



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN A.C.

POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
POLIURETANOS SEGMENTADOS A BASE DE
L-GLUTAMÍN Y LOS AMINOÁCIDOS QUE LO
FORMAN COMO EXTENSORES DE CADENA:
EVALUACIÓN DE HEMOCOMPATIBILIDAD Y
BIOCOMPATIBILIDAD CON CÉLULAS
ENDOTELIALES**

TESIS PRESENTADA POR

JOSÉ LUIS ADRIÁN PERALES ALCACIO

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS DE MATERIALES
POLIMÉRICOS**

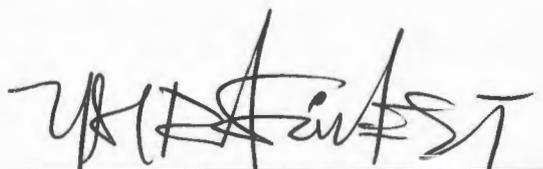


Mérida, Yucatán a Julio de 2013

Mérida, Yucatán, México; a 9 de Julio de 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación 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 a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



José Luis Adrián Perales Aicacio



RECONOCIMIENTO

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

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIURETANOS SEGMENTADOS A BASE DE L-GLUTATIÓN Y LOS AMINOÁCIDOS QUE LO FORMAN COMO EXTENSORES DE CADENA: EVALUACIÓN DE HEMOCOMPATIBILIDAD Y BIOCAMPATIBILIDAD CON CÉLULAS ENDOTELIALES,

perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias de Materiales Poliméricos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 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

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado mediante la beca 27453.

Un especial reconocimiento al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia del Hospital del Niño Morelense por su constante apoyo, y por la capacitación en la parte experimental de cultivo celular de éste trabajo. Hago extensivo el agradecimiento a los compañeros de la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular (UDMM) por su incondicional apoyo.

Agradezco también al Dr. J. Manuel Cervantes Uc por su apoyo y asesoría en diversos aspectos de éste trabajo, y por su calidad humana durante mi estancia en el CICY.

Al Dr. Juan V. Cauich Rodríguez por la dirección de éste trabajo y por la oportunidad que me brindó al añadir una experiencia más a mi vida profesional.

ÍNDICE	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	v
Glosario de términos	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO 1	
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
Antecedentes	4
1.1 Estructura de los vasos sanguíneos	6
1.2 La Ingeniería de Tejidos y su aplicación en sistemas vasculares	8
1.3 Injertos vasculares de bajo calibre	10
1.4 El poliuretano	12
1.4.1 Química del poliuretano	16
1.4.2 Modificación superficial y estructural	14
1.4.3 Poliuretanos biodegradables	16
1.4.4 Aminoácidos y péptidos como extensores de cadena	18
1.5 Justificación	21
1.6 Hipótesis	21
1.7 Objetivos	21

CAPITULO 2

<u>MATERIALES Y MÉTODO</u>	22
2.1 Descripción del procedimiento de síntesis.....	23
2.2 Caracterización fisicoquímica y mecánica.....	27
2.2.1 Solubilidad.....	27
2.2.2 Ángulo de contacto.....	27
2.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo con Derivada de Fourier (FTIR).....	27
2.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	28
2.2.5 Determinación de peso molecular por (GPC).....	28
2.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	28
2.2.7 Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	28
2.2.8 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	28
2.2.9 Difracción de Rayos X (DRX).....	29
2.2.10 Pruebas Mecánicas a Tensión.....	29
2.2.11 Degradación acelerada.....	29
2.3 Evaluación de la Hemocompatibilidad.....	29
2.3.1 Método de Lee-White y tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT).....	29
2.3.2 Evaluación de activación de plaquetas por citometría de flujo.....	30
2.4 Biocompatibilidad con células endoteliales.....	32

CAPITULO 3

<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	33
3.1 Caracterización por FTIR.....	33
3.2 Cromatografía de permeación en gel (CPG).....	37
3.3 Caracterización Térmica de Poliuretanos Segmentados.....	38
3.3.1 Determinación de la temperatura de fusión en DSC.....	38
3.3.2 Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	40
3.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	42
3.4 Análisis por difracción de rayos X (DRX).....	44
3.5 Pruebas Mecánicas a Tensión.....	46
3.6 Micrografías SEM para análisis superficial.....	47
3.7 Degradación acelerada.....	48

3.8 Ángulo de contacto.....	50
3.9 Hemocompatibilidad.....	51
3.10 Citocompatibilidad con células endoteliales (HUVECs).....	54
Conclusiones.....	57
Trabajo a futuro.....	58
Bibliografía.....	58

Lista de tablas

Tabla 1.1- Requerimientos de un injerto de vaso sanguíneo sintético.....	9
Tabla 2.1- Rendimiento de la reacción de obtención de PU y su análisis elemental.....	27
Tabla 3.1- Propiedades fisicoquímicas de los poliuretanos.....	41
Tabla 3.2- Propiedades Mecánicas de los poliuretanos.....	46
Tabla 3.3- Pérdida de masa de poliuretanos después de la degradación en diferentes medios.....	50
Tabla 3.4- Pérdida de masa de SPU's en NaOH a 37°C en estado estático.....	51
Tabla 3.5 Hemocompatibilidad y adhesión de HUVEC sobre poliuretanos.....	52

Lista de figuras

Figura 1.1 Las diferentes capas celulares que conforman la estructura de los vasos sanguíneos: a) arteria, y b) vena.....	5
Figura 1.2 Clasificación de las arterias.....	6
Figura 1.3 Clasificación de las venas.....	6
Figura 1.4 Estructura de la Ingeniería de Tejidos.....	10
Figura 1.5 Reacción de obtención de uretano.....	13
Figura 1.6 Reacción de obtención de poliuretano.....	13
Figura 1.7 Reacciones secundarias que pueden producirse con el isocianato en la síntesis de poliuretano.....	14
Figura 1.8 Estructuras del Glutati6n y sus amino6cidos L-6cido glut6mico, L-ciste6na y glicina.....	21
Figura 2.1 Diagrama de bloques del procedimiento para la obtenci6n de poliuretanos segmentados por el m6todo de dos etapas.....	23
Figura 2.2 Esquema de la ruta de s6ntesis de poliuretanos segmentados por el m6todo de dos etapas.....	26
Figura 2.3 Probables reacciones de entrecruzamiento en la s6ntesis de poliuretano de acuerdo al extensor de cadena empleado.....	27
Figura 2.4 Selecci6n de la poblaci6n de plaquetas con CD61 FITC.....	32
Figura 3.1 Espectros FTIR de SPU sintetizados con diferente extensor de cadena....	35
Figura 3.2 Seguimiento de la s6ntesis de poliuretano con glutati6n como extensor de cadena.....	36
Figura 3.3 A) Compuestos modelo (diisocianato-extensor de cadena): L-glutati6n, L-6cido glut6mico, L-ciste6na, glicina, y el control BDA. B) Ampliaci6n de la regi6n de carbonilos.....	37
Figura 3.4 Espectros del compuesto modelo HMDI-Glutati6n y de los compuestos individuales que lo forman.....	38
Figura 3.5 Termogramas de la serie de SPU con diferente extensor de cadena.....	40
Figura 3.6 An6lisis din6mico-mec6nico de la serie de SPU con diferente extensor de cadena, a) M6dulo de almacenamiento y b) Tan δ	42
Figura 3.7 Termogramas de an6lisis gravim6trico de la serie de SPU con diferente extensor de cadena, a) % p6rdida de masa y b) derivada de la masa.....	44

Figura 3.8 Análisis por difracción de rayos X: A) SPU y compuestos modelo B) PU CISTEINA, C) PU ÁCIDO GLUTÁMICO, D) PU GLICINA, y E) PU GLUTATIÓ	46
Figura 3.9 Diagrama esfuerzo-deformación de los poliuretanos sintetizados con diferente extensor de cadena	47
Figura 3.10 Micrografías SEM de la serie de SPU sintetizados con diferente extensor de cadena	49
Figura 3.11 Citometría de flujo: A) identificación de la subpoblación de plaquetas de la población total de las células sanguíneas. Identificación de la subpoblación de plaquetas activadas (arriba de la línea) para B) control positivo. Para la serie de SPU: C) PU GLUTATIÓ, D) PU CISTEINA, E) PU GLICINA y F) PU ACIDO GLUTAMICO	53
Figura 3.12 Porcentaje de plaquetas activadas CD62P (%) en SPU y Colágeno Tipo I como control positivo	54
Figura 3.13 Evidencia de pruebas de adhesión celular (HUVECs) sobre un control positivo (A) y la serie de SPU: (C), (D), (E) Y (F)	56
Figura 3.14 Pruebas de adhesión celular con HUVECs analizadas mediante citometría de flujo	56

GLOSARIO DE TÉRMINOS

APTT Tiempo parcial de tromboplastina activada (por sus siglas en ingles)

APC Alofococianina

BDA 1,4-Butano diamina

BD Butano diol

CE Células endoteliales

CML Células de músculo liso

DSC Calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés

DMA Análisis dinámico mecánico

DMF Dimetil formamida

DRX Difracción de rayos X

DTE Ditioeritritol

ePTFE Politetrafluoruro de etileno expandido

FITC Isotiocianato fluoresceína

FTIR Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

GPC Cromatografía de permeación en gel

GSH Glutación

HA Ácido hialuronico

Hela Células epiteliales de tumor cervical

HDI Hexamentilen-diisocianato

H₁₂MDI 4,4'-metilen bis(ciclohexilisocianato)

HUVECs Células endoteliales de cordón umbilical humano

LDI Diisocianato de lisina

MDI 4,4'-metilendifenildiisocianato

NO Óxido nítrico

PBS Buffer de fosfato salino

PCL Policaprolactona
PGA Ácido poliglicólico
PLA Ácido poliláctico
PET Poli (etilen) tereftalato
PUR Poliuretano
RGD Secuencia de amino ácidos (péptido) arginina-glicina-ácido aspártico
SAMs Monocapas auto-ensambladas
SH Tiol
SEM Microscopio electrónico de barrido
SPU Poliuretano segmentado
TDI Toluen-diisocianato
TEBV's Ingeniería de tejidos de vasos sanguíneos
TGA Análisis termogravimétrico
Tg Temperatura de transición vítrea
THF Tetrahidrofurano
Tm Temperatura de fusión
UV Ultravioleta

RESUMEN

Poliuretanos segmentados (SPU) fueron sintetizados a partir de poli-caprolactona diol (PCL), 4,4'-metilen-bis-ciclohexildiisocianato (HMDI), y como extensor de cadena el péptido L-glutación o los amino ácidos que lo conforman, L-ácido glutámico, L-cisteína, y glicina. La formación de los poliuretanos fue comprobado mediante análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis dinámico mecánico (DMA) y análisis termogravimétrico (TGA) se determinaron la temperatura de fusión ($T_m= 42-52^{\circ}\text{C}$), la temperatura de transición vítrea ($T_g= -32-36^{\circ}\text{C}$) y la temperatura de descomposición, respectivamente ($T_{d1}= 348-358^{\circ}\text{C}$, $T_{d2}= 466-474^{\circ}\text{C}$) para los poliuretanos sintetizados. El análisis por difracción de rayos X (DRX) reveló que los SPU son polímeros semicristalinos ($2\theta=21.27^{\circ}-23.5^{\circ}$). Mecánicamente los SPU exhibieron un comportamiento elastomérico (hasta 1430 % de deformación en uno de los poliuretanos) relacionado estrechamente con el peso molecular de acuerdo a otros estudios. El peso molecular fue determinado por cromatografía de permeación en gel (GPC). La hemocompatibilidad de los SPU se evaluó con las pruebas de tiempo de coagulación (t_c) por el método de Lee-White ($t_c=368-439$ s) y tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) observándose tiempos entre 66-106 s. La activación de plaquetas debido al contacto directo con los SPU fue determinada mediante el método de citometría de flujo utilizando colágeno Tipo I como control positivo, resultando en un bajo porcentaje de activación en todos los SPU sintetizados. La biocompatibilidad con células endoteliales se analizó a través de pruebas de adhesión celular, observándose el mejor comportamiento en los SPU sintetizados con L-cisteína y glicina como extensores de cadena. De ésta forma, se puede establecer que estos nuevos poliuretanos pueden ser aplicados en el ámbito de la ingeniería de tejidos para el desarrollo de injertos vasculares.

