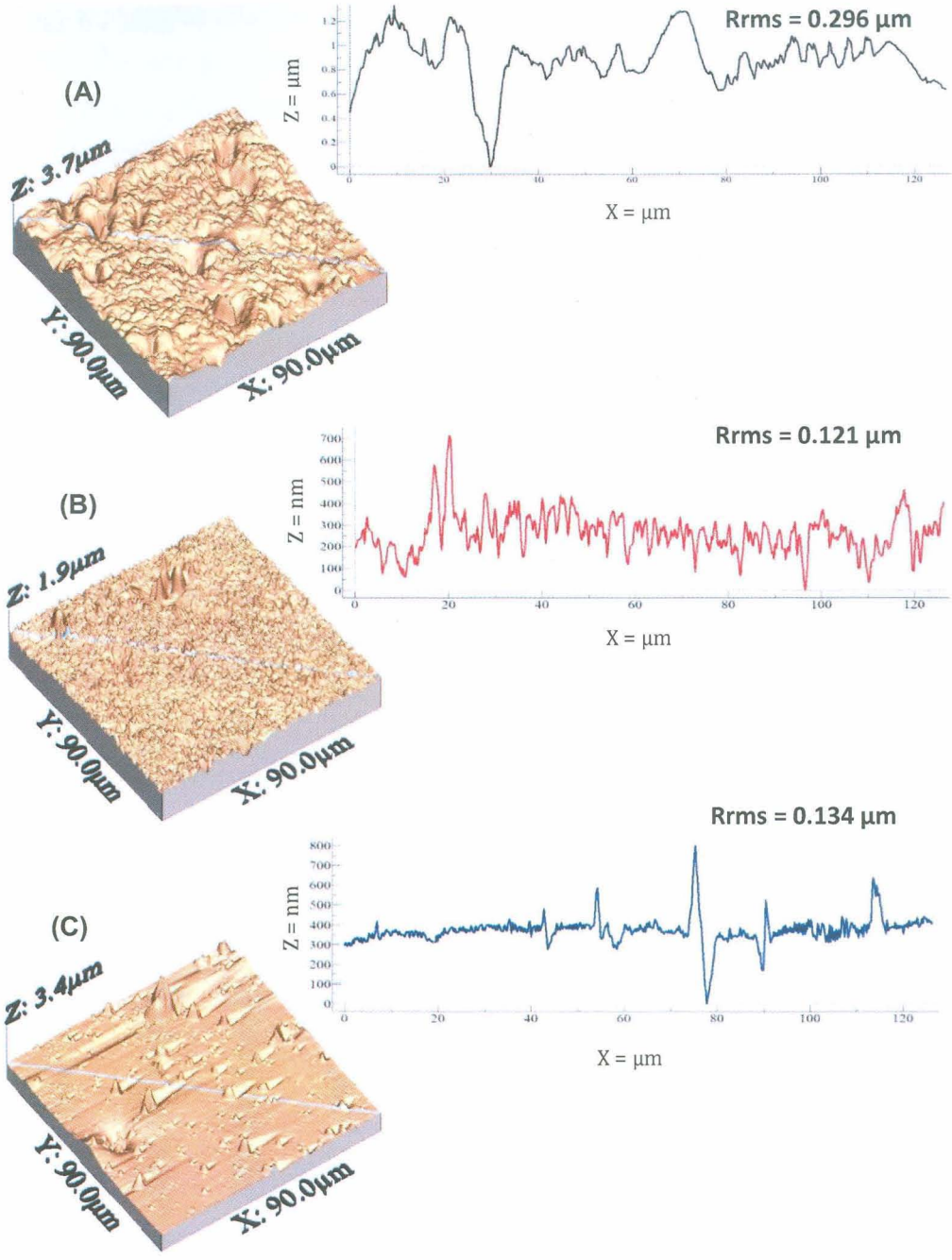

Figura 3.13 Resultados de AFM en superficie exterior de tubos de: (A) PUUR (B) PUUK y (C) Tecoflex®

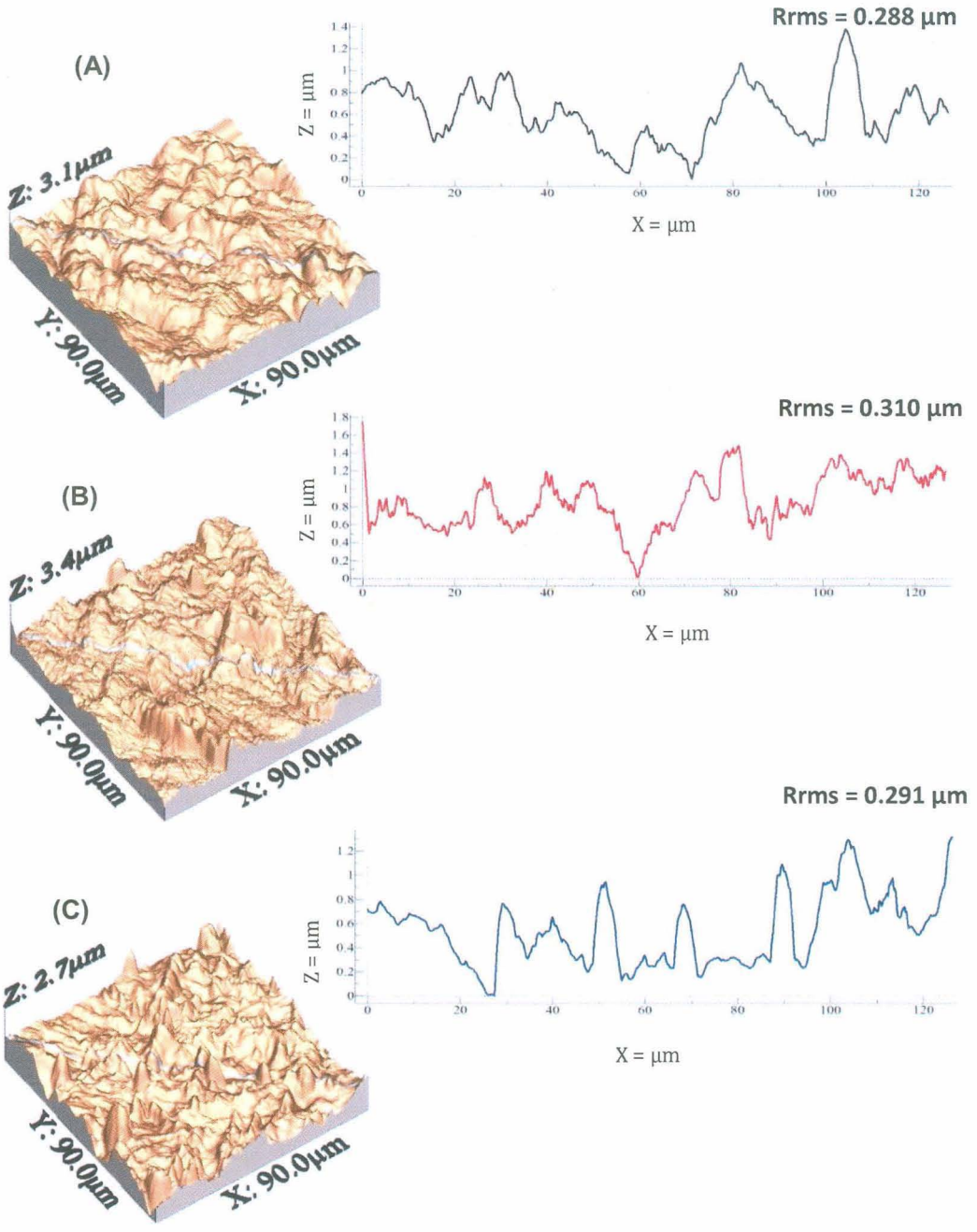

Figura 3.14 Resultados de AFM en superficie interior de tubos de: (A) PUUR; (B) PUUK y (C) Tecoflex®

Para explicar las diferencias de rugosidad y de los perfiles topográficos entre las superficies interiores y exteriores de los materiales analizados en este trabajo se utilizó el análisis de flexión en vigas. Desde este punto de vista, consideremos una viga recta formada por una gran cantidad de fibras longitudinales, (ver Figura 3.15 (A)), la cual está sujeta a flexión pura, (ver Figura 3.15 (B)), cuando se flexiona la viga, las fibras superiores se comprimen, mientras que las fibras inferiores se alargan. Por lo tanto, las fuerzas resultantes de compresión (E) y tensión (F), (ver Figura 3.15 (C)), son iguales en magnitud.

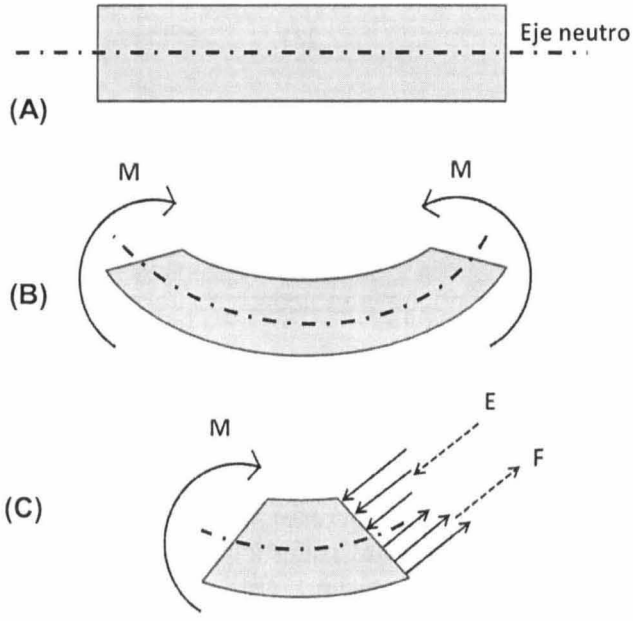

Figura 3.15 Esfuerzo en vigas: (A) Viga recta; (B) Flexión pura; (C) Fuerzas resultantes de compresión y tensión [67].