ABSTRACT

Novel biodegradable segmented polyurethanes (SPU) were synthesized with polycaprolactone diol (PCL), 4,4'-methylen bis (cyclohexil isocyanate) (HMDI) and either L-glutathione or its constituent amino acids (L-glutamic acid, L-cysteine and glycine) as chain extenders. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis revealed the feasibility of obtaining polyurethanes through the presence of NH (Amide II), C-N, C-O and C=O bands and the absence of NCO band. Differential scanning calorimetry (DSC) and X-Ray diffraction (XRD) revealed that a semicrystalline polymer ($T_m=42^{\circ}\text{C}$ to 52°C ; $2\theta=21.27^{\circ}$ and 23.5°) was obtained in all cases while dynamic mechanical analysis (DMA) revealed an amorphous phase ($T_g=-30^{\circ}\text{C}$ to -36°C) from soft segment. These properties, in addition to their high molecular weight, led to high moduli and higher extensibilities when glycine and glutamic acid were used as chain extenders. Clotting times (Lee-White test) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) determined on these polyurethanes were longer than with glass. In addition, all synthesized segmented polyurethanes exhibited platelet activation indexes below the collagen type I positive control. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) viability was higher in SPUs containing either glycine or cysteine. The obtained results indicate that SPU's that use of cysteine as chain extender are promising candidates for cardiovascular applications.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a estudios recientes de la Organización Mundial de la Salud las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en el mundo, siendo aproximadamente 83 millones de estadounidenses los que han sido detectados¹ y México no es la excepción; en reportes del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) se ha estimado que éstas afecciones al corazón representan el 18% del total de defunciones en el año 2010 y solo el 12% se vinculan con la enfermedad isquémica del corazón representando prácticamente la misma incidencia en defunciones que enfermedades como la diabetes y tumores malignos^{2,3}. Considerando la necesidad de atender estos padecimientos, se han logrado avances significativos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, de los cuales se derivan trabajos que implican el trasplante de tejido autólogo de segmentos de arterias o venas o el empleo de injertos vasculares diseñados *in vitro* a partir de compuestos naturales⁴, o bien la terapia celular⁵. En 1979 Veith, et al. determinaron que la disponibilidad de este tejido estaba limitada en calidad y en cantidad y que solo beneficiaba al 30% de los pacientes⁶. Emplear tejido nativo (arterias o venas) como injerto vascular conlleva a otra serie de problemas, ya que los conductos arteriales presentan desventajas en cuanto a la variabilidad de sus dimensiones, mientras que los segmentos venosos conducen a la formación de aneurismas debido a ciertas alteraciones degenerativas^{7,8}. Por otro lado, la alternativa que implica el uso de materiales sintéticos no ha representado la solución total a la creciente demanda de sustitutos vasculares debido a sus limitadas propiedades mecánicas que demanda el patrón de flujo sanguíneo; además de los problemas de trombosis que se han detectado después de su implantación⁷⁻⁹.

En los últimos 15 años se ha impulsado el desarrollo de diversas estrategias que intentan establecer mecanismos que mejoren o reparen la funcionalidad de los vasos sanguíneos involucrados en alguna enfermedad cardiovascular. Lo anterior condujo a conformar una rama multidisciplinaria de la ciencia conocida como *ingeniería de tejidos*. En el campo cardiovascular, la ingeniería de tejidos representa una opción para atender la demanda de injertos vasculares a través de ciertas estrategias que involucran el uso de materiales sintéticos que pueden ser diseñados para su desempeño en contacto

con fluidos corporales propios del sitio de implantación, incluyendo la sangre. No hay que perder de vista el potencial económico que esta reciente tecnología representa, tanto en el desarrollo del propio injerto vascular así como el problema de salud pública que será atendido.

ANTECEDENTES

1.1 Estructura de los vasos sanguíneos

El sistema circulatorio, cuya función es transportar fluidos a través del cuerpo, está formado por el sistema linfático y el sistema cardiovascular. El primero va recogiendo el exceso de líquido hístico extracelular y lo regresa al sistema cardiovascular; éste último, formado por el corazón y los vasos sanguíneos (arterias, venas, y capilares), se encarga de transportar los nutrientes, oxígeno, y productos de desecho de las células a los diferentes tejidos del cuerpo¹⁰. Los vasos sanguíneos tienen la capacidad de mantener la presión sanguínea adecuada en la etapa diastólica, así como un control activo auto-regulatorio que permite a los órganos emitir la respuesta a demandas locales de sangre¹⁰.

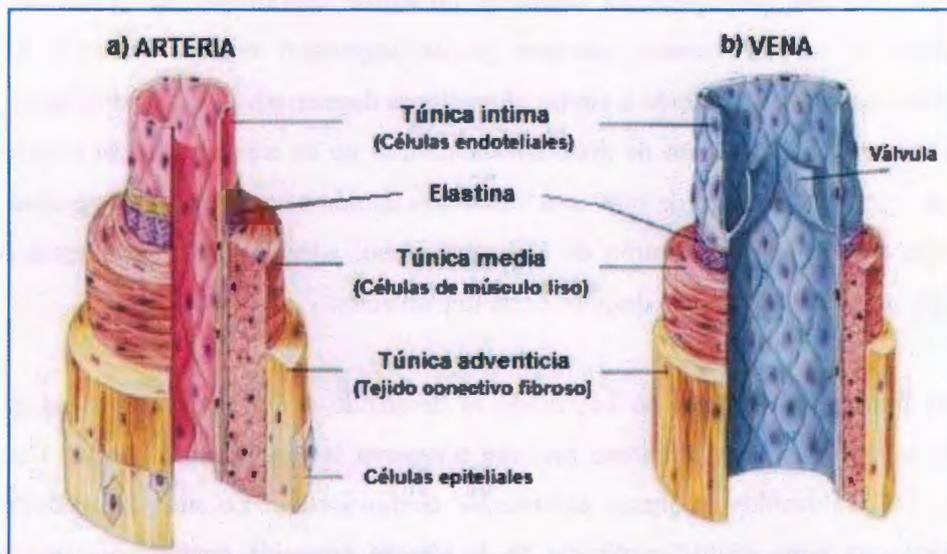


Figura 1.1 Las diferentes capas celulares que conforman la estructura de los vasos sanguíneos: a) arteria, y b) vena.

El sistema cardiovascular puede ser visto como un sistema circulatorio pulmonar compuesto por la parte derecha del corazón y los pulmones. Por otro lado existe la circulación sistémica, en la cual la parte izquierda del corazón provee de sangre a los órganos sistémicos (corazón, músculos, cerebro, huesos, sistema gastrointestinal, hígado, piel, vaso, riñones y otros). Las dos partes en que se divide el sistema cardiovascular están arregladas en serie, de tal forma que la cámara izquierda y derecha bombean un flujo volumétrico semejante de sangre en condiciones saludables¹¹.

A continuación se describen los tipos de vasos sanguíneos:

Arterias: La sangre (oxigenada) se distribuye del corazón al resto del cuerpo a través de arterias de diferentes características, que se distinguen unas de otras por su calibre, la cantidad de tejido elástico o músculo en la sección de la túnica media (Figura 1.1a) y el espesor de la pared. En el curso del transporte de sangre, ésta se conduce a través de arterias de calibre cada vez menor¹⁰.



Figura 1.2 Clasificación de las arterias

De acuerdo a la Figura 1.2, las arterias presentan diferentes dimensiones, y de acuerdo a esa característica se determina su función en el transporte sanguíneo. Las *arterias de conducción* son grandes y de paredes elásticas; reciben la sangre que es eyectada del corazón y son adaptables a la presión del flujo pulsátil debido a las contracciones cardíacas. Las *arterias distributivas* están constituidas principalmente por fibras de músculo liso, regulan el flujo sanguíneo debido a su capacidad de vasoconstricción, es decir, pueden reducir y aumentar su diámetro. Por otro lado, las

arterias de menor tamaño y las arteriolas, regulan la presión arterial mediante su firmeza de sus paredes constituida en su mayoría por musculo liso¹⁰.

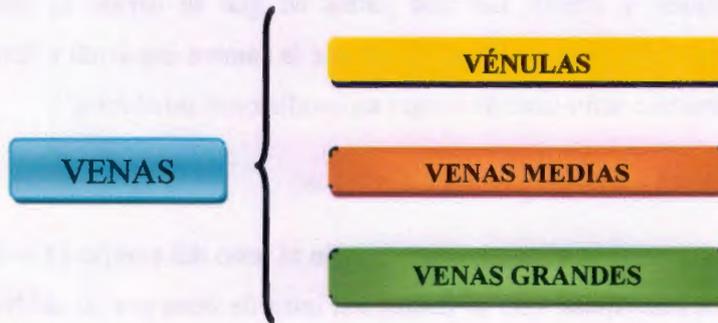


Figura 1.3 Clasificación de las venas

Venas: Por lo general transportan sangre (desoxigenada) de los capilares hacia el corazón, a excepción de las venas pulmonares que llevan sangre arterial al corazón. Las venas conducen el flujo de sangre a menor presión que las arterias, por tal motivo sus paredes son más delgadas. Las venas se clasifican de acuerdo a su tamaño como puede apreciarse en la Figura 1.3.

Las *vénulas* son las venas más pequeñas y su función es drenar los capilares. Las *venas medias* drenan los plexos venosos y son importantes en las extremidades inferiores ya que poseen válvulas antirreflujo que conducen la sangre hacia el corazón pero evitan que ésta se regrese debido a la fuerza de gravedad. Las *venas grandes*, como la vena cava superior, se caracterizan por sus bandas de musculo liso amplias y su túnica adventicia bien desarrollada¹⁰. La estructura de una vena se puede apreciar en la Figura 1.1b.

El trabajo de Weinberg and Bell se ha establecido como la principal referencia de los primeros intentos por generar injertos vasculares a partir de fuentes naturales como proteínas y células^{7,9}. Otros investigadores en esta área como Nicolas L'Heureux et al.^{4,12,13} entre otros, han aportado datos importantes en cuanto a la obtención de vasos sanguíneos mediante ingeniería de tejidos (TEBVs, por sus siglas en ingles), principalmente a partir de elementos biológicos provenientes de humanos adultos.

Por otro lado, los injertos vasculares producidos a partir de polímeros sintéticos representan una alternativa cuyas ventajas, en primera instancia, son la probable reproducibilidad de las características fisicoquímicas y mecánicas del constructo (vaso sanguíneo) inherentes al sitio de aplicación del cuerpo humano; además de su bajo costo en comparación con otros tipos de andamios hechos con componentes biológicos y de degradabilidad ajustable¹⁴. En muchos casos ya se han empleado materiales sintéticos como Dacron, que es polietilen-tereftalato (PET), o el politetrafluoruro de etileno expandido (ePTFE) en injertos vasculares de calibre grande (>6mm), aunque también han sido usados en gran medida, para injertos vasculares de bajo calibre de acuerdo a estudios preliminares ya realizados^{15,16}. Sin embargo, aun existe una gran controversia en el sentido de que algunos grupos de trabajo resaltan las posibles complicaciones de los injertos vasculares sintéticos que principalmente conducirían, por ejemplo, a problemas de trombosis aguda, especialmente cuando éstos son empleados como injertos vasculares de bajo calibre (diámetro <6mm), así como la hidrofobicidad superficial que limita en gran medida la endotelización^{4,12,13}.

En éste sentido, en 1952 Voorhees y Blakemore ya empleaban polímeros sintéticos (Vinyon N) en procedimientos quirúrgicos experimentales de aorta abdominal canina¹⁷. Investigadores como Campbell (1975)¹⁸, Greisler (1982)¹⁹, Fasol y Zilla (1987)²⁰, por mencionar algunos, han seguido esa línea de trabajo; sin embargo, los logros hasta ahora alcanzados no han sido suficientes para poder establecer una ruta real y aplicable en un proceso quirúrgico en el cual esté involucrado algún injerto vascular sintético y éste pueda desempeñarse adecuadamente en el organismo en términos de biocompatibilidad y hemocompatibilidad. Lo anterior ha traído consigo un gran auge en el estudio de injertos vasculares elaborados a partir de polímeros sintéticos. En éste sentido, los poliuretanos constituyen materiales sintéticos que en los últimos años han representado una alternativa viable debido a la relativa facilidad para adecuar sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas a partir de la versatilidad de la química que lo sustenta.

En la estructuración de una estrategia para el estudio de injertos vasculares sintéticos, la biocompatibilidad y hemocompatibilidad se relacionan con los fenómenos interfaciales de los materiales poliméricos. Inicialmente se deben tomar en cuenta tanto los efectos de la estructura química así como de las propiedades superficiales; es decir, la energía interfacial, el balance hidrofóbico/hidrofílico de la superficie, los grupos

funcionales disponibles, el peso molecular del polímero, el tipo y distribución de cargas superficiales, flexibilidad conformacional del polímero, así como la topografía superficial y su rugosidad^{21,22}. En este contexto, se deben tomar en cuenta los requerimientos necesarios y los aspectos deseables para entender el enfoque de un estudio que implica el desarrollo de un nuevo material y su desempeño en el ámbito biológico. Como referencia, las características fundamentales de un vaso sanguíneo artificial se enlistan en la Tabla I. Bajo el esquema que se ha planteado se han llevado a cabo diversas estrategias que han abonado conocimiento al desarrollo de los biomateriales aplicados en el área cardiovascular.

Tabla 1.1 Requerimientos de un injerto de vaso sanguíneo sintético²³

A) REQUERIMIENTOS CRÍTICOS*	B) REQUERIMIENTOS DESEABLES*
<p>(1) El injerto debe ser biocompatible en función de sus características fisiológicas: no-trombogénico, no-inflamatorio, no-inmunogénico, no-tóxico, no-carcinogénico.</p> <p>(2) El injerto debe emular las características viscoelásticas de los vasos sanguíneos de bajo calibre.</p> <p>(3) El injerto debe soportar cambios de presión debidas al flujo sanguíneo.</p> <p>(4) El injerto debe ser capaz de remodelarse eficientemente mediante la endotelización.</p>	<p>(1) Ser suturables o poder ser colocados adecuadamente en el sitio de implantación.</p> <p>(2) Fácil de fabricar.</p> <p>(3) Fácil de esterilizar.</p> <p>(4) Disponibilidad de calibres.</p>

1.2 La Ingeniería de Tejidos y su aplicación en sistemas vasculares

Uno de los aspectos que encarecen los servicios de salud es cuando un órgano comienza a fallar o la pérdida de tejido. Se estima que cerca de 8 millones de procedimientos quirúrgicos se llevan a cabo cada año en los Estados Unidos, de los cuales 3 millones se asocian con alguna enfermedad cardiovascular²⁴. Sin embargo, los trasplantes de órganos o tejidos no son una solución óptima debido a un gran número de factores, entre ellos, la carencia de donadores y la gran demanda de los mismos por el incremento constante de pacientes que requieren un trasplante. En éste contexto se ha desarrollado una importante disciplina conocida como *Ingeniería de Tejidos* (IT), cuya

conformación se exhibe en la Figura 1.4. Ésta se ha definido como la aplicación de principios y métodos de diversas ramas de las ciencias de la salud y de la ingeniería hacia el entendimiento de la relación estructura-función de los tejidos, para el desarrollo de sustitutos biológicos que sirvan para reparar, mantener y/o mejorar las funciones de los tejidos dañados ya sea por lesión o por enfermedad²⁴.

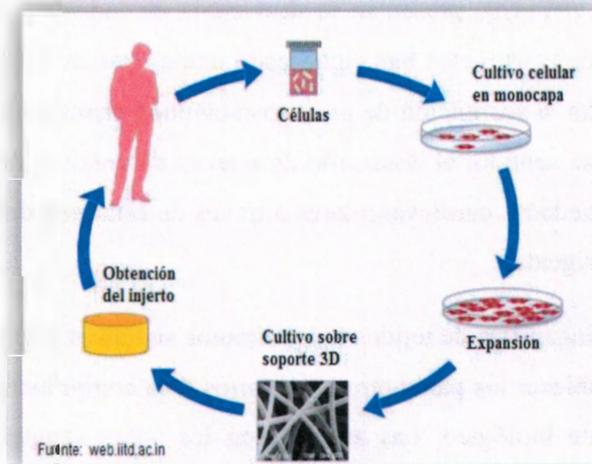


Figura 1.4 Estructura de la Ingeniería de Tejidos

Otra definición aceptada es que la IT es el diseño de biomateriales y utilización de células o biomoléculas para restaurar o modificar las funciones biológicas de los tejidos²⁵. Así, la expresión fundamental de la ingeniería de tejidos es, por lo tanto, la selección de células humanas mediante su aislamiento, cultivo y proliferación con la ayuda de un soporte sintético funcional para generar un constructo tisular para ser trasplantado en el huésped^{4,26}. Las células pueden obtenerse ya sea de un tejido del propio paciente (injerto autólogo o autoinjerto) o bien, si las células se cosechan del tejido de otro paciente se podrá construir un aloinjerto. La *ingeniería de tejidos funcional*, es una definición adicional en la cual se establece la importancia de que el tejido construido *in vitro* pueda ofrecer las propiedades estructurales y funcionales del tejido que será reemplazado, es decir, las células que se han cultivado sobre un soporte, deberán replicar estructuras y funciones idénticas a las que producirían las mismas

células dentro un organismo vivo²⁵. Esto último permite que en la actualidad la Ingeniería de Tejidos represente uno de los mayores avances en la medicina regenerativa y es un área de la investigación en constante crecimiento²⁶.

1.3 Injertos vasculares sintéticos de bajo calibre

A pesar de que se ha reportado que los injertos vasculares de bajo calibre fabricados con polímeros sintéticos como Dacron [polietilen-tereftalato (PET)] o politetrafluoruro de etileno expandido (ePTFE)], presentan la desventaja de inducir a la oclusión del constructo²⁷, éste tipo de constructos han significado una opción en los procedimientos quirúrgicos que implican la sustitución de un vaso sanguíneo principalmente de calibre mayor a 6mm²⁸. En éste sentido, el desarrollo de nuevas alternativas para enfrentar el problema de las enfermedades cardiovasculares a través de ésta metodología ha ido en aumento y permanece vigente.

En el contexto de la ingeniería de tejidos los polímeros sintéticos han sido estudiados con la finalidad de establecer los parámetros necesarios para comprender el desempeño de éstos en el ambiente biológico. Las arterias son los vasos sanguíneos de mayor incidencia en cuanto a enfermedades vasculares se refiere; ello implica la necesidad de contar con injertos vasculares disponibles para llevar a cabo los procedimientos quirúrgicos de *by pass*¹⁵. Tomando en cuenta la complicada estructura de un vaso sanguíneo así como sus propiedades mecánicas únicas, la ingeniería de tejidos enfrenta un reto muy importante en el ámbito de la medicina regenerativa. Como primer paso para establecer una estrategia de trabajo, se debe tener en cuenta que los vasos sanguíneos están formados por tres capas que en su conjunto forman una pared. La capa externa se denomina túnica adventicia, formada en su mayoría por tejido conectivo rico en colágeno, además de fibroblastos. La capa intermedia se conoce como túnica media, constituida por células de musculo liso (CML) y fibras elásticas, ésta se encuentra entre la túnica externa y la túnica íntima. Ésta última es la capa interna de un vaso sanguíneo que se compone por una superficie basal formada a su vez por una monocapa de células endoteliales (CE). La importancia de conocer la conformación de un vaso sanguíneo estriba en que las CML y las CE son las que mantienen la integridad mecánica; y en especial, son las células endoteliales las que proveen la funcionalidad a los vasos sanguíneos, ya que forman una capa continua permeable selectiva que representa una

barrera antitrombogénica que mantiene el flujo laminar de la sangre a través del vaso sanguíneo^{15,29}. Lo anterior subraya la importancia de encontrar un material sintético que cumpla con la función de soporte físico que facilite la adhesión y la proliferación celular tanto de células de músculo liso (CML) como de células endoteliales (CE), y que además mantenga en lo posible las propiedades mecánicas de un vaso sanguíneo nativo.

Tradicionalmente el uso clínico de algunos poliésteres (de monómeros tales como la caprolactona, y los ácidos glicólico o láctico) conlleva la degradación del injerto post-implantación³⁰, cuyos productos provenientes de tal proceso de degradación son considerados no tóxicos al organismo; sin embargo, también debe considerarse que los poliésteres presentan diferentes velocidades de degradación siendo esto un factor que influye en su aplicación^{8,16,29}. Un ejemplo de lo anterior es que la poli(épsilon-caprolactona) ha sido usada en la obtención de injertos vasculares mediante ingeniería de tejidos, estableciéndose como un buen soporte en cuanto a las prestaciones mecánicas requeridas por el flujo sanguíneo³¹. En el mismo contexto se han empleado otros poliésteres como el poliácido láctico (PLA) para lograr materiales híbridos que mejoran algunas propiedades mecánicas y morfológicas necesarias para la adhesión y proliferación celular³². El poliácido láctico (PLA) y el poliácido glicólico (PGA) se han usado también como respuesta a la necesidad de controlar la tasa de degradación del injerto, lo cual se logra mediante la hidrólisis del grupo éster³²⁻³⁴.

Sin duda una familia de polímeros sintéticos que más atención ha captado en el ámbito de los biomateriales aplicados al desarrollo de injertos cardiovasculares son los poliuretanos. Se han reportado trabajos recientes que incluyen al poliuretano ya sea como parte de un material híbrido que mostró buena respuesta inmune al ser injertado y también mejorando su capacidad para ser reemplazado por tejido natural a través del tiempo de implantación, disminuyendo la probabilidad de inducir a calcificaciones en comparación con otros polímeros como el ePTFE³⁵⁻³⁸; además se han estudiado diferentes formulaciones de poliuretano desde el punto de vista biomecánico mediante un análisis de esfuerzo-deformación así como valorando su desempeño en contacto con sangre³⁷⁻³⁹, lo cual potencialmente incrementa el esquema de aplicación del poliuretano en injertos vasculares de bajo calibre.

1.4 Poliuretanos

1.4.1 Química del poliuretano

El poliuretano (PUR) es el nombre genérico de un grupo de polímeros con diferentes composiciones y como consecuencia, presentan una extensa variedad de propiedades fisicoquímicas y mecánicas, las cuales, en el caso de los poliuretanos segmentados, se atribuyen en gran medida a las dos fases presentes en su estructura, el segmento flexible y el segmento rígido, derivadas de la termodinámica molecular presente en éstos polímeros⁴⁰⁻⁴². Lo anterior se fundamenta en que los polímeros que comúnmente se fabrican para su comercialización se forman a partir de uno o dos monómeros; en cambio, el poliuretano presenta una química más compleja a partir de tres monómeros: isocianato, polioliol y extensor de cadena^{42,43}.