Ahora bien consideremos dos secciones planas (f-g y h-i) antes y después de la flexión, (ver Figura 3.16 (A) y (B)), como las secciones planas antes de la flexión se conservan planas después de la flexión, las fibras de la viga deben de cambiar de longitud. La posición original de las fibras, (ver Figura 3.16 (C)), con líneas interrumpidas se ha movido después de la flexión a la posición mostrada por las

líneas continuas. Las fibras superiores se han acortado mientras que las fibras inferiores se han alargado [71].

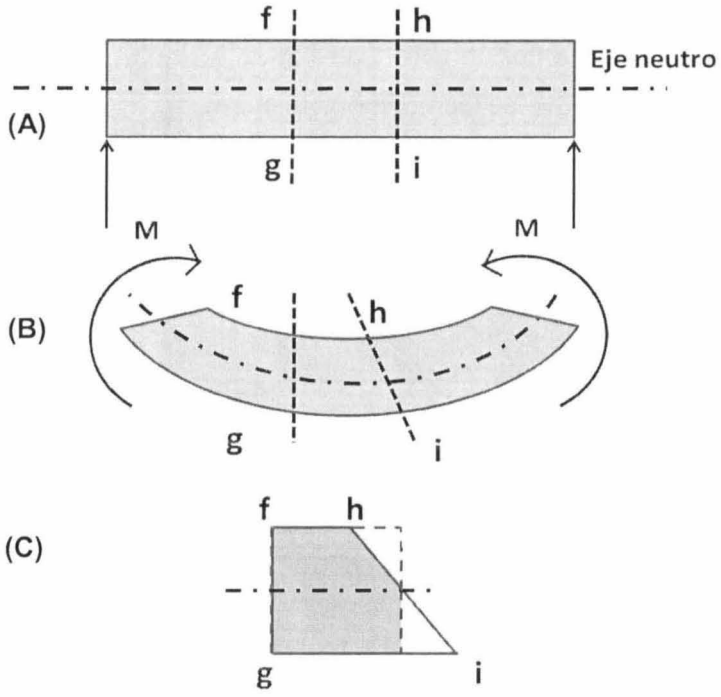

Figura 3.16 Análisis de secciones planas (f-g) y (h-i) en vigas [67].

De acuerdo con lo anterior, las superficies internas de PUUR, PUUK y Tecoflex® presentan mayor rugosidad al estar sujetas a fuerzas de compresión, como resultado al transformar una superficie plana (película) en curva (tubo) durante la elaboración de los injertos vasculares, ya que las crestas de PCL en la superficie interior se encuentran fuertemente compactadas entre sí, mientras que en la superficie exterior se encuentran más relajadas debido a las fuerzas de tensión. Sobre esta base, los PUUS sintetizados en este trabajo también presentan cambios de rugosidad entre sus superficies internas y externas.

3.2.2 Pesos moleculares

Con base en los resultados obtenidos por cromatografía de permeación en gel, se pudieron determinar los pesos molecular promedio en número (Mn) y en peso (Mw), así como la polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés) en cada uno de los materiales sintetizados. Estos resultados fueron comparados con el Tecoflex® el cual es un poli (éter uretano) comercial, sintetizado a base de poli (óxido de tetrametileno) (PTMO), HMDI y BD (1,4 Butanodiol), utilizado en aplicaciones médicas. En la Tabla 3.2, se presentan los resultados donde se observa que los pesos moleculares de los PUUS son altos. Esto le imparte a las películas y tubos de PUUS su resistencia a la tensión y distensibilidad, ya que se ha reportado que existe un mínimo entre 5 000 a 10 000 g/mol para que los polímeros presenten propiedades mecánicas significativas [54].

El PUUK presentó un mayor índice de polidispersidad, lo que puede representar menores propiedades mecánicas en comparación con los otros materiales, mientras que la polidispersidad del PUUR fue similar a lo reportado en la literatura (PDI = 2.21) [8]. Se sabe que uno de los factores que determinan el desempeño de un polímero es la distribución de los pesos moleculares, ya que éstos son reflejados en la propiedades físicas y en su capacidad de procesamiento [52, 70]. Es por ello que, el Mw está relacionado con la resistencia a la tensión y a al impacto. Por lo tanto, esta relación así como la estructura del polímero pueden influir en el balance de las regiones amorfas y cristalinas, ya que largas cadenas poliméricas pueden tener menos movilidad y por lo tanto se consideran como impedimentos para que se organicen todos los segmentos de cadena especialmente las cadenas cortas. Por otra parte, bajos pesos moleculares contienen cortas cadenas poliméricas que pueden enredarse menos y como consecuencia poseer una menor resistencia

Tabla 3.2 Pesos moleculares de los PUU sintetizados y Tecoflex®.

Muestra	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PDI (Mw/Mn)
PUUR	53 647	118 190	2.20
PUUK	35 867	100 460	2.80
TECOFLEX®	69 432	105 940	1.53

3.2.6 Ángulo de contacto

La hidrofilicidad es uno de los factores más importantes que afecta la citocompatibilidad de los biomateriales. La adhesión y el crecimiento de las células sobre una superficie se consideran fuertemente influenciados por el equilibrio de hidrofilicidad / hidrofobicidad, que se describe frecuentemente como mojabilidad [35, 43]. Por lo tanto, el ángulo de contacto estático fue medido para determinar la mojabilidad en las películas y las superficies externas e internas de tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex®. En la Figura 3.17, se presenta la gráfica de los resultados de ángulo de contacto sobre las superficies de películas de PUUR 74.9° ± 2.54° valor es muy cercano a lo reportado en la literatura 73.3° ± 2.80° [8], mientras que los resultados para PUUK y Tecoflex® fue de 72.1° ± 2.97° y 81.2° ± 1.50°, respectivamente.

Para las superficies exteriores, (ver Figura 3.18 (A)), de los injertos tubulares los resultados de ángulo de contacto fue de 74.0° ± 4.32°, 68.3° ± 3.35° y 86.0° ± 7.11°, para PUUR, PUUK y Tecoflex® respectivamente. Para las superficies interiores, (ver Figura 3.18 (B)), de los injertos tubulares los resultados fue de 63.4° ± 4.42°, 68.3° ± 4.68° y 70.6° ± 4.99° para PUUR, PUUK y Tecoflex®, respectivamente.

En relación con los resultados entre las películas y las superficies exteriores e interiores, el ángulo de contacto estático de PUUK decrece al pasar de una superficie plana a una superficie curva, por lo contrario no presenta variación de su ángulo de contacto entre sus superficies exterior e interior. Para PUUR el ángulo de contacto estático es similar entre la superficie plana y exterior, pero presenta una disminución en su superficie interior. Finalmente, el Tecoflex® presenta para todos los casos mayores ángulos de contacto teniendo un mínimo de 70.6° para una superficie interior, el cual es similar para otros poliuretanos segmentados comerciales como el Pellethane con un ángulo de contacto de 72.0° [73]. Los ángulos de contacto estáticos obtenidos en los PUUS sintetizados son importantes ya que se ha reportado en la literatura a través de Wang [50] que el valor del ángulo de contacto para la proliferación y adhesión celular se desea que se encuentre entre 55 y 75°.

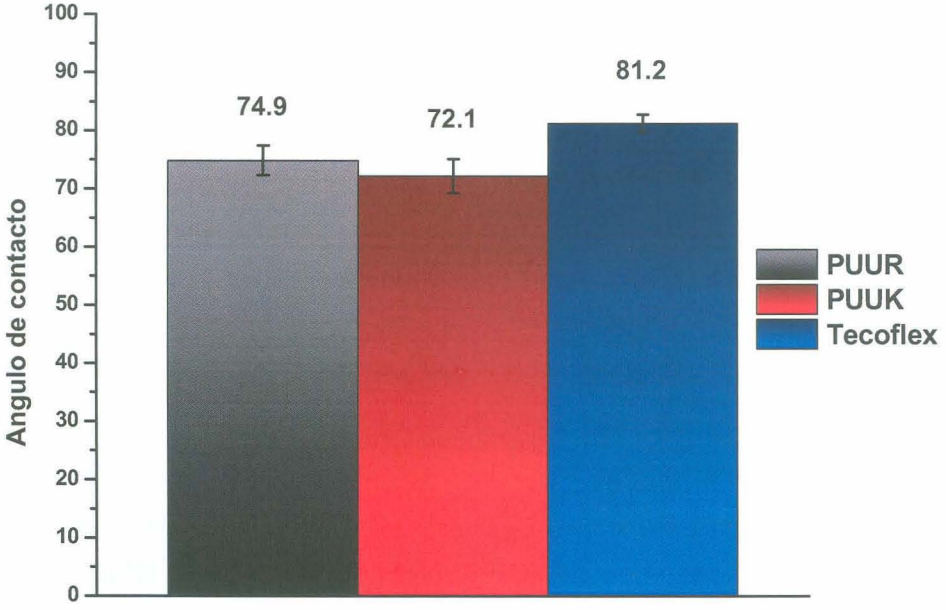

Figura 3.17 Ángulo de contacto en superficies de películas de PUUS y Tecoflex®, n = 10.