Los poliuretanos fueron descubiertos en 1937 por Otto Bayer del I.G. Farbenindustrie en Leverkusen, Alemania, como una respuesta a la competencia que representaba el trabajo sobre poliamidas desarrolladas por Carothers en los laboratorios Du Pont en Estados Unidos⁴¹. Sin embargo, no fue sino hasta la década de los sesenta cuando se introdujeron comercialmente los poliuretanos. El poliuretano segmentado con propiedades elastoméricas, Biomer®, fue el primer poliuretano en comercializarse como un biomaterial con aplicaciones cardiovasculares⁴³. De acuerdo a la Figura 1.5 los poliuretanos se producen mediante el proceso de poliadición del isocianato por ejemplo, la reacción de un alcohol con un isocianato produce un uretano (carbamato), la cual es una reacción de adición simple con desplazamiento de hidrógeno⁴⁰⁻⁴²:

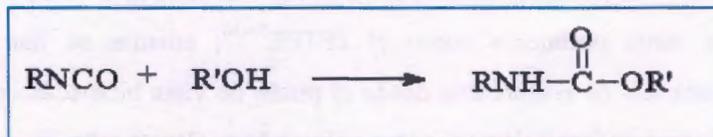


Figura 1.5 Reacción de obtención de uretano

El principio químico propuesto por Otto Bayer en 1937, es la extensión de ésta reacción a isocianatos di- y polifuncionales y a compuestos hidroxilados resultando la

formación de polímeros lineales, ramificados y entrecruzados⁴⁰⁻⁴². Un ejemplo de la reacción de obtención de poliuretano se aprecia en la Figura 1.6

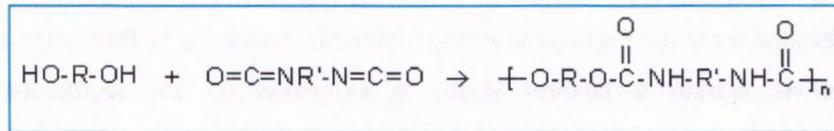


Figura 1.6 Reacción de obtención de poliuretano

Durante la síntesis del poliuretano los isocianatos pueden experimentar reacciones alternas de poliadición (Figura 1.7), aunque estas no son deseables en el sistema de síntesis, ya que afectarían el rendimiento de la reacción y podrían causar entrecruzamientos que eventualmente puede incidir en la solubilidad del polímero.

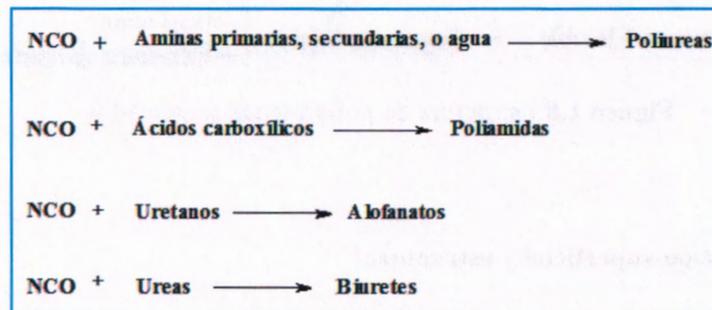


Figura 1.7 Reacciones secundarias que pueden producirse con el isocianato en la síntesis de poliuretano

Algunos poliuretanos segmentados de alta pureza ya han sido empleados para la fabricación de dispositivos extracorporales o como implantes, debido a su amplio intervalo de propiedades físicas y químicas⁴³⁻⁴⁶. La estructura de los poliuretanos segmentados lineales, que de hecho presentan un comportamiento elastomérico, consiste de dos partes, una corresponde al segmento flexible derivado de un polirol de peso molecular moderado, mientras que el segmento rígido lo forman un diisocianato mediante su reacción con un compuesto bifuncional de bajo peso molecular conocido como extensor de cadena. La disponibilidad de diferentes macrodioles como segmentos flexibles (poliésteres y poliéteres), una variedad amplia de isocianatos (alifáticos y

aromáticos), así como una diversidad de extensores de cadena (alcoholes, aminas, derivados de aminoácidos y péptidos), hacen de los poliuretanos materiales poliméricos tan versátiles que pueden acceder a un gran número de aplicaciones. La incompatibilidad entre los segmentos rígido y flexible determina la formación de fases bien definidas debido a factores como la extensión de los segmentos en la macromolécula, las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno y el grado de cristalización^{42,43,45}. En la figura 1.8 se muestra la estructura de un poliuretano segmentado.

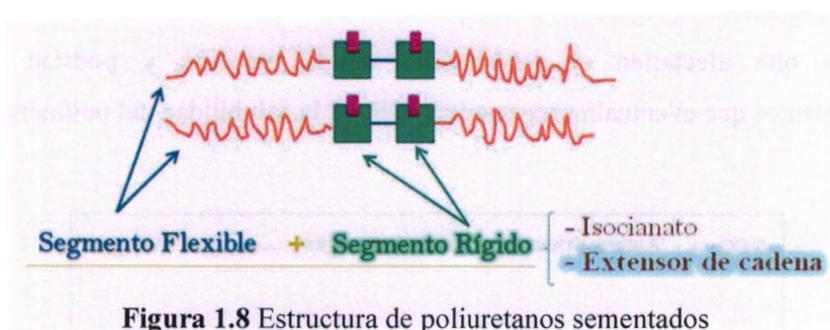


Figura 1.8 Estructura de poliuretanos sementados

1.4.2 Modificación superficial y estructural

Muchos de los polímeros que ofrecen buenas propiedades físico-químicas y mecánicas por su propia constitución, por lo general carecen de afinidad superficial hacia las biomoléculas (proteínas, matriz extracelular, sangre, entre otras) o no presentan ciertas características requeridas en aplicaciones biológicas como por ejemplo la no toxicidad, que impiden sean aplicados en ramas de la ciencia de reciente desarrollo como lo es el área de los biomateriales. La modificación de superficies es fundamental, para ello, se han desarrollado metodologías como la aplicación de recubrimientos, tratamientos químicos, tratamientos con plasma, la aplicación de injertos polimerizados en la superficie, y la inclusión de moléculas específicas (amino ácidos, péptidos, y otras biomoléculas) dentro de la estructura principal del polímero con la finalidad de ampliar las aplicaciones de ciertos polímeros⁴⁷. Por otro lado, la capacidad de adhesión, proliferación, diferenciación celular, y la hemocompatibilidad, son directamente afectados por factores como la rugosidad y morfología de la superficie; así como otros

factores fisicoquímicos como la química superficial, la energía superficial, la relación hidrofóbica/hidrofílica de la superficie, y la humectabilidad de la superficial^{48,49}.

Con el objetivo de obtener más conocimiento de cómo las propiedades superficiales afectan la biocompatibilidad de los materiales sintéticos, se ha evaluado la adhesión celular utilizando membranas de poliuretano, verificándose que el desempeño de las mismas depende directamente de la forma o método de preparación⁵⁰. Otros trabajos en los que se ha utilizado la modificación superficial para mejorar la biocompatibilidad y la hemocompatibilidad, se destacan los que han empleado la fotopolimerización con luz ultravioleta en soportes híbridos de PU/PEGMA para favorecer el crecimiento de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs)⁴¹. El tratamiento con plasma permite modificar la superficie de un material de poliuretano y se puede evaluar mediante la medición del ángulo de contacto, el análisis de la topografía, la absorción de proteínas, la compatibilidad con sangre y la adhesión celular^{52,53}. Se ha estudiado también el efecto del tratamiento con plasma de oxígeno sobre la humectabilidad de la superficie, comprobándose la disminución de la hidrofobicidad en un poliuretano⁵⁴. Mediante el mismo método se ha inmovilizado colágeno tipo I sobre membranas de poliuretano observándose un incremento en la hidrofílicidad tomando como parámetro el ángulo de contacto, y observando cierta mejoría en la adhesión con células Hela (células epiteliales de tumor cervical)⁵⁴. En el contexto de éste tipo de estudios, se ha utilizado plasma de argón inducido para modificar la superficie de poliuretano, cuyo efecto es el aumento de la rugosidad superficial; ésta se relaciona estrechamente con la disminución del ángulo de contacto y mejora las propiedades hidrofílicas de la superficie, lo cual conlleva a incrementar la adhesión y la proliferación de células endoteliales⁵⁶. Por otro lado, se ha empleado la irradiación ultravioleta (UV) y rayos gamma para modificar la superficie del poliuretano, de acuerdo a este estudio, tal modificación no implica que éste factor tenga el peso suficiente para considerarlo como la única causa que promueve la adhesión celular; sin embargo, coincidiendo con otros autores, si es posible el mejoramiento del carácter hidrofílico de una superficie a través de éste método⁵⁷.

Métodos alternativos e innovadores han sido aplicados a la evaluación de la biocompatibilidad; por ejemplo las monocapas auto-ensambladas (SAMs por sus siglas en inglés), que a través de sus particulares características superficiales y de la unión de moléculas con grupos funcionales específicos libres pueden mejorar las humectabilidad

de la superficie reduciendo el ángulo de contacto y conduciendo a mejorar la adhesión de HUVECs⁵⁸. Mediante la unión covalente de ácido hialurónico (HA por sus siglas en inglés) injertado en la superficie de un poliuretano modificado con polietilenoamina ramificada (lo cual deja expuestos grupos amino) se ha demostrado que incrementa la hemocompatibilidad y la biocompatibilidad de células endoteliales de aorta de bovino⁵⁹. A partir del análisis anterior, los poliuretanos se han establecido como uno de los materiales que más interés ha atraído en diversos grupos de investigación que se enfocan en la mejora del desempeño y la adaptación de estos polímeros al medio biológico.

No obstante que los procedimientos aplicados al mejoramiento de las propiedades de los materiales sintéticos han logrado grandes avances en este ámbito de la ciencia, la utilización de péptidos y aminoácidos como estrategia para optimizar el desempeño de tales materiales en su interacción con el medio biológico ha ido en aumento. El uso de biomoléculas se ha relacionado con la biocompatibilidad con células endoteliales y células de músculo liso, para el caso del desarrollo de injertos vasculares, así como con el aspecto de hemocompatibilidad y la modulación de la tasa de degradación de los polímeros que se analizan en este contexto. En este marco de estudio se han usado secuencias de aminoácidos como el tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato) inmovilizado en la superficie del polímero, impactando positivamente en el crecimiento de HUVECs sobre dicho sustrato⁶⁰⁻⁶³; además, el uso de este tipo de biomoléculas se ha extendido a su aplicación como extensores de cadena ya sea para mejorar su tasa de degradación y otras propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad superficial^{64,65} o bien para inducir la biocompatibilidad con células endoteliales⁶².

1.4.3 Poliuretanos Biodegradables

Los polímeros biodegradables son una importante línea de estudio para diferentes aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, por lo que a partir de un buen diseño del polímero se pueden obtener materiales cuya degradación sea controlada^{46,64,67-69}. A partir de lo anterior, en otros trabajos se ha evaluado la estabilidad de algunos poliuretanos en cuanto a su degradación en ambientes biológicos usando procedimientos *in vitro* e *in vivo*^{43,44}.

Los poliuretanos biodegradables se pueden obtener a través de la introducción de moléculas hidrolizables en la cadena del polímero mediante diversas alternativas. El método más común para introducir sitios propensos a degradación en la estructura de la macromolécula es utilizando poliésteres con la finalidad de impartirle biodegradabilidad al poliuretano a través de la susceptibilidad a la hidrólisis de la unión tipo éster⁷⁰⁻⁷³. Como ejemplo se puede citar la adición de la poli-caprolactona diol como segmento flexible, de la cual se conoce que sus productos de degradación no son tóxicos para las células, ya que ha sido aceptado como material para aplicaciones médicas por la dependencia de Estados Unidos, Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés)^{74,75}; aunque otros polímeros como PLA y PGA también han sido usados como segmento flexible con un buen desempeño en cuanto a la tasa de degradación y biocompatibilidad, como ya se había mencionado en la sección 1.3.3³²⁻³⁴. El otro medio para producir poliuretanos elastoméricos biodegradables involucra la introducción de grupos hidrolizables como parte del segmento rígido. Debido a que relativamente pocos diisocianatos biodegradables pueden obtenerse para la síntesis de los poliuretanos, el uso de extensores de cadena es el método más factible para producir segmentos rígidos hidrolizables⁷⁶.