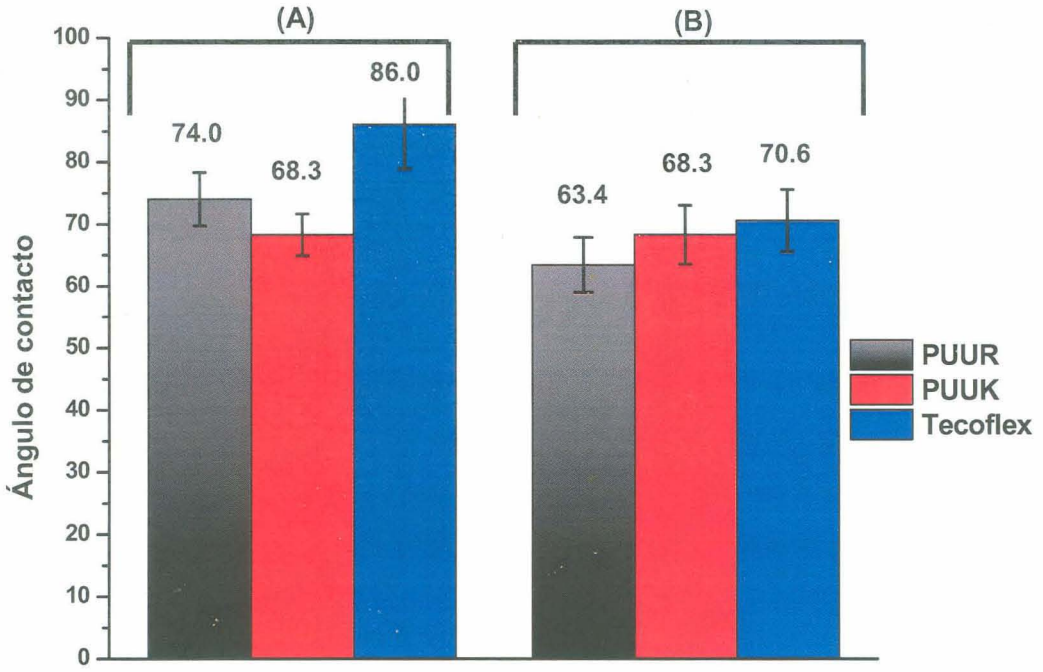

Figura 3.18 Ángulo de contacto en: (A) Superficie exterior; (B) Superficie interior de tubos de PUUS y Tecoflex®, n = 10.

En relación con los resultados del ángulo de contacto, podemos mencionar que las superficies de las películas muestran un comportamiento ligeramente hidrofóbico propio de los poliuretanos preparados con PCL diol debido a los cinco metilenos presentes en su unidad repetitiva [8]. Por lo contrario, las superficies internas presentan un comportamiento más hidrofílico en comparación con las superficies planas. Sin embargo, entre las superficies curvas la superficie interior tiene un comportamiento más hidrofílico en comparación con las superficies exteriores, dicho comportamiento puede ser considerado como un efecto de las diferencias de rugosidad entre las superficies exterior e interior de los tubos de PUUS, ver sección anterior. En relación con lo anterior, concluimos que los efectos de compresión y tensión en las superficies interiores y exterior de ambos PUUS también poseen una influencia en el carácter hidrofílico/hidrofóbico de las superficies curvas.

3.4 Caracterización mecánica

3.4.1 Tensión longitudinal

Uno de las razones por lo cual las propiedades mecánicas de los injertos vasculares son importantes es debido a la naturaleza de las arterias nativas, ya que éstas funcionan como tejidos biológicos compuestos que absorben energía durante la sístole y la liberan durante la diástole [16]. Sin embargo, un desfase de las propiedades mecánicas en la interface entra la arteria nativa y el injerto se traduce en el debilitamiento de la pared en la arteria nativa, pérdida de la viabilidad de células endoteliales y la dilatación de la sutura quirúrgica. Es por ello, que cualquier sustituto de arteria debe de poseer propiedades mecánicas similares a la arteria nativa. En base a lo anterior se determinaron las propiedades mecánicas a tensión longitudinal para las películas (caso 1) y los tubos (caso 2) de estos materiales.

Para el caso 1, ver Figura 3.19, se puede apreciar que en las curvas representativas de esfuerzo- deformación de películas de PUUR, PUUK y Tecoflex®, los porcentajes de deformación máximo se encuentran dentro del límite reportado por la literatura (400 % y 1000 %) [17, 36]. De los materiales sintetizados para este estudio, PUUR presentó un comportamiento mecánico similar al polímero comercial Tecoflex®, mientras que PUUK presenta un comportamiento mucho más elastómerico ya que presenta mayores porcentajes de deformación a menores esfuerzos en comparación de PUUK y Tecoflex®. El módulo elástico a tensión longitudinal en películas (E_{LP}) fue calculado cómo el modulo tangencial a la curva entre 0% y 1% de deformación (como se muestra en el recuadro) mientras que el módulo secante fue calculado al 100 % de deformación.

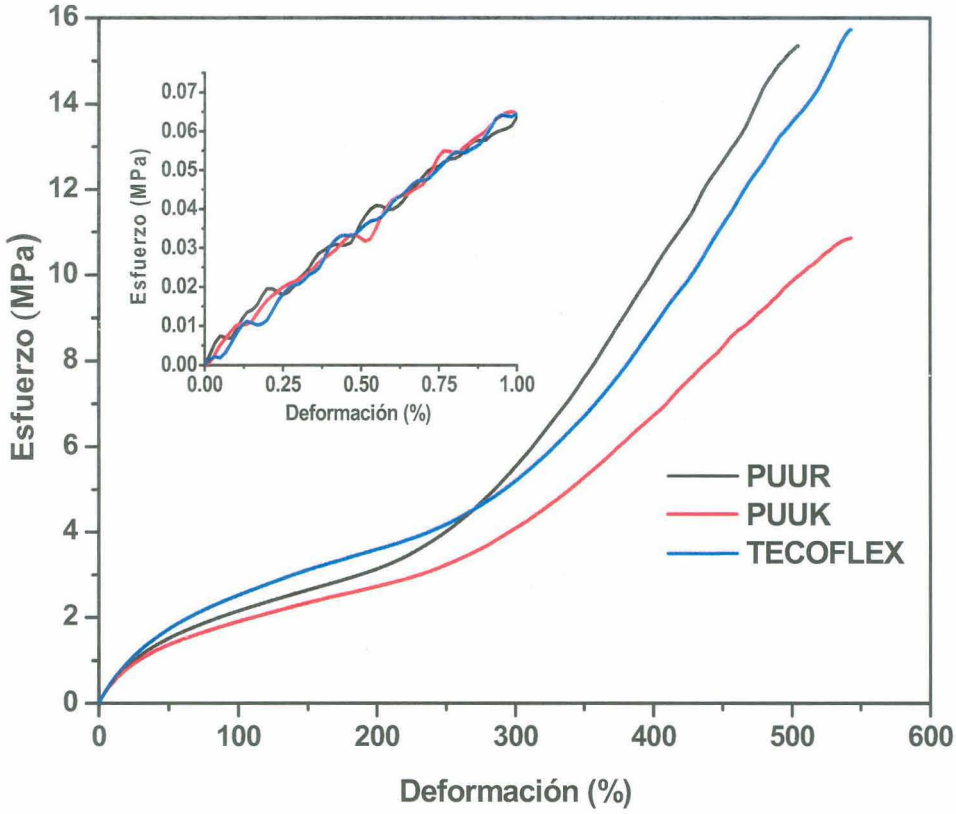

Figura 3.19 Curvas representativas esfuerzo-deformación para películas de PUUS y Tecoflex®.

Por otra parte, los resultados en la Tabla 3.3, el módulo elástico (E_{LP}) no varía significativamente entre ambos materiales sintetizados (PUUR y PUUK) debido a que ambos poseen similares porcentajes de segmentos flexibles (PCL), siendo estos segmentos los que responden de manera inmediata cuando son sometidos a cargas externas [39]. Sin embargo, el módulo elástico de PUUR y PUUK se encontró por debajo de lo reportado en otros trabajos de investigación. Por ejemplo Chung y colaboradores [21], han reportado injertos vasculares a base de PCL que promueven la proliferación celular con módulos elásticos de 9.34 ± 0.59 MPa. En el curso de este trabajo, también se observó que las propiedades como

$E_{100\%}$, σ_c (esfuerzo de cedencia) y σ_{rup} (esfuerzo de ruptura) decrecen en el siguiente orden Tecoflex®>PUUR>PUUK. Con base en esto, podemos sugerir que los extensores de cadena empleados en la síntesis de los poliuretanos tienen un efecto sobre dichas propiedades mecánicas. Por otra parte, las propiedades mecánicas del Tecoflex® proporcionadas por el fabricante se encuentra en el anexo 2.

Tabla 3.3 Propiedades mecánicas de películas de PUUS y Tecoflex®, n = 10

Material	E_{LP} (MPa)	$E_{100\%}$ (MPa)	σ_c (MPa)	σ_{rup} (MPa)	ε_{max} (%)
PUUR	6.42 ± 0.01	2.17 ± 0.33	0.181 ± 0.08	14.3 ± 1.6	504 ± 170
PUUK	6.31 ± 0.92	1.91 ± 0.49	0.139 ± 0.03	9.48 ± 1.27	521 ± 23
Tecoflex®	6.19 ± 0.01	2.50 ± 0.21	0.163 ± 0.04	14.4 ± 1.4	530 ± 168

E_{LP} = Módulo elástico a tensión longitudinal de películas.