Por lo general, los poliuretanos comerciales se obtienen a partir de isocianatos aromáticos como el 4,4' difenil metano diisocianato (MDI, por sus siglas en inglés) y tolueno diisocianato (TDI, por sus siglas en inglés) generando materiales cuyos productos de degradación son tóxicos y carcinogénicos, debido a que producen diaminas aromáticas en la degradación *in vivo*. Debido a lo anterior, los diisocianatos alifáticos son preferidos sobre los diisocianatos aromáticos en cuanto a las aplicaciones del poliuretano en biomateriales para su uso en medicina^{44,64,77}. En éste sentido, se han sintetizado poliuretanos a partir de diisocianato de lisina (LDI), glicerol, y ácido ascórbico (AA). La matriz LDI-glicerol-AA se degrada a productos no tóxicos y se observó que favorecía el crecimiento y proliferación células precursoras de osteoblastos (OPC por sus siglas en inglés) promovida por el ácido ascórbico⁴⁶, ello representa un antecedente que fundamenta el uso de aminoácidos como promotores de adhesión celular, aunque se debe señalar que en el caso de éste trabajo se emplean otro tipo de células. Por otro lado, se han desarrollado poliuretanos mezclados con Poli-metacrililoietil fosforilcolina-co-metacrililoietil butiluretano (PMBU por sus siglas en inglés) obteniendo un material con características no-trombogénicas, buena endotelización del injerto y propiedades mecánicas similares a las que presenta un vaso

sanguíneo nativo⁷⁷; paralelamente se han obtenido composites de poliuretano sintetizados con compuestos que ya han sido probados como generadores de productos de degradación no citotóxicos enfocados a las aplicaciones cardiovasculares^{76,78}. Las aportaciones anteriores son solo un ejemplo del vasto desarrollo que se ha producido en torno al poliuretano en los últimos quince años y sin duda marca la pauta para poder resaltar la importancia del presente trabajo.

La síntesis de poliuretanos segmentados involucra también el uso de moléculas de bajo peso molecular conocidos como extensores de cadena, por ejemplo los dioles para los poliuretanos y las diaminas para el caso de las poliureas⁴⁰⁻⁴². Entre los trabajos que se han llevado a cabo al respecto, Caracciolo et al.⁴⁵ han obtenido diferentes poliuretanos segmentados (SPUs) a partir de la síntesis entre la PCL y diisocianato de lisina (LDI) o el HDI, usando extensores de cadena alifáticos y aromáticos para evaluar el efecto del segmento rígido (diisocianato-extensor de cadena) sobre las propiedades térmicas y mecánicas de los SPUs. Chan et al.⁶⁴ realizaron un estudio que se enfocó al análisis de la degradación ácida, alcalina y oxidativa de dos sistemas de poliuretano, empleando para ello poli ϵ -caprolactona (PCL) de bajo peso molecular como segmento flexible, 4,4'-metilen bis ciclohexil isocianato (HMDI), y como extensores de cadena butanodiol (BD) o ditioeritritol (DTE) para cada una de las formulaciones de poliuretano respectivamente. Por otro lado, en años recientes se han implementado rutas de síntesis empleando ya sea aminoácidos o secuencias ellos (péptidos) como extensores de cadena, ésta alternativa se ha sugerido como una forma de conferirle sitios degradables a la estructura del poliuretano a través del segmento rígido.

1.4.4 Aminoácidos y péptidos como extensores de cadena

Como parte del vertiginoso desarrollo de los poliuretanos para aplicaciones médicas, el empleo de aminoácidos como extensores de cadena se ha establecido por un lado como una alternativa viable para aumentar la susceptibilidad a la degradación en los poliuretanos segmentados, y por otro lado se ha demostrado que tanto los aminoácidos como las secuencias de ellos promueven la adhesión y proliferación celular^{65-67,70}. También se ha enfocado el estudio de la síntesis de poliuretanos segmentados con derivados de aminoácidos como extensores de cadena, en los cuales ya han sido empleados di ésteres de fenilalanina, L-lisina, L-tirosina, creatina o hidrocloreuro de L-ornitina^{64,67,76}. Las características que se deben analizar con el uso de aminoácidos y

péptidos como extensores de cadena en la síntesis de SPU incluyen: el efecto sobre las propiedades mecánicas, el incremento de la capacidad de endotelización del conducto vascular, y la biocompatibilidad con sangre mediante la liberación de óxido nítrico que evita la agregación plaquetaria. Se han llevado a cabo estudios en poliéster-amidas que contienen aminoácidos con la finalidad de obtener nuevos polímeros biodegradables, en los cuales se observó el aumento de la capacidad del polímero a la degradación enzimática debida a la presencia de los aminoácidos⁷⁹.

En este contexto, ya han sido utilizados los péptidos en la obtención de materiales para aplicaciones médicas como un tratamiento que modifica la superficie del polímero enlazando proteínas o péptidos sobre la misma, haciendo la función de ligantes entre las células y el propio material de soporte, lo cual convierte al polímero en un material bioactivo que puede ser reconocido por el ambiente biológico del tejido huésped⁸⁰⁻⁸². En forma más específica, un péptido puede ser enlazado a la superficie del soporte polimérico ya sea mezclándolo con otros compuestos que posean grupos funcionales que induzcan a la adhesión y proliferación celular, mediante copolimerización, o por tratamientos químicos y físicos que modifican la superficie del material mediante procesos de hidrólisis, óxido-reducción o también por deposición con plasma^{61,62,82}. Otro uso que se les ha dado a los péptidos es como extensor de cadena en la síntesis del poliuretano segmentado, en donde al hacerlo reaccionar con el exceso de diisocianato conforman el segmento rígido. Las secuencias de péptidos no solo han sido usadas para el caso del poliuretano segmentado, sino también para otros polímeros como el ácido poliláctico (PLA) o el ácido poliglutamico (PGL) en forma de copolímero tribloque (PGL-PLA-PGL)⁶³. Guan et al. han desarrollado poliuretanos sensibles a la degradación enzimática utilizando elastasa; en éste caso, la afinidad del poliuretano a este tipo de enzimas se logró mediante el uso del péptido AAK (Ala-Ala-Lys) como extensor de cadena⁷⁰.

La secuencia KGRGDG (Lys-Gly-Arg-Gly-Asp-Gly) se utilizó en la síntesis de poliuretano para su funcionalización y se llevó a cabo un estudio comparativo entre éste método y el de modificación superficial con plasma para determinar, mediante pruebas *in vitro*, la citotoxicidad, así como la adhesión y la proliferación celular⁸⁰. Otras aportaciones señalan el uso de secuencias de péptidos YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) como promotoras de la adhesión de células endoteliales y reducción de la adhesión

plaquetaria; ambas representan propiedades imprescindibles en el desarrollo de injertos vasculares sintéticos de bajo calibre^{82,83}.

Un aspecto que se debe resaltar es la importancia de la molécula de óxido nítrico (NO) como parte fundamental de la hemostasis y de la relajación del musculo liso vascular⁸⁴, o bien la inhibición de la agregación plaquetaria⁸⁵. Tanto la S-nitrosocisteína y el S-nitrosoglutatión son compuestos conocidos como S-nitrosotioles capaces de liberar NO^{86,87}. En particular, el Glutatión es la principal fuente de grupo tiol en células de mamíferos y está formado los aminoácidos L-ácido glutámico, L-cisteína y glicina⁸⁸ (ver Figura 1.9) los cuales también serán empleados individualmente como extensores de cadena en la síntesis del poliuretano segmentado. En adición a lo anterior, el GHS es reconocido como una forma de reserva de cisteína, la cual participa en el metabolismo de estrógenos, leucotrienos, y prostaglandinas; además de inducir a la maduración de sectores de diversas proteínas involucradas en la función de ciertos factores de transcripción (principalmente de tipo redox)⁸⁹. Por otro lado, los extensores de cadena propuestos introducen nuevas uniones químicas como amidas formadas por el isocianatos y los ácidos carboxílicos de los amino ácidos, tiocarbamatos que se producen a partir de la reacción entre el isocianato y el grupo tiol (SH) que contienen el glutatión y la cisteína, e inclusive los puentes de disulfuro que se pueden formar conduciendo a la modificación de las propiedades mecánicas y a la biodegradabilidad del poliuretano.

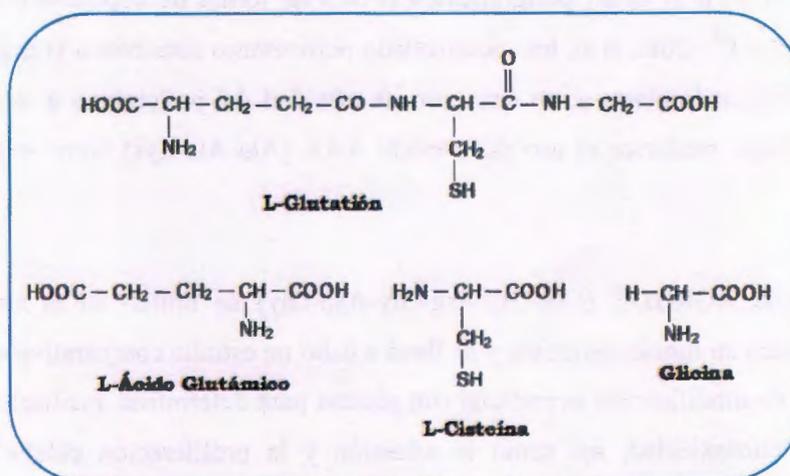


Figura 1.9 Estructuras del Glutatión y sus aminoácidos L-ácido glutámico, L-cisteína y glicina.

1.5 Justificación

En el plano mundial, las enfermedades cardiovasculares son consideradas como la primera causa de muerte en países occidentales de acuerdo a datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En México, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) ha estimado que estas afecciones al corazón representan el 18% del total de defunciones en el año 2010, por lo que se le considera un problema de salud pública. Por otro lado, la limitada disponibilidad de injertos vasculares naturales ha resaltado la necesidad de desarrollar nuevos materiales para su aplicación en la medicina regenerativa.

1.6 Hipótesis

La presencia de L-glutati3n, L-3cido glut3mico y glicina como extensores de cadena en poliuretanos segmentados permitir3 obtener materiales con propiedades mec3nicas similares a las que exhiben los vasos sangu3neos nativos as3 como materiales con buena adhesi3n de c3lulas endoteliales y de baja agregaci3n y activaci3n plaquetaria.

1.7 Objetivos

1.7.1 General

Sintetizar poliuretanos parcialmente biodegradables a base de L-glutati3n y amino3cidos (L-3cido glut3mico, L-ciste3na, y glicina) como extensores de cadena, y que adem3s funcionen como soportes polim3ricos para ingenier3a de tejidos con uso potencial en injertos vasculares de bajo calibre.

1.7.2 Espec3ficos

- 1) Sintetizar poliuretanos segmentados a partir de PCL, HMDI, y como extensores de cadena el L-glutati3n y los amino3cidos que lo conforman (L-3cido glut3mico, L-ciste3na y glicina).
- 2) Caracterizar fisicoqu3micamente y mec3nicamente los poliuretanos segmentados obtenidos.
- 3) Determinar la hemocompatibilidad de los SPU con sangre completa o plasma sangu3neo mediante pruebas de coagulaci3n y de activaci3n plaquetaria.
- 4) Determinar la biocompatibilidad de los SPU con c3lulas endoteliales.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de las políticas económicas implementadas en el sector público durante el periodo comprendido entre 1980 y 1990. Para ello se ha realizado un estudio de caso en el que se ha examinado el comportamiento de las cuentas públicas y el nivel de endeudamiento externo. Los resultados indican que, a pesar de las medidas adoptadas, se ha mantenido un déficit estructural que ha llevado a un aumento sostenido de la deuda externa. Este fenómeno se ha atribuido a una combinación de factores, entre los que destacan la falta de reformas estructurales y la dependencia excesiva de los recursos externos para financiar el gasto público.