Para el caso 2, ver Figura 3.20, se puede apreciar que en las curvas representativas de esfuerzo- deformación de tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex®, existe un comportamiento mecánico diferente en comparación con las propiedades mecánicas a tensión longitudinal en películas. Para este caso PUUR y PUUK presentaron porcentajes de deformación menores al Tecoflex® aunque su compartimiento mecánico continua siendo de carácter elastómerico. En la Tabla 3.4 se presentan las propiedades mecánicas a tensión longitudinal en tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex®, en donde el módulo elástico a tensión longitudinal en tubos (E_{LT}) para PUUR y Tecoflex® se determinó entre 0% y 1% de deformación, mientras que para PUUK la misma propiedad se determinó entre 0% y 0.5% de deformación (tal como se observa en el recuadro), mientras que el módulo secante fue calculado al 100 % de deformación.

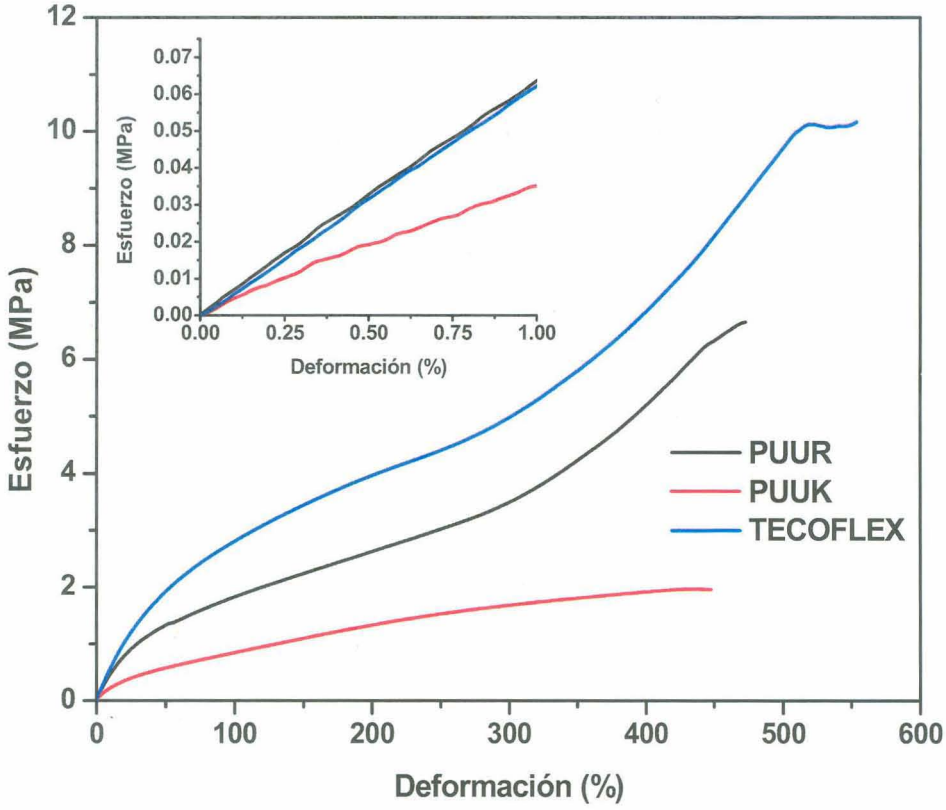

Figura 3.20 Curvas representativas esfuerzo-deformación para tubos de PUUS y Tecoflex®.

Por otra parte, los resultados presentados en la Tabla 3.4 muestran que PUUR y PUUK presentan un cambio en sus propiedades mecánicas en comparación con los resultados del caso 1 (películas a tensión longitudinal). A pesar que las propiedades mecánicas de los injertos vasculares elaborados en este trabajo son todavía mayores en comparación con las propiedades mecánicas de las arterias nativas (ver Tabla 1.1 y Tabla 1. 2) se puede destacar el hecho de que cambiar la geometría de una película delgada de PUUR y PUUK a una geometría tubular del mismo material se pueden modificar sus propiedades mecánicas. Es por ello, que el método para la elaboración de los injertos vasculares empleados en este trabajo

representa un gran avance para poder obtener injertos vasculares con propiedades mecánicas similares a las arterias nativas, ya que permite su modificación mecánica únicamente al transformar una película delgada en un injerto vascular tubular, sin la necesidad de mezclar diferentes polímeros. Un ejemplo de mezclar diferentes polímeros con la finalidad de modificar las propiedades mecánicas de injertos vasculares fue realizado por Xiao y colaboradores [45], en donde encontraron que las propiedades mecánicas de los injertos vasculares de PET/PU van disminuyendo con el aumento gradual del contenido de PU.

Tabla 3.4 Propiedades mecánicas de tubos de PUUS y Tecoflex® a tensión longitudinal, n = 10.

Material	E_{LT} (MPa)	$E_{100\%}$ (MPa)	σ_c (MPa)	σ_{rup} (MPa)	ε_{max} (%)
PUUR	5.53 ± 0.99	1.75 ± 0.24	0.291 ± 0.049	7.90 ± 1.97	564 ±60
PUUK	4.34 ± 0.55	0.836 ± 0.073	0.039 ± 0.008	1.70 ± 0.19	339 ±82
Tecoflex®	6.65 ± 1.25	2.83 ± 0.45	0.610 ± 0.110	11.1 ± 2	564 ±39

E_{LT} = Módulo elástico a tensión longitudinal en tubos.

3.4.3 Tensión circunferencial

El análisis de esta prueba mecánica está basado en la teoría de vigas curvas (aunque no es definido así en la norma ISO 7198), la cual determina que cuando un elemento curvo es sometido a una carga (ver Figura 2.8 (C)), se generan esfuerzos circunferenciales (σ_θ), esfuerzos radiales (σ_r) y esfuerzos cortantes ($\tau_{\theta r}$) [74]. Dichos esfuerzos pueden ser determinados por las ecuaciones:

$$\sigma_\theta = \frac{N}{A} + \frac{M(r_n - r)}{Aer} \tag{1.1}$$

$$\sigma_r = \frac{r_n}{Aet_1 r_1} * \frac{N(RA_1 - Q_1)}{r_1} \tag{3.2}$$

$$\boldsymbol{\tau_{\theta r} = \frac{Vr_n}{Aet_1\, r_1^2}\,(RA_1 - Q_1)} \tag{3.3}$$

Dónde: A y A_1 son áreas de la sección transversal, N y V son las cargas aplicada, M es el momento generado por la acción de la carga, r_n es la distancia medida desde el eje neutral al eje de revolución, R es el radio medio, r y r_1 es la distancia desde el eje de revolución hasta la fibra donde se desea calcular el esfuerzo, t y t_1 son el largo de las probetas, e es la excentricidad, Q y Q_1 son el primer momento de área según se muestra en la Figura 3.21.

Para el caso de nuestras probetas las cuales tienen una sección transversal rectangular, las constantes A, r_n y R se determinan de la siguiente manera:

$$A = ht \tag{3.4}$$

$$r_n = \frac{A}{\int_A dA/r} \tag{3.5}$$

$$\int_A dA/r = t\,\mathrm{In}\,\frac{a}{b} \tag{3.6}$$

$$R = b + \frac{h}{2} \tag{3.7}$$

Dónde: a es la distancia desde el eje de revolución hasta la parte más alejada de la sección transversal de la probeta, b es igual a la distancia desde el eje de revolución hasta la fibra más cercana de la probeta y h es el espesor de la probeta, ver Figura 3.21.

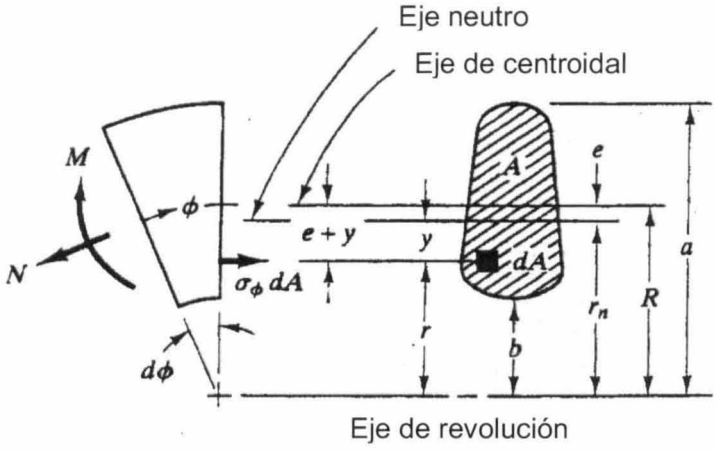

Figura 3.21 Distribución de la fuerza y momento circunferencial que actúan en una sección de una viga curva [74].

Ya que en esta prueba se generan diferentes esfuerzos (circunferenciales, radiales y cortantes) es necesario realizar un análisis de estados de los esfuerzos para poder determinar la magnitud y ubicación de los esfuerzos mencionados anteriormente. Por lo tanto, en la Figura 3.22 se presenta un cuarto de la probeta y se establecen 4 puntos de interés (a, b, c y d) en los cuales se determinaron los esfuerzos circunferenciales, radiales y cortantes en las probetas de PUUR, PUUK y Tecoflex®. Los resultados se presentan en la Tabla 3.5.

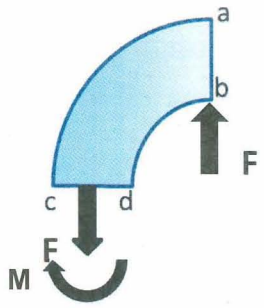

Figura 3.22 Puntos donde se determinaron los esfuerzos circunferenciales, radiales y cortantes.