1.1. Contexto

El estudio se enmarca en el contexto de la crisis económica que afectó a América Latina durante la década de los ochenta. En este periodo, los países de la región experimentaron una profunda recesión que se tradujo en un aumento de la deuda externa y una pérdida de competitividad. En particular, el sector público sufrió un deterioro significativo de sus cuentas, lo que generó un déficit crónico que no pudo ser cubierto únicamente con los recursos propios.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar las causas que originaron el déficit estructural en el sector público durante el periodo analizado. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos: analizar el comportamiento de las cuentas públicas; evaluar el nivel de endeudamiento externo; y examinar el impacto de las políticas económicas implementadas. Los resultados de este estudio podrán servir como base para la formulación de políticas más efectivas que permitan reducir el déficit y mejorar la sostenibilidad de las finanzas públicas.

1.3. Metodología

El estudio se ha desarrollado mediante un enfoque cuantitativo, utilizando datos secundarios obtenidos de fuentes oficiales. Se ha empleado el método de series de tiempo para analizar el comportamiento de las cuentas públicas y el nivel de endeudamiento externo. Los resultados se han presentado en forma de gráficos y tablas, lo que facilita la interpretación de los datos.

1.4. Estructura

El presente trabajo está estructurado de la siguiente manera: el capítulo I describe el contexto y los objetivos del estudio; el capítulo II presenta la metodología utilizada; el capítulo III muestra los resultados de la investigación; el capítulo IV discute las conclusiones y las recomendaciones; y el capítulo V contiene los anexos. Este documento tiene como propósito proporcionar una visión clara y detallada de los factores que han contribuido al déficit estructural en el sector público, así como de las medidas que se deben tomar para abordar este problema.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODO

En la síntesis de los poliuretanos segmentados (PUS), se utilizó como segmento flexible la poli caprolactona diol (PCL diol) de peso molecular de 2000 g/mol. Se empleó el 4,4'-metilen bis (ciclohexilisocianato) (HMDI) y como extensor de cadena se utilizaron L-Glutatión o cualquiera de los aminoácidos que lo forman (L-ácido glutámico, L-cisteína y glicina) para la formación del segmento rígido. La reacción fue catalizada con octanoato de estaño (2-etilhexanoato de estaño). Todos los reactivos se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich. Como disolvente (medio de polimerización) en la síntesis de poliuretano, se utilizó dimetilformamida (DMF) anhidra distribuida por Fluka. Para la caracterización de los poliuretanos se empleó Tetrahidrofurano (THF) como disolvente proveniente de la compañía J.T. Baker. La Figura 2.1 representa un resumen del procedimiento para la síntesis de poliuretanos.

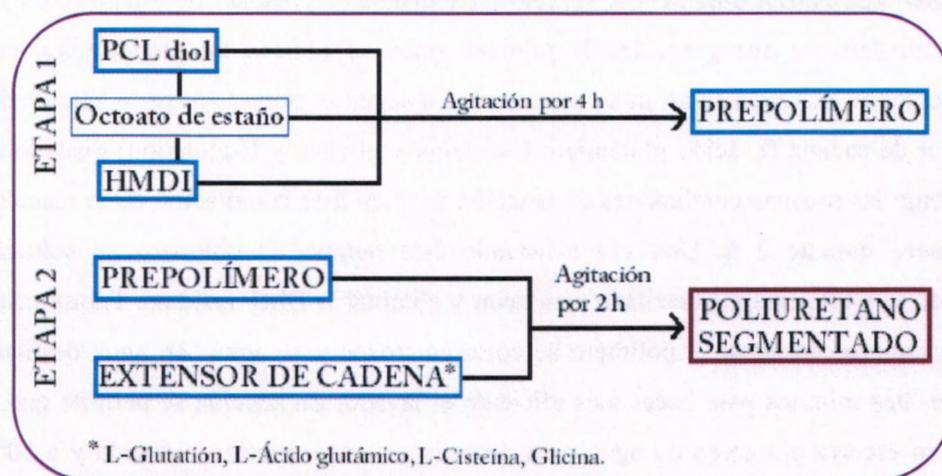


Figura 2.1 Diagrama de bloques del procedimiento para la obtención de poliuretanos segmentados por el método de dos etapas

Con la intención de obtener más información acerca de la interacción química de los aminoácidos y péptidos con el diisocianato en la conformación del segmento rígido, se obtuvieron cuatro compuestos modelo en relación molar 1:1, utilizando 4,4'-metilen bis ciclohexil diisocianato (HMDI) y el extensor de cadena (para cada caso se empleo

glutación, ácido glutámico, cisteína y glicina). Además, como control se sintetizó un poliuretano con 1,4-butano diamina (BDA) como extensor de cadena. Se empleo DMF como medio para llevar a cabo la reacción y como catalizador se usó el 2-etilhexanoato de estaño (octanoato de estaño).

2.1 Descripción del procedimiento de síntesis.

De acuerdo a la Figura 2.2, se llevó a cabo la síntesis de SPU a partir del método del prepolímero (dos etapas), bajo el esquema de la relación molar 1:2.1:1, correspondiente al polioliol, al diisocianato y al extensor de cadena respectivamente. Se tomó como temperatura inicial 60°C, sin embargo es importante tomar en cuenta el calor generado por la propia reacción así como el calor producido por la fricción inherente de la agitación mecánica. Ello conduce a alcanzar una temperatura del polímero en el intervalo de los 70-75°C al final de la reacción.

En la primera etapa se hacen reaccionar la PCL diol disuelta en DMF y se hace reaccionar con HMDI durante 4 h, reacción catalizada con octoato de estaño (0.03 %) bajo atmosfera de nitrógeno. De la primera etapa se obtiene un prepolímero, con terminaciones NCO reactivas en su estructura. La segunda etapa incluye la adición del extensor de cadena (L-ácido glutámico, L-cisteína y glicina, y L-glutación) disuelto en DMF bajo las mismas condiciones de reacción pero en éste la agitación de la reacción permanece durante 2 h. Una vez alcanzado éste tiempo, el polímero en solución obtenido se vierte en agua destilada para lavar y eliminar la DMF residual. Transcurrido un día inmerso en agua, el polímero se corta en trozos y se agita en agua destilada durante diez minutos para hacer más eficiente el lavado. En seguida se permite que el polímero escurra el exceso de agua para después secarlo a presión reducida y a 60°C durante 36 h.

Es importante destacar que durante el desarrollo de la síntesis, los isocianatos reaccionan vigorosamente con aminas primarias, alcoholes primarios y ácidos carboxílicos, los cuales son parte de la estructura de los extensores de cadena utilizados, presentando velocidades de reacción relativas de 100000, 100 y 40 respectivamente para cada grupo funcional. La figura 2.2 describe las posibles reacciones y la estructura lineal propuesta para los poliuretanos obtenidos.

La Figura 2.3 representa las diferentes estructuras de los correspondientes entrecruzamientos de acuerdo al extensor de cadena empleado. Siendo las reacciones de entrecruzamiento probables las que se forman por la reacción del isocianato con el grupo tiol del extensor de cadena L-glutación o L-cisteína obteniéndose un tiocarbamato, o las de puentes disulfuro formadas por los extensores de cadena recién mencionados, y una última reacción podría llevarse a cabo entre el isocianato y los grupos carboxílicos de los amino ácidos. No se observaron reacciones de entrecruzamiento químico en los poliuretanos sintetizados a base de glicina y de ácido glutámico, lo anterior se establece tomando en cuenta el parámetro de solubilidad, ya que las películas de poliuretano con estos dos extensores de cadena fueron obtenidas mediante la disolución del polímero en tetrahidrofurano (THF) al 5% (m/v), para después llevar a cabo su caracterización como se describirá en los capítulos siguientes. Un comportamiento diferente frente a la solubilidad presentaron los poliuretanos sintetizados con L-glutación y L-cisteína como extensores de cadena. En este caso el sistema presentó la formación de gel, es decir, una fracción del polímero resultó insoluble en el solvente que se empleó. El comportamiento anterior se entiende como un indicio de la formación de entrecruzamientos. De acuerdo con el amino ácido empleado como extensor de cadena, en lo posterior se hará referencia a ésta serie de poliuretanos como PU GLUTACIÓN, PU CISTEÍNA, PU ÁCIDO GLUTÁMICO y PU GLICINA.

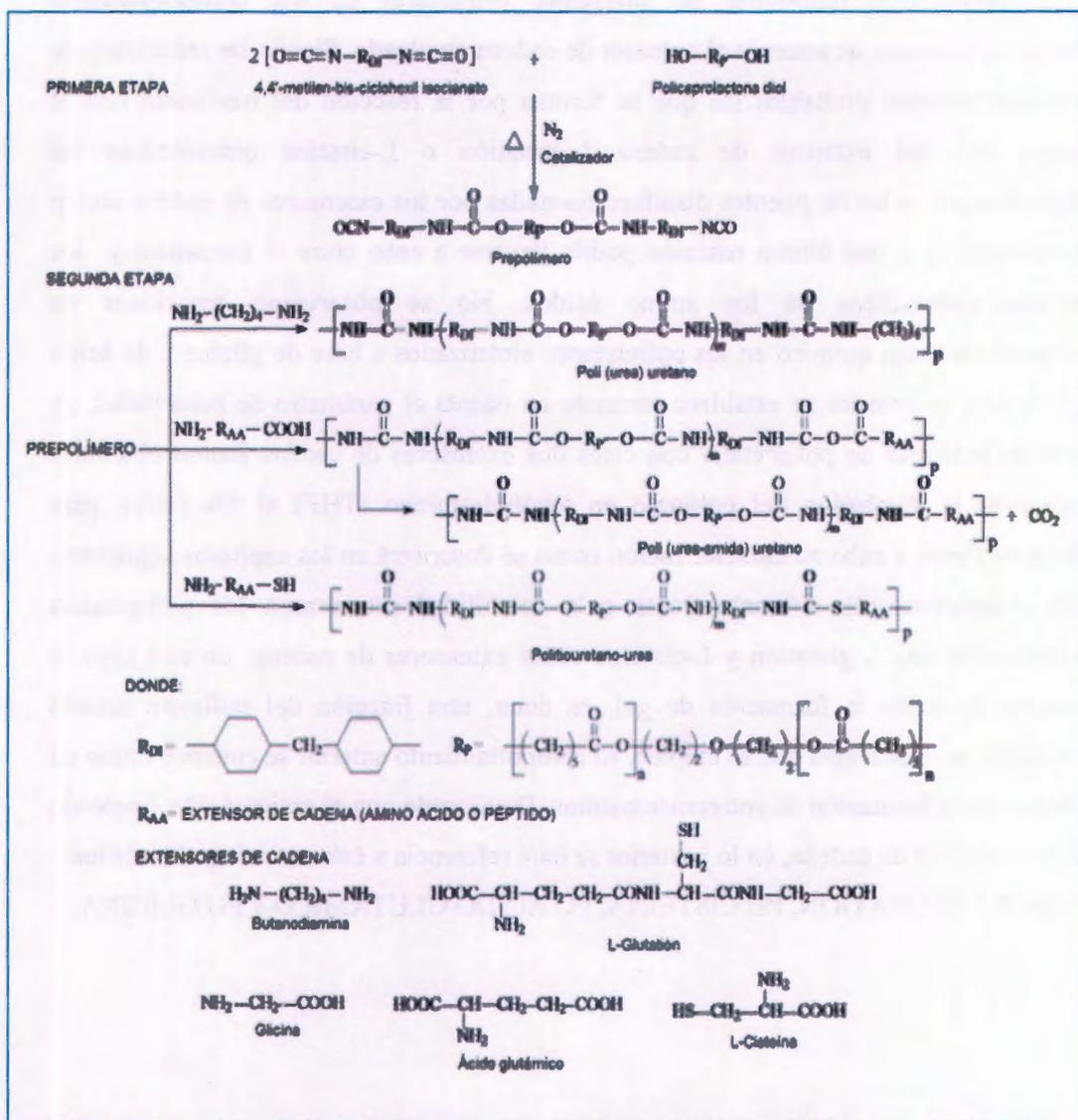


Figura 2.2 Esquema de la ruta de síntesis para la síntesis de poliuretanos segmentados por el método de dos etapas

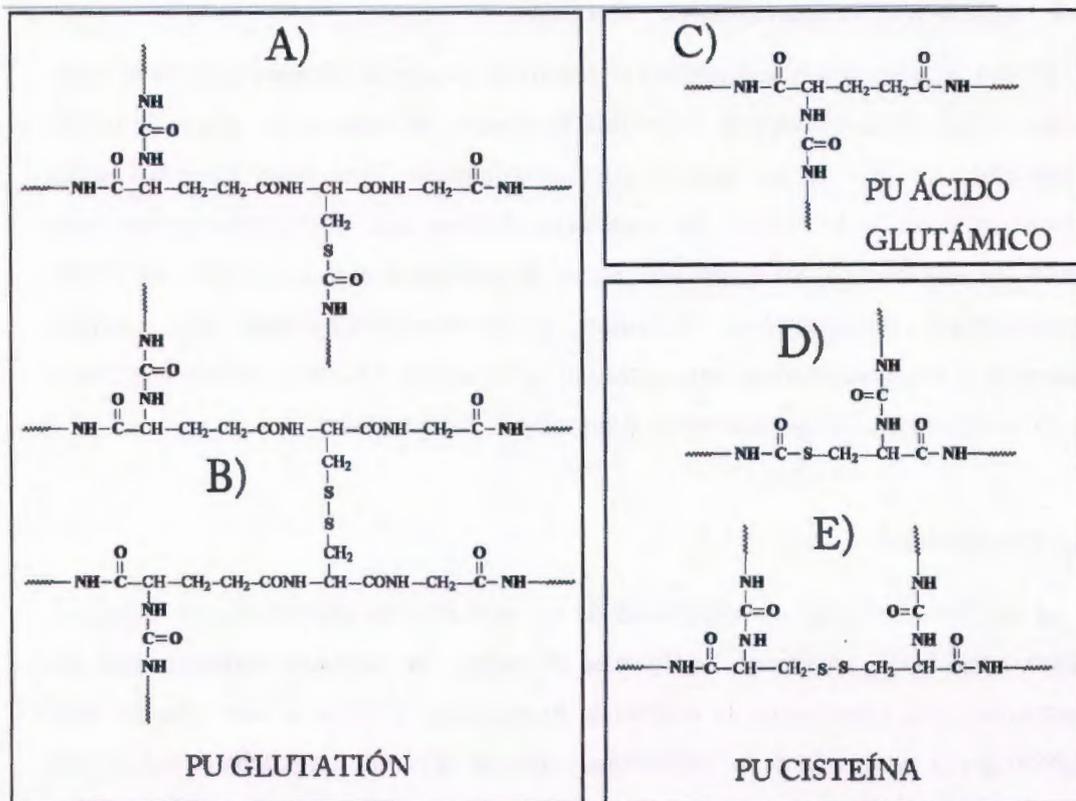


Figura 2.3 Probables reacciones de entrecruzamiento en la síntesis de poliuretano de acuerdo al extensor de cadena empleado

En la Tabla II se reportan el rendimiento de la reacción así como el análisis elemental. Estos datos son importantes ya que permiten establecer las bases para la discusión de los resultados que se presentan más adelante.

Tabla 2.1 Rendimiento de la reacción de obtención de PU y análisis elemental

Poliuretano	Rendimiento (%)	Nitrógeno (%)	Azufre (%)
PU GLUTATIÓN	90.4	8.0	0.62
PU CISTEÍNA	93.7	6.0	1.1
PU ÁCIDO GLUTÁMICO	86.4	5.7	-----
PU GLICINA	86.0	5.52	-----
PU BDA	94.7	-----	-----

2.2 Caracterización fisicoquímica y mecánica

Dentro de la medicina regenerativa el desarrollo de nuevos biomateriales tiene como objetivo reproducir (imitar) en lo posible la función de soporte que aporta la matriz extracelular (MEC) de los tejidos, que temporalmente guía tanto funcional como estructuralmente la formación de constructos tisulares que sirven para reparar algún daño. En éste sentido, los materiales que se desarrollan deben de cumplir con ciertas características fisicoquímicas, mecánicas y de biocompatibilidad, que permitan acercarse a las características intrínsecas del tejido nativo. De ahí el interés de llevar a cabo la caracterización de cada nuevo desarrollo de biomateriales.

2.2.1 Solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad de los poliuretanos sintetizados en diferentes disolventes (THF, Acetona, DMF) con el objeto de preparar películas para su caracterización. Finalmente, la obtención de películas se llevo a cabo usando THF debido que la disolución de los poliuretanos fue más eficiente. La prueba de solubilidad es importante ya que, entre otros factores, ésta determina las características de la superficie del material cuando se forma la película de polímero por evaporación de solvente.

2.2.2 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto estático se determinó usando agua destilada a temperatura ambiente mediante el método de gota sésil. 2 μ l de agua se colocaron con una jeringa sobre la superficie de la muestra durante 5 s para después determinar el ángulo de contacto. Las mediciones se hicieron en cuatro puntos en cada muestra en un equipo VCA Optima utilizando agua destilada.

2.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar la estructura y los principales grupos funcionales químicos formados en los poliuretanos sintetizados se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo (Nicolet Protegé 460 Magna FTIR). La obtención de los espectros se llevo a cabo mediante un proceso de preparación de película sobre pastillas de KBr y el análisis se llevó a cabo a 4 cm^{-1} de resolución en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} con 100 barridos.

2.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JEOL, JSM 6360LV) acoplado a un EDX (Oxford Instruments, INCA Energy 200) para el análisis de las superficies de los poliuretanos así como el análisis elemental de los mismos.

2.2.5 Determinación de peso molecular por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

Los pesos moleculares se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de permeación en gel (Agilent 1100), con dos columnas adaptadas (Zorbax PSM 60S y 1000S), utilizando DMF como eluyente con un flujo de 1 ml/min. Para la calibración se utilizaron estándares de poliestireno monodisperso 1,050 a 420,600 g/mol.

2.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para la determinación de la temperatura de fusión (T_m) los SPU obtenidos fueron caracterizados utilizando un equipo DSC-7 Perkin-Elmer. Aproximadamente 10 mg del polímero fueron encapsulados en charolas de aluminio y calentados de 0 a 150°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min., en atmósfera de nitrógeno.

2.2.7 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

La temperatura de transición vítrea (T_g) de la serie de SPU se obtuvo por análisis dinámico mecánico en un equipo DMA-7 de Perkin-Elmer (Norwalk, CT) en modo de extensión. Las probetas (15 x 3.5 x 0.1) mm se calentaron de -100 a 100°C a 5 °C min⁻¹ usando fuerza estática de 90 mN y fuerza dinámica de 70 mN a 1 Hz.

2.2.8 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Las temperaturas de descomposición se determinaron por medio de análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés TGA) con un equipo TGA-7 (Perkin-Elmer) en condiciones de temperatura de 45°C a 600 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno.

2.2.9 Difracción de Rayos X (DRX)

La cristalinidad de los SPU fue obtenida mediante difracción de rayos X de ángulo amplio usando un difractómetro D-5000 Siemens (Karlsruhe, Germany) con radiación monocromática ($\text{Cu K}\alpha = 1.5418 \text{ \AA}$) a 35 kV y 24 mA. Muestras de las películas de SPU de 1 cm^2 se usaron en el intervalo de $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$ con un tiempo de 3 s y tamaño de paso de $0.02^\circ (2\theta)$.

2.2.10 Pruebas Mecánicas a Tensión

Las propiedades mecánicas a tensión de los SPU fueron obtenidas de acuerdo a la norma ASTM D-412 usando un equipo de pruebas universal Shimadzu (Kyoto, Japan) con una velocidad de cabezal de 500 mm/min. A partir de los datos se calcularon el Módulo de Young a 100% (E^{100}), la resistencia al esfuerzo a tensión (σ) y la deformación (ϵ).

2.2.11 Pruebas de degradación

La degradación acelerada se llevó a cabo con 200 mg de muestra a 100°C durante 24 horas a reflujo para cada poliuretano de la serie. Para tal procedimiento se emplearon medios de agua destilada, ácido clorhídrico (HCl) 2 M e hidróxido de sodio (NaOH) 5 M para la evaluación de la degradación hidrolítica, mientras que para la degradación oxidativa se realizó usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% e hipoclorito de sodio al 2.5%, ambos medios en solución acuosa. Se calculó el porcentaje de pérdida de masa considerando la masa residual menos la masa inicial y dividiendo éste resultado por la propia masa inicial.

2.3 Evaluación de la Hemocompatibilidad

2.3.1 Determinación del tiempo de coagulación por el método de Lee-White y tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT por sus siglas en ingles)

Para las pruebas de tiempo de coagulación Lee-White se empleó sangre completa evaluada en tubos previamente recubiertos de SPU. El recubrimiento de los tubos se llevó a cabo a partir de soluciones obtenidas de cada SPU con THF como solvente. En

el caso las pruebas APTT se usó plasma humano para detectar el tiempo de coagulación. La sangre venosa humana se obtuvo de voluntarios saludables libres de medicación por al menos 10 días. Para ambas pruebas el primer tubo de sangre colectada fue descartado, ya que la injuria de la vena inicialmente desencadena la cascada de coagulación al detectar la aguja como un cuerpo extraño. Al eliminar la primera extracción de sangre se asegura de que las siguientes muestras son de sangre obtenida del flujo normal.

Ensayo Lee-White: 2 ml de sangre venosa se colocaron en cada tubo e inmediatamente fue agitado cuidadosamente. El tiempo de formación del coágulo fue determinado visualmente y medido con un cronómetro.

Ensayo APTT: La sangre completa fue centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos y se utilizó el plasma para la prueba. Los tubos recubiertos de SPU fueron colocados en un baño de agua a 37°C y luego se añadieron 100 µL del plasma y 100 µL del reactivo I (ácido elálgico, SPINREACT Spain) a cada tubo y se incubó por 5 minutos. Después de transcurrido ese tiempo se agregaron 100 µL del reactivo II (cloruro de calcio 0.02 M, SPINREACT Spain) a cada tubo y se agitaron cuidadosamente hasta observar la formación del coágulo de fibrina, registrando el tiempo al cual ocurría esto.