Tabla 3.5 Resultados de los esfuerzos circunferenciales, radiales y cortantes de tubos de PUUS y Tecoflex®.

Material	σ_θ (GPa)	σ_r (MPa)	$\tau_{\theta r}$ (MPa)
En a			
PUUR	0	0	41.3 ± 4.6
PUUK	0	0	30.5 ± 4.0
Tecoflex®	0	0	73.8 ± 12.4
En b			
PUUR	0	0	41.3 ± 4.6
PUUK	0	0	30.5 ± 4.0
Tecoflex®	0	0	73.8 ± 12.4
En c			
PUUR	-0.832 ± 0.151	41.3 ± 4.6	0
PUUK	-0.613 ± 0.131	30.5 ± 4.0	0
Tecoflex®	-1.43 ± 0.33	73.8 ± 12.4	0
En d			
PUUR	0.985 ± 0.352	41.3 ± 4.6	0
PUUK	0.673 ± 0.245	30.5 ± 4.0	0
Tecoflex®	1.73 ± 0.38	73.8 ± 12.4	0

Con base en los resultados del análisis de estados de los esfuerzos presentados en la Tabla 3.5, podemos concluir que en el plano a y b únicamente

se presentan esfuerzos cortantes, mientras que en los puntos c y d se presentan esfuerzos circunferenciales y radiales, siendo para el punto c esfuerzos circunferenciales de compresión mientras que en el punto d esfuerzos circunferenciales de tensión. Por lo tanto, podemos concluir que la prueba mecánica a tensión circunferencial puede ser considerada como una prueba de estados de esfuerzos "puros" uniaxial ya que el esfuerzo circunferencial es el predominante a los esfuerzos radiales y cortantes. A su vez, el punto d puede ser considerado como el crítico para esta prueba debido a que en este punto se presenta la mayor magnitud del esfuerzo circunferencial en comparación con los demás puntos (a, b y c). Sobre esta base, en la Figura 3.23 se presentan las curvas representativas de los esfuerzos circunferenciales y deformaciones circunferenciales y en la Tabla 3.6 se presentan los resultados de esta prueba, en donde el módulo elástico a tensión circunferencial en tubos (E_{CT}) fue calculado como el módulo tangencial a la curva entre 0% y 1% de deformación (como se muestra en el recuadro) mientras que el módulo secante fue calculado al 100 % de deformación.

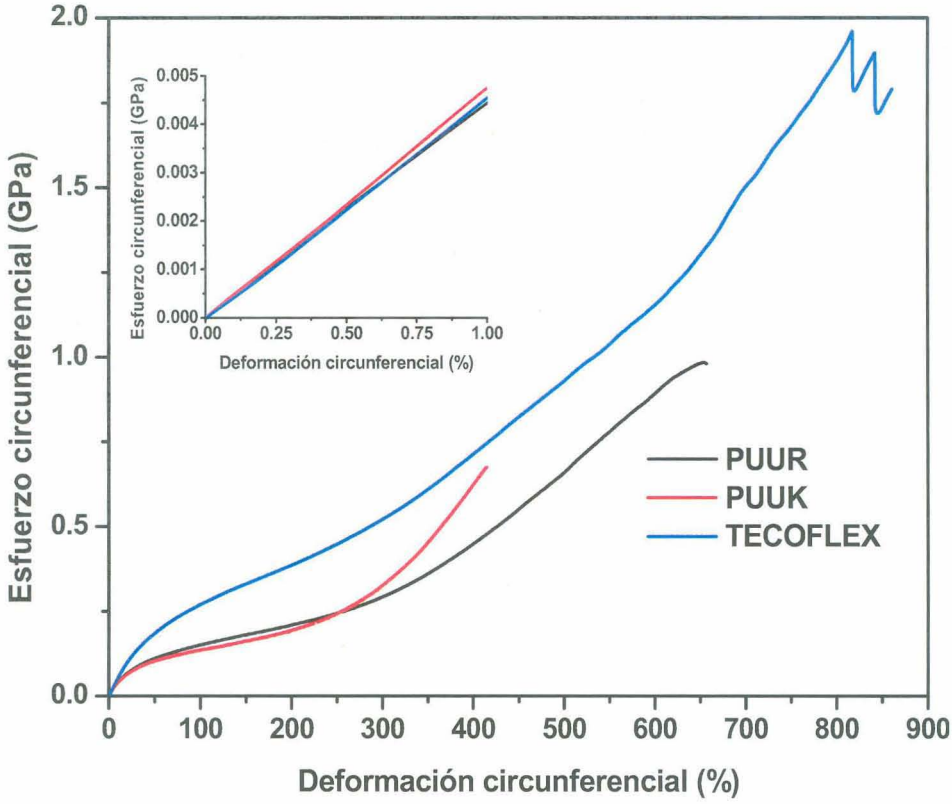

Figura 3.23 Curvas representativas de esfuerzo circunferencial - deformación circunferencial para tubos PUUS y Tecoflex®.

Tabla 3.6 Propiedades mecánicas para tubos de PUUS y Tecoflex® a tensión circunferencial, n = 10.

Material	E_{CT} (MPa)	E_{100} (MPa)	σ_c (MPa)	σ_{rup} (GPa)	ε_{max} (%)
PUUR	3.76 ± 0.77	152 ± 26	54.4 ± 11.5	0.985 ± 0.352	679 ±43
PUUK	4.44 ± 1	153 ± 34	49.6 ± 12.5	0.673 ± 0.245	396 ± 142
Tecoflex®	4.22 ± 1.34	259 ± 52	102 ± 18.3	1.73 ± 0.38	862 ± 130

E_{CT} = Módulo elástico a tensión circunferencial en tubos.

Tanto la teoría de vigas curvas como el análisis de los estados de esfuerzos realizado en este trabajo son considerados como innovadores ya que la norma ISO 7198 en la cual están basadas las pruebas mecánicas de este trabajo no contempla dicho análisis y únicamente establece reportar el esfuerzo circunferencial como la máxima fuerza entre dos veces la longitud original de la muestra.

Finalmente de los resultados en la Tabla 3.6 podemos mencionar que el módulo elástico a tensión circunferencial de PUUR, PUUK y Tecoflex®, disminuyen en comparación con el módulo elástico obtenido en las pruebas de tensión longitudinal tanto para el Caso 1 y Caso 2. Sin embargo, PUUK presenta un módulo elástico similar entre la prueba a tensión circunferencial y la prueba a tensión longitudinal del Caso 2. En la Tabla 3.7, se presenta el resumen de los módulos elásticos obtenidos entre las pruebas mecánicas a tensión longitudinal en películas (E_{LP}) y tubos (E_{LT}) así como en la prueba a tensión circunferencial (E_{CT}) comparados con algunas arterias humanas [14].

Tabla 3.7 Comparación entre E_{LP}, E_{LT} y E_{CT}.

Material	**Tensión longitudinal**		E_{CT} **(MPa)**
	E_{LP} **(MPa)**	E_{LT} **(MPa)**	
PUUR	6.42 ± 0.01	5.53 ± 0.99	3.76 ± 0.77
PUUK	6.31 ± 0.92	4.34 ± 0.55	4.44 ± 1
Tecoflex®	6.19 ± 0.01	6.65 ± 1.25	4.22 ± 1.34
Arteria femoral	NE	9	NE
Aorta torácica	NE	12	NE

NE = No encontrado en la literatura.

Con base en los resultados del módulo elástico obtenido de las diferentes pruebas mecánicas (longitudinal y circunferencial), ver Tabla 3.7, podemos mencionar que el valor máximo se presenta en las probetas en forma de película. Sin embargo, cuando la película de los materiales sintetizados en este trabajo es colocada alrededor de la varilla de teflón para obtener tubos del mismo material para ser ensayados tanto en tensión longitudinal y transversal, el módulo elástico disminuye un 14 % y 31.2% para PUUR, PUUK; respectivamente, para el ensayo a tensión longitudinal y un 42 %, 30 % para PUUR y PUUK respectivamente para el ensayo a tensión circunferencial. Por lo tanto, podemos señalar que los PUUS presentados en este trabajo sufren de anisotropía la cual es de carácter geométrico. Este comportamiento en un hecho positivo en la búsqueda de un injerto vascular ideal ya que las arterias nativas también presentan anisotropía. Por último, esta anisotropía geométrica puede ser considerada una ventaja respecto a otros trabajos que recurren a mezclar diferentes polímeros para poder modificar las propiedades mecánicas como por ejemplo el trabajo presentado por Xiao [49].

3.4.3 Resistencia a la sutura

La fuerza necesaria para tirar de una sutura quirúrgica (Nylon, 3-0) sin que se rompa a través de la pared de los injertos de PUUR, PUUK y Tecoflex®, es de 18.3 ± 3.6 N, 14 ± 2.3 N y 19.3 ± 3.4 N respectivamente, tal como se muestra en la Figura 3.24. Como se observa PUUK presentó la menor fuerza para esta prueba, sin embargo, esta fue mayor en comparación a la resistencia a la sutura en las arterias nativas 2.7 N [20, 29]. Es importante mencionar, que el procedimiento para unir un injerto vascular y una arteria nativa sigue siendo motivo de investigación, ya que al utilizar sutura esta daña a la túnica intima lo cual puede resultar en hiperplasia y depósito de plaquetas entre otros eventos. Algunas alternativas son utilizar grapas las cuales sujetan únicamente la túnica adventicia [75].

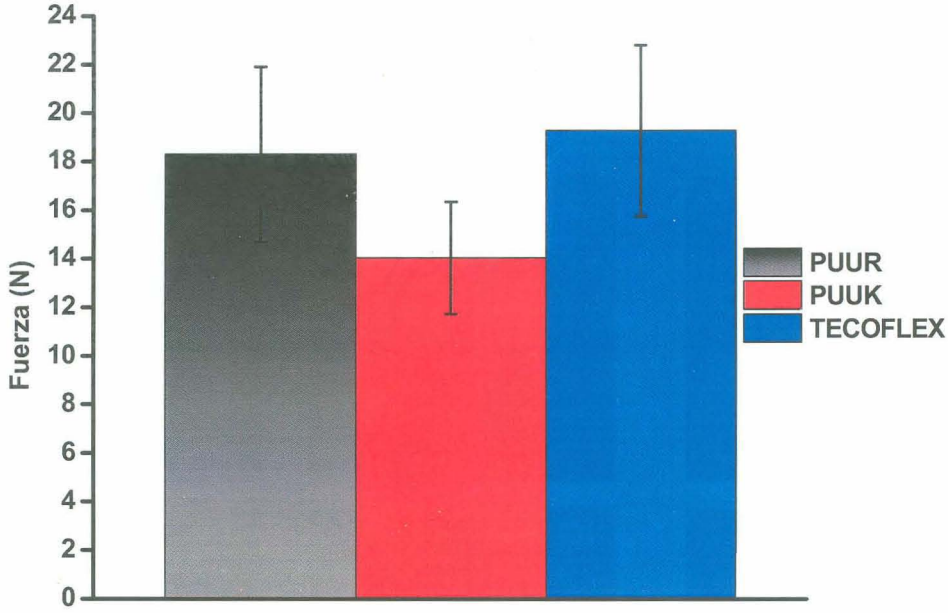

Figura 3.24 Fuerza necesaria para retirar una sutura a través de la pared de injertos de PUUS y Tecoflex®, n = 10.

3.5 Estudios de biocompatibilidad

Comprender la relación entre la superficie, adhesión y proliferación celular es esencial para el diseño de superficies de materiales óptimos para la regeneración vascular y en general para la ingeniería de tejidos [55]. En la Figura 3.25 (A, B y C) se presentan los resultados del cultivo celular de fibroblastos de embrión de ratón sobre películas de PUUR, PUUK y Tecoflex®, respectivamente y en la Figura 3.25 (D, E y F) sobre la superficie exterior de los mismos materiales. Con base en estos resultados podemos mencionar que las películas de PUUK permitieron la adhesión de los fibroblastos. Sin embargo, es importante resaltar que la actividad metabólica celular sobre la superficie exterior de los injertos de PUUR y PUUK mostró un patrón de crecimiento en la dirección longitudinal de los mismos. Este

patrón de crecimiento puede ser debido a los cambios morfológicos de los materiales generados en el proceso de elaboración de los injertos vasculares y que fueron observados por medio de SEM (Figura 3.11 A y C).

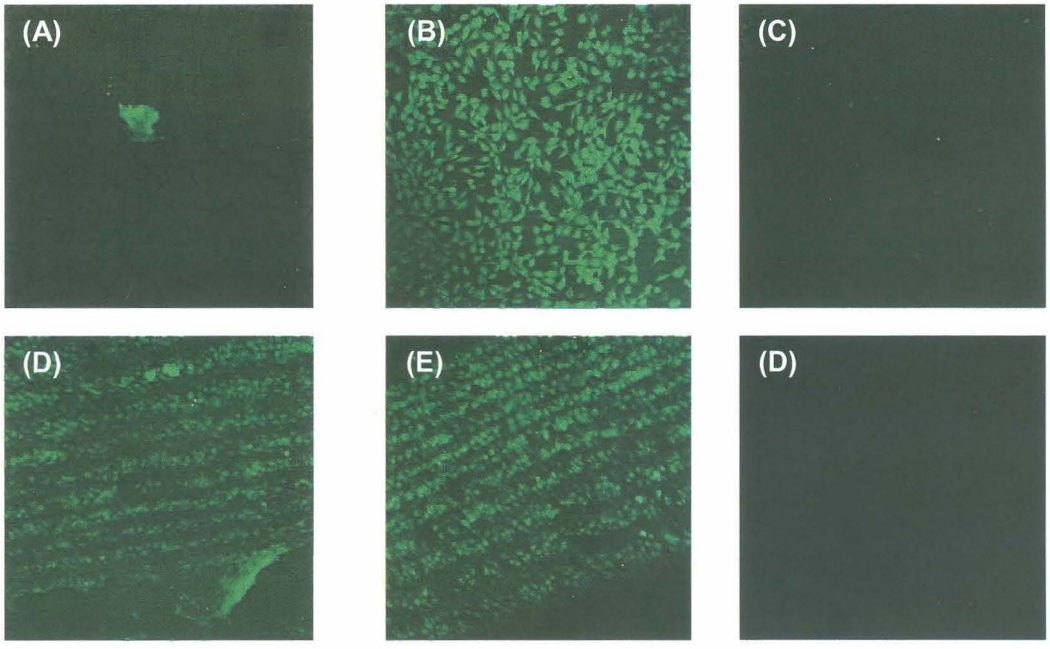

Figura 3.25 Fibroblastos de ratón a 3 días de cultivo en: películas (A, B y C) y superficies exteriores de tubos (D, E y F) de PUUR, PUUK y Tecoflex®.

En estudios previos sobre el crecimiento celular en injertos vasculares con patrones topográficos definidos, por ejemplo en injertos vasculares elaborados por electrospinning, se observa que al alinear las fibras poliméricas en dirección circunferencial las células endoteliales proliferaron en esta dirección [21]. Sin embargo, existen estudios que sugieren que grupos funcionales sobre la superficie aumentan considerablemente la adhesión y proliferación de fibroblastos mientras que otros estudios muestran que la mojabilidad es un factor muy importante para la adhesión celular [8]. La alineación de las fibras es un factor clave para la

adhesión y proliferación celular, como ha sido reportado por Wong y colaboradores [14], quienes lograron alinear fibras de PU mezclado con elastina y colágeno alcanzando una mejor proliferación celular de SMC además de imitar la estructura de un vaso sanguíneo.

En este trabajo se ha encontrado que la topografía inducida en la superficie exterior de los injertos elaborados en este trabajo favorece a la adhesión de los fibroblastos, convirtiendo a estos PUUS en candidatos potencial para ser utilizados como injertos vasculares al permitir el crecimiento de los fibroblastos en un intento de imitar la estructura anatómica de una arteria humana sin la necesidad de recibir ninguna modificación química y sin la necesidad de mesclar nuestros PUUS con otros polímeros.

CONCLUSIONES

Los resultados de FTIR confirmó que la síntesis de los PUUS, empleando aminoácidos de L-Arginina y L-lisina como extensores de cadena y pre polímero a base de poli-ε-caprolactona diol y 4,4'-metilen bis ciclohexil diisocianato, fue llevada a cabo ya que presentó picos característicos de la síntesis. Con estos materiales sintetizados fue posible obtener películas delgadas y con ellas injertos vasculares de bajo calibre (< 6 mm de diámetro); a través de enrollar las películas alrededor de una varilla de Teflón.

Por otra parte, los difractogramas de rayos X determinó que los PUUS sintetizados pueden ser considerados como polímeros semicristalinos ya que presentan un solo pico cristalino a $2\theta = 19.88°$, atribuido al segmento flexible (PCL), mientras que sus temperaturas de fusión se encuentra entre 49.6 °C y 47.8°C para PUUR y PUUK respectivamente, de acuerdo a los resultados de DSC. Mediante el análisis termogravimétrico se determinó que PUUR es más estable térmicamente en comparación con PUUK, debido a que éste posee mayor peso molecular en peso.

Las imágenes obtenidas por SEM confirmaron que existen diferencia topográfica entre las películas y las superficies externas e internas de los injertos vasculares de PUUR, PUUK y Tecoflex®. En particular, se observó que en la superficie exterior de PUUR y PUUK, existe una orientación en dirección longitudinal de los injertos. Estos cambios topográficos fueron confirmados por medio de AFM, donde se observó que la rugosidad de PUUK en la superficie exterior fue menor en comparación con su rugosidad interior (0.121 μm vs. 0.310 μm).

La caracterización mecánica, realizada en películas (tensión longitudinal) y en tubos (tensión longitudinal y circunferencial), demostró que el módulo elástico fue modificado dependiendo de la geometría de la probeta y la ubicación de la posición de la carga aplicada. Es decir, los poli (uretano-ureas) segmentados sintetizados en este trabajo presentaron anisotropía geométrica.

Especialmente en la caracterización mecánica a tensión circunferencial de los tubos de PUUS, se utilizó la teoría de vigas curvas, revelando que el esfuerzo circunferencial es el predominante para este ensayo. Por lo tanto, se asume que este ensayo es considerado como uniaxial. En particular, este análisis mecánica es considerado como una contribución innovadora debido que la norma ISO 7198 destinada para prótesis vasculares no contempla este tipo análisis.

Los estudios de biocompatibilidad con fibroblastos de embrión de ratón indicaron que, la adhesión celular en PUUR y PUUK es paralela a las alineaciones longitudinales de la superficie exterior de estos tubos. Este hecho es considerado como alentador en la búsqueda de un injerto vascular que logre reproducir la anatomía vascular de las arterias y que además permita controlar la orientación celular.

SUGERENCIAS

Con base en las propiedades obtenidas de los tubos de los PUUS sintetizados en este trabajo se recomienda variar las concentraciones de los segmentos rígidos y flexibles con la finalidad de obtener propiedades mecánicas similares a las arterias nativas.

Se sugiere ampliar la caracterización mecánica por medio de pruebas como son la complianza, fatiga (carga y descarga, simulando condiciones mecánicas en el medio biológico de las arterias), resistencia a la explosión.

Realizar estudios de degradación in vitro tanto en la geometría de películas y tubos de los PUUS, bajo condiciones hidrolíticas, oxidativas y enzimáticas; simulando las condiciones fisiológicas y analizando los productos de degradación.

Realizar estudios de cultivo celular y llevar a cabo la cuantificación, adhesión y proliferación celular.

ANEXOS

Anexo 1 Espesores de películas y tubos de PUUR, PUUK y Tecoflex®

Material	Espesor de película (mm)	Espesor de pared (mm)	Diámetro interior (mm)	Diámetro exterior (mm)
PUUR	0.11 ± 0.01	0.58 ± 0.05	5.46 ± 0.06	6.62 ± 0.05
PUUK	0.11 ± 0.01	0.56 ± 0.08	5.46 ± 0.06	6.58 ± 0.07
Tecoflex®	0.12 ± 0.01	0.67 ± 0.14	5.46 ± 0.06	6.80 ± 0.10

Anexo 2 Propiedades mecánicas del Tecoflex® SG 80A

Material	Prueba ASTM	TECOFLEX® SG 80A
Dureza Shore	D2240	72A
Peso específico	D792	1.04
Módulo a flexión (MPa)	D790	6.89
Limite a la tracción (MPa)	D412	39.98
Elongación última (%)	D412	660
Esfuerzo (MPa)		
a 100% de elongación	D412	2.06
a 200% de elongación	D412	3.44
a 300% de elongación	D412	5.51
Contracción en el molde (in/in)	D955	.008-.012

BIBLIOGRAFÍA

[1] "Organización Mundial de la Salud," 2013. [Online]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es. Visto el 14 de Octubre a las 20:29 h.

[2] A. Sambola, V. Fuster, and J. José, "Papel de los factores de riesgo en la trombogenicidad sanguínea y los síndromes coronarios agudos," vol. 56, no. 10, pp. 1001–1009, 2013.

[3] N. L'Heureux, N. Dusserre, A. Marini, S. Garrido, L. de la Fuente, and T. McAllister, "Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts--from research to clinical practice.," *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, vol. 4, no. 7, pp. 389–95, Jul. 2007.

[4] P. D. Orléans-juste, D. Lacroix, L. Germain, and F. Auger A, "Tissue-Engineered Vascular Substitutes: New Models Toward Successful Small Diameter Grafts," in *Advances in Vascular Medicine*, 2010th ed., D. Abraham, H. Clive, M. Dashwood, and G. Coghlan, Eds. Canadá: Springer London, 2010.

[5] J. I. Moo Espinosa, "Obtención de nanocompuestos de poliuretano y montmorillonitas funcionalizadas con uso potencial para aplicaciones cardiovasculares," Tesis de Licenciatura para el grado de Químico Industrial, Universidad Autónoma de Yucatán, 2007.

[6] S. Ravi, Z. Qu, and E. L. Chaikof, "Polymeric Materials for Tissue Engineering of Arterial Substitutes," *Vascular*, vol. 17, no. Supplement 1, pp. S45–S54, Jun. 2009.

[7] J. Han, B. Chen, L. Ye, A. Zhang, J. Zhang, and Z. Feng, "Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane based on poly(ε-caprolactone) and L-lysine ethyl ester diisocyanate," *Frontiers of Materials Science in China*, vol. 3, no. 1, pp. 25–32, Jan. 2009.

[8] L. H. Chan Chan, "Síntesis, caracterización, degradación y evaluación biológica de poli(uretano urea)s segmentados biodegradables a base de aminoácidos," Tesis de posgrado para el grado de Doctor en Ciencias en Materiales Poliméricos, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., 2012.

[9] Y. Liu, J. Chen, Y. Yang, and F. Wu, "Improved blood compatibility of poly (ethylene terephthalate) films modified with L-arginine," *Journal of Biomaterials Science*, vol. 19, no. 4, pp. 37–41, 2012.

[10] S. Lavi, D. E. Kandzari, and W. G. Barsness, "Epidemiology of Cardiovascular Disease and Refractory Angina," in *Coronary artery disease new approaches without traditional revascularization*, W. G. Barsness and R. D. Holmes, Eds. London: Springer-Verlag London Limited 2012, 2012, pp. 1–183.

[11] L. A. Pruitt and A. M. Chakravartula, "Cardiovascular devices," in *Mechanics of biomaterials fundamental principles for implant design*, Firts Edit., L. A. Pruitt and A. M. Chakravartula, Eds. Cambridge: Cambridge University Press, 2011, pp. 1–645.

[12] S. Baudis, S. C. Ligon, K. Seidler, G. Weigel, C. Grasl, H. Bergmeister, H. Schima, and R. Liska, "Hard-block degradable thermoplastic urethane-elastomers for electrospun vascular prostheses," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 50, no. 7, pp. 1272–1280, Apr. 2012.

[13] C. C. Shirodaria and K. M. Channon, "Nitric oxide and vascular disease," *Surgery (Oxford)*, vol. 25, no. 4, pp. 145–149, Apr. 2007.

[14] C. S. Wong, X. Liu, Z. Xu, T. Lin, and X. Wang, "Elastin and collagen enhances electrospun aligned polyurethane as scaffolds for vascular graft.," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 24, no. 8, pp. 1865–74, Aug. 2013.

[15] J. Herrmann and A. Lerman, "Coronary artery disease: development and progression," in *Coronary artery disease new approaches without traditional revascularization*, W. G. Barsness and R. D. Holmes, Eds. London: Springer-Verlag London Limited 2012, 2012, pp. 21–28.

[16] J. E. Puskas and Y. Chen, "Biomedical application of commercial polymers and novel polyisobutylene-based thermoplastic elastomers for soft tissue replacement.," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 1141–54, 2004.

[17] J. M. Lee and G. J. Wilson, "Anisotropic tensile viscoelastic properties of vascular graft materials tested at low strain rates.," *Biomaterials*, vol. 7, no. 6, pp. 423–31, Nov. 1986.

[18] I. G. Kidson, "The effect of wall mechanical properties on patency of arterial grafts.," *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, vol. 65, no. 1, pp. 24–9, Jan. 1983.

[19] S. Venkatraman, F. Boey, and L. L. Lao, "Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, no. 9, pp. 853–874, Sep. 2008.

[20] V. Barron, E. Lyons, C. Stenson-Cox, P. E. McHugh, and a. Pandit, "Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, no. 9, pp. 1017–1030, Oct. 2003.

[21] S. Chung, N. P. Ingle, G. a Montero, S. H. Kim, and M. W. King, "Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning.," *Acta biomaterialia*, vol. 6, no. 6, pp. 1958–67, Jun. 2010.

[22] F. J. Monteiro and J. San Roman, "Biomateriales: Introducción y desarrollo histórico," in *Biomateriales*, Firts Edit., R. Sastre, S. de Aza, and J. San Roman, Eds. Italy: Faenza Editrice Iberica S.L., 2004, pp. 1–552.

[23] M. A. Lizarbe, "Sustitutivos de tejidos : de los biomateriales a la ingeniería tisular," *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.*, vol. 101, pp. 227–249, 2007.

[24] C. B. Weinberg and E. Bell, "A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells," *Science*, vol. 231, no. 4736, pp. 397–400, 1986.

[25] N. L'Heureux, L. Germain, R. Labbé, and F. a Auger, "In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study.," *Journal of vascular surgery*, vol. 17, no. 3, pp. 499–509, Mar. 1993.

[26] L. E. Niklason and R. S. Langer, "Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues.," *Transplant immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 303–6, Dec. 1997.

[27] T. Shinoka, D. Shum-Tim, P. X. Ma, R. E. Tanel, N. Isogai, R. Langer, J. P. Vacanti, and J. E. Mayer, "Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering.," *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 115, no. 3, pp. 536–45, Mar. 1998.

[28] N. L'Heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, and F. a Auger, "A completely biological tissue-engineered human blood vessel.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 47–56, Jan. 1998.

[29] L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, and R. Langer, "Functional arteries grown in vitro.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 284, no. 5413, pp. 489–93, Apr. 1999.

[30] T. Nishibe, S. O'Donnel, E. Pikoulis, Y. Okuda, T. Kumada, F. Kudo, and K. Yasuda, "Effects of fibronectin bonding on healing of high porosity expanded

polytetrafluoroethylene grafts in pigs," *The Journal of Cardiovascular Surgery*, vol. 42, no. 5, pp. 667–673, 2001.

[31] C. Li, A. Hill, and M. Imran, "In vitro and in vivo studies of ePTFE vascular grafts treated with P15 peptide," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 16, no. 7, pp. 875–891, 2010.

[32] D. Annis, A. Bornat, O. Edwards, A. Higham, B. Loveday, and J. Wilson, "An Elastomeric Vascular Prosthesis," *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, vol. 24, pp. 209– 214, 1978.

[33] J. Boretos and W. Pierce, "Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 158, no. 3807, pp. 1481–1482, 1967.

[34] S. A. Guelcher, "Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine," *Tissue Engineering Part B: Reviews. March*, vol. 14, no. 1, pp. 3–17, 2008.

[35] C. Williams and R. T. Tranquillo, "Engineering of small diameter vessels," in *Principles of regenerative medicine*, Firts Edit., A. Atala, R. Lanza, and J. A. Thomson, Eds. USA: Academic Press, 2008, pp. 1000–1020.

[36] L. Xu, P. Soman, A. Agnihotri, and C. A. Siedlecki, "Atomic Force Microscopy Methods for Characterizing Protein Interactions with Microphase-Separated Polyurethane Biomaterials," in *Biological Interactions on Materials Surfaces*, D. A. Puleo and R. Bizios, Eds. New York, NY: Springer US, 2009, pp. 43–67.

[37] Z. You and Y. Wang, *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Vienna: Springer Vienna, 2011, pp. 75–118.

[38] B. D. Ulery, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Biomedical Applications of Biodegradable Polymers.," *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics*, vol. 49, no. 12, pp. 832–864, Jun. 2011.

[39] S. Dumitriu, *Polymeric biomaterials*, Second. New York: Marcel Dekker, 2002, pp. 1–1184.

[40] G. R. da Silva, A. da Silva-Cunha, F. Behar-Cohenb, E. Ayrese, and R. L. Oréficee, "Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 4, pp. 491–499, 2010.

[41] R. Heijkants, R. van Calck, T. van Tienen, J. de Groot, P. Buma, A. Pennings, R. Veth, and A. Schouten, "Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(-caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard," *Biomaterials*, vol. 26, no. 20, 2005.

[42] Y. Zhang, R. T. Tran, I. S. Qattan, Y.-T. Tsai, L. Tang, C. Liu, and J. Yang, "Fluorescence imaging enabled urethane-doped citrate-based biodegradable elastomers.," *Biomaterials*, vol. 34, no. 16, pp. 4048–56, May 2013.

[43] Technical Boletin, "The Use of Polyurethanes In Medical Device Applications," USA, 2001.

[44] M. G. Jeschke, V. Hermanutz, S. E. Wolf, and G. B. Köveker, "Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene.," *Journal of vascular surgery*, vol. 29, no. 1, pp. 168–76, Jan. 1999.

[45] A. M. Seifalian, H. J. Salacinski, A. Tiwari, A. Edwards, S. Bowald, and G. Hamilton, "In vivo biostability of a poly(carbonate-urea)urethane graft," *Biomaterials*, vol. 24, no. 14, pp. 2549–2557, Jun. 2003.

[46] L. Zhang, J. Zhou, Q. Lu, Y. Wei, and S. Hu, "A Novel Small-Diameter Vascular Graft : In Vivo Behavior of Biodegradable Three-Layered Tubular Scaffolds," vol. 99, no. 4, pp. 1007–1015, 2008.

[47] M. Yeganegi, R. a Kandel, and J. P. Santerre, "Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity.," *Acta biomaterialia*, vol. 6, no. 10, pp. 3847–55, Oct. 2010.

[48] H. Wang, Y. Feng, M. Behl, A. Lendlein, H. Zhao, R. Xiao, J. Lu, L. Zhang, and J. Guo, "Hemocompatible polyurethane/gelatin-heparin nanofibrous scaffolds formed by a bi-layer electrospinning technique as potential artificial blood vessels," *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 5, no. 3, pp. 392–400, Jun. 2011.

[49] S. Xiao, W. Xu, and H. Ma, "Fabrication and characterization of mechano-modulated PET/BPU nanofibrous mats as potential vascular grafts materials," *Fibers and Polymers*, vol. 13, no. 5, pp. 618–625, Jun. 2012.

[50] H. Wang, Y. Feng, B. An, W. Zhang, M. Sun, Z. Fang, W. Yuan, and M. Khan, "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*, vol. 23, no. 6, pp. 1499–510, Jun. 2012.

[51] R. B. Preli, K. P. Klein, and D. M. Herrington, "Vascular effects of dietary L-arginine supplementation.," *Atherosclerosis*, vol. 162, no. 1, pp. 1–15, May 2002.

[52] Lubrizol Company., "Tecoflex Solution Grade 80A," 2013.

[53] M. Bil, J. Ryszkowska, P. Woźniak, K. J. Kurzydłowski, and M. Lewandowska-Szumieł, "Optimization of the structure of polyurethanes for bone tissue engineering applications.," *Acta biomaterialia*, vol. 6, no. 7, pp. 2501–10, Jul. 2010.

[54] G. Odian, *Principles of polymerization*, Fourth. University of New York: A JOHN WILEY & SONS, INC., 2004, pp. 1–776.

[55] K. Webb, V. Hlady, and P. A. Tresco, "Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization," vol. 41, no. 3, pp. 422–430, 2009.

[56] C. Lozano Perez, "Efecto del extensor de cadena en los poliuretanos biodegradables para su regeneracion ósea," Instituto Tecnológico de Mérida, Tesis en de licenciatura en Ingeniero Químico, 2012.

[57] S. Zhang, Z. Ren, S. He, Y. Zhu, and C. Zhu, "FTIR spectroscopic characterization of polyurethane-urea model hard segments (PUUMHS) based on three diamine chain extenders.," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, vol. 66, no. 1, pp. 188–93, Jan. 2007.

[58] I. Yilgor, E. Yilgor, I. G. Guler, T. C. Ward, and G. L. Wilkes, "FTIR investigation of the influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes," *Polymer*, vol. 47, no. 11, pp. 4105–4114, May 2006.

[59] M. van der Schuur, B. Noordover, and R. J. Gaymans, "Polyurethane elastomers with amide chain extenders of uniform length," *Polymer*, vol. 47, no. 4, pp. 1091–1100, Feb. 2006.

[60] P. Donal L, L. Gary M, and K. George S, *Introduction to Spectroscopy*, Third edit. Departament of Chemistry, Bellingham Washington: Thomson learning, 2001, pp. 1–579.

[61] K. D. Kavlock, T. W. Pechar, J. O. Hollinger, S. a Guelcher, and A. S. Goldstein, "Synthesis and characterization of segmented poly(esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering.," *Acta biomaterialia*, vol. 3, no. 4, pp. 475–84, Jul. 2007.

[62] W. Han, M. Tu, R. Zeng, J. Zhao, and C. Zhou, "Preparation, characterization and cytocompatibility of polyurethane/cellulose based liquid crystal composite membranes.," *Carbohydrate polymers*, vol. 90, no. 3, pp. 1353–61, Oct. 2012.

[63] M. S. S. B. Monteiro, F. V. Chávez, P. J. Sebastião, and M. I. B. Tavares, "1H NMR relaxometry and X-ray study of PCL/nevirapine hybrids," *Polymer Testing*, vol. 32, no. 3, pp. 553–566, May 2013.

[64] L. H. Chan Chan, "Sintesis y caracterización de poliuretanos biodegradables tiolados," Tesis de posgrado para el grado en Maestro en Ciencias en Materiales Pliméricos, Centro de Investigacion Científica de Yucatán A. C., 2008.

[65] J. V Cauich-rodríguez, L. H. Chan-chan, F. Hernandez-sánchez, and J. M. Cervantes-uc, "Degradation of Polyurethanes for Cardiovascular Applications," in *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, 2012, pp. 52–82.

[66] J. F. Nigenda Morales, "Síntesis de poliuretanos porosos parcialmente degradables para uso potencial en aplicaciones cardiovasculares," Tesis de Licenciatura para el grado de Químico Industrial, Universidad Autónoma de Yucatán, 2010.

[67] T. Yaguchi, a. Funakubo, T. Okoshi, Y. Noishiki, and Y. Fukui, "Fabrication of small-diameter polyurethane vascular grafts with microporous structure," *Journal of Artificial Organs*, vol. 5, no. 2, pp. 117–122, Jun. 2002.

[68] H. Chen, T. Tang, and a. Amirfazli, "Fabrication of polymeric surfaces with similar contact angles but dissimilar contact angle hysteresis," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 408, pp. 17–21, Aug. 2012.

[69] D. Filip, S. Vlad, and D. Macocinschi, "Surface analysis of some amphiphile polyurethanes," *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, vol. 11, no. 5, pp. 681–688, 2009.

[70] M. Meincken, a. Klash, S. Seboa, and R. D. Sanderson, "Influence of the viscosity and the substrate on the surface hydrophobicity of polyurethane coatings," *Applied Surface Science*, vol. 253, no. 2, pp. 805–809, Nov. 2006.

[71] R. W. Fitzgerald, "Mecánica de Materiales," R. W. Fitzgerald, Ed. USA: Alfaomega, 2007, pp. 1–578.

[72] G. J. Fallick and R. Nielson, "Liquid Chromatography of Polymers," in *Handbook of Plastics Analysis*, H. Lobo and J. V Bonilla, Eds. New York, USA: Marcel Dekker, Inc, 2003.

[73] J. H. Lee, Y. M. Ju, and D. M. Kim, "Platelet adhesion onto segmented polyurethane film surfaces modified by addition and crosslinking of PEO-containing block copolymers," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 683–691, 2000.

[74] R. D. Cook and W. C. Young, "Curved Beams," in *Advanced Mechanical of Materials*, Second Edi., H. Marcia, Ed. New Jersey: , 1999, pp. 1–477.

[75] A. Leppäniemi, D. Wherry, E. Pikoulis, H. Hufnagel, C. Waasdorp, N. Fishback, and N. Rich, "Arterial and venous repair with vascular clips: comparison with suture closure.," *Journal of vascular surgery*, vol. 26, no. 1, pp. 24–8, Jul. 1997.