2.3.2 Evaluación de activación plaquetaria mediante citometría de flujo

Para éste análisis se utilizó sangre total humana, la cual fue obtenida de un voluntario saludable que no ingirió medicamentos por lo menos durante los últimos 10 días, conforme al protocolo del Hospital del Niño Morelense. La sangre fue colectada en tubos Vacutainer con citrato de sodio (BD Biosciences). El primer tubo con sangre fue desechado, mientras que la sangre colectada en los tubos subsecuentes se mantuvo en movimiento en un agitador orbital (Roto Shake Genie, Scientific Industries™). La sangre fue usada dentro de los 15 minutos después de ser colectada. Para el control positivo se preparó una solución 200 mg/ml de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) en sangre total. Se colocaron las membranas de SPU en una caja de 24 pozos y se adicionaron 100 µl de sangre total sobre cada una de ellas. En otros tres pozos se agregó el control positivo (100 µl/pozo). Se incubó a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂ durante 1 hora. Un segundo control se preparó durante los últimos 10 minutos del periodo de incubación y éste se mantuvo a temperatura ambiente. 5 µl de la sangre sobre la

superficie de las membranas, así como de los controles, fueron transferidos a tubos 12x75 mm (BD Biosciences). Se adicionaron 2 μ l de anti-CD61 marcado con isotiocianato fluoresceína (FITC) y anti-CD62P marcado con aloficocianina (APC) y se completó a 100 μ l con buffer de Tyrode albumina-glucosa a pH de (7.4). Los tubos fueron agitados cuidadosamente e incubados 20 minutos en la oscuridad. Para fijar las plaquetas se adicionaron 100 μ l de una solución fría de paraformaldehído al 1% en PBS. Para finalizar la preparación de las muestras hacia el análisis por citometría de flujo, se agregaron a los tubos 1ml de buffer de Tyrode albumina-glucosa frío para su dilución.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro Becton Dickinson (BD FACS Aria™). Por cada muestra de sangre se colectaron 10,000 eventos positivos de CD61-FITC, lo anterior se puede visualizar en la gráfica representativa CD61 contra complejidad (SSC) de la Figura 2.3 Estos eventos identifican subpoblaciones como las plaquetas, aunque también CD61 puede identificar células endoteliales y osteoclastos. De la región seleccionada por CD61, se identifican las plaquetas que se han activado mediante la expresión de CD62P. Esto último se expresa como porcentaje de activación por contacto con el SPU en eventos positivos para CD62P del total de la población de plaquetas.

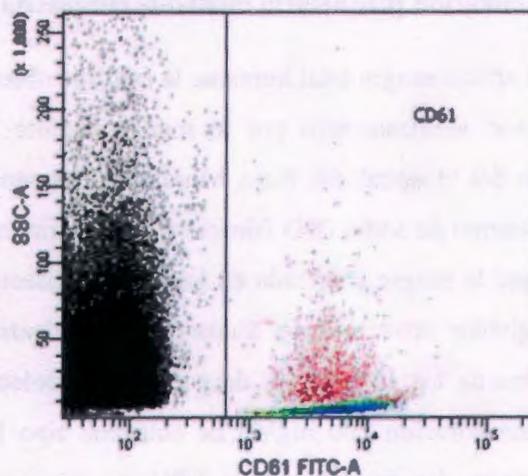


Figura 2.4 Selección de la población de plaquetas con CD61 FITC

2.4 Biocompatibilidad con células endoteliales

Las células endoteliales, formadoras de la superficie interna de los vasos sanguíneos, fueron obtenidas a partir de cultivos primarios de cordón umbilical humano, de acuerdo al protocolo de la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular del Hospital del Niño Morelense y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Las células fueron cultivadas empleando medio Endogro-VEGF™ (Millipore™), en formulación baja en suero y sin antimicrobiales. Se sembraron 40,000 células/cm² sobre cada muestra de SPU en película, y como control positivo se sembró la misma cantidad de células sobre cubreobjetos tratados superficialmente con poli D-Lisina. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 24 horas. Antes de terminado el tiempo de incubación (24 horas) se prepararon las soluciones de Calceina AM y Homodímero de Etidio (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity assay kit, Invitrogen™), ambas de concentración 2 µM. Se retira el medio celular de las películas sembradas y se hacen tres lavados con PBS. Después del tercer lavado se adicionan 200 µl de la solución a cada película y se incuba por 30 minutos. Se observa al microscopio de fluorescencia (Olympus BX-UCB) y se obtiene el registro por fotografías de la tinción celular: células vivas en color verde (filtro 3) y células muertas en color rojo (filtro 4). Éste es un procedimiento que valida la adhesión celular a 24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se enmarca en el contexto de trabajos previos que se asemejan estrictamente en el uso de los amino ácidos como extensores de cadena y de cómo éstos influyen, ya sea en las propiedades térmicas y mecánicas, o bien en el efecto de su uso sobre el desempeño de los polímeros en el ámbito biológico^{66,67}.

3.1 Caracterización por FTIR

La química de formación de poliuretano es demasiado compleja debido al hecho de que el isocianato puede reaccionar de diferente manera con grupos funcionales como hidróxi (OH), amino (NH₂), y carboxílico (COOH)⁴². Por lo anterior, es de esperarse que la reacción del prepolímero terminado en NCO con el GSH o cualquiera de sus amino ácidos puede exhibir bandas en el espectro de infrarrojo características de uretano (HNCOO), urea (HNCONH), amida (CONH) o tiocarbamato (HNCOS), provenientes de la reacción del NCO con los grupos funcionales alcohol (OH), amina (NH₂), ácido carboxílico (COOH) y tiol (SH) respectivamente. La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es un procedimiento cuya sensibilidad permite conocer como se configuran las macromoléculas⁹¹, y es una herramienta importante que puede ser aplicada en trabajos enfocados al estudio de la cinética de reacción de la obtención de poliuretanos, siendo la principal característica el monitoreo del contenido residual del grupo isocianato (NCO) en forma decreciente^{92,93}.

Los espectros de FTIR se muestran en la Figura 3.1, en donde se puede observar señales correspondientes a la vibración de estiramiento N-H (Amida A) en 3330-3380 cm⁻¹ y los grupos carbonilo-uretano (Amida I) en 1720-1735 cm⁻¹^{94,95}. Las interacciones N-H y C-N (Amida II) se observan en 1580-1650 cm⁻¹. Los poliuretanos PU ACIDO GLUTAMICO y PU GLICINA exhiben dos señales correspondientes a la absorción amida II en 1550 cm⁻¹ y 1530 cm⁻¹, mientras que la primera señal no es perceptible en PU CISTEINA y en PU GLUTATION a pesar de que éste último presenta en su estructura más grupos amida formados a partir de la unión química entre

el grupo amino y el grupo carboxílico de los amino ácidos, los cuales se conocen como enlaces peptídicos.

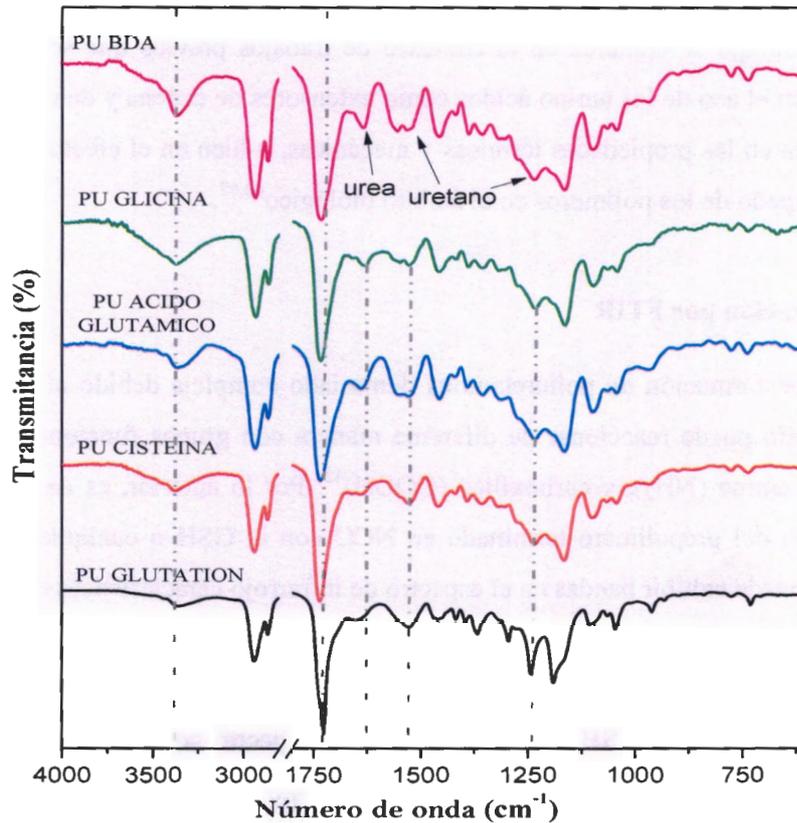


Figura 3.1 Espectros FTIR de SPU sintetizados con diferente extensor de cadena

Para un análisis más detallado de la síntesis de poliuretano segmentado, se dio seguimiento de la reacción comparándola con el espectro del poliuretano sintetizado con glutatión como extensor de cadena. Se tomó una muestra del prepolímero en el reactor a las 2 horas, a las 3 horas y a las 4 horas, tiempo en el cual se completa la primera etapa de la ruta de síntesis. En la Figura 3.2, se puede resaltar que la señal característica del grupo NCO (2270 cm^{-1}) va desapareciendo a medida que transcurre la reacción y consumiéndose totalmente al formarse el poliuretano (PU GLUTATIÓN).

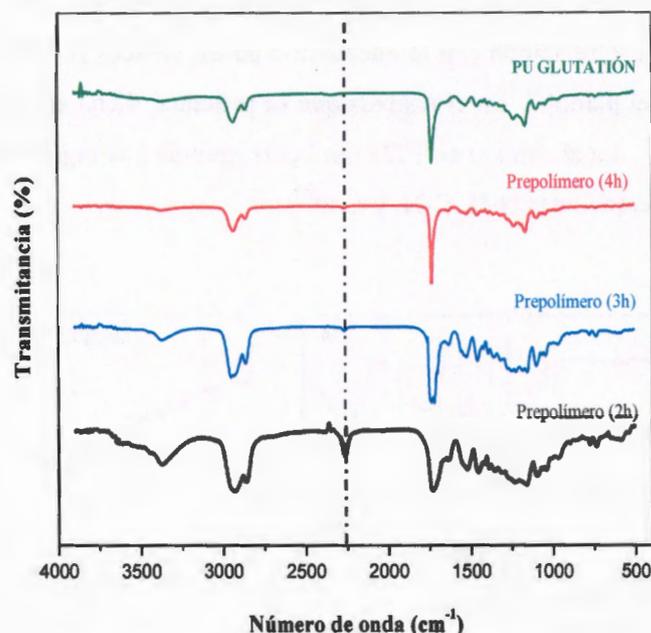


Figura 3.2 Seguimiento de la síntesis de poliuretano con glutatión como extensor de cadena mediante FTIR

Aunado a lo anterior, fue comprobada la reacción entre el diisocianato (HMDI) y el extensor de cadena correspondiente en relación molar 1:1. A través de los compuestos modelo (Figura 3.3A) se analiza la región de la amida A⁹⁴, en la cual se observa una vibración de estiramiento alrededor de 3340 cm^{-1} correspondiente a N-H unido por enlace de hidrógeno; mientras que no se observa la señal en el intervalo de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ relacionado con el grupo N-H no enlazado por puente de hidrógeno^{76,95}, a partir de lo anterior se puede inferir que la mayoría de enlaces amida están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno. La banda amida I está representada en el área sombreada de la Figura 3.3B, ésta se localiza en el intervalo de $1690\text{ y }1760\text{ cm}^{-1}$ en donde se encuentran las vibraciones entre $1700\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ propia de los carbonilos⁷⁶ que en este caso provienen de las amidas; nótese que esta señal no se percibe en el compuesto modelo obtenido a partir de butanodiamina (BDA), mediante el cual solo se obtienen grupos urea. Lo anterior se puede corroborar en la Figura 3.1 en la cual el PU BDA exhibe esta señal que proviene ya sea del grupo ester de la PCL o bien del grupo uretano. La señal de 1638 cm^{-1} se relaciona con la vibración del grupo carbonilo unido por enlace de hidrógeno ya sea del grupo urea (de la reacción NCO-NH_2) o del grupo carboxílico que reacciona con el grupo NCO para formar enlaces amida, dicha señal

también se encuentra en la región de la amida I^{76,95}. En 1515-1570 cm^{-1} se establece la banda de amida II, ésta se relaciona con la interacción de los enlaces N-H (vibración) y C-N (deformación en el plano)⁹⁴. En el análisis que se presenta, dicha señal se observa alrededor de 1550 cm^{-1} . La absorción en 1225 cm^{-1} corresponde a la región de amida III relacionada con las interacciones N-H, C-N, y C-O⁹⁴.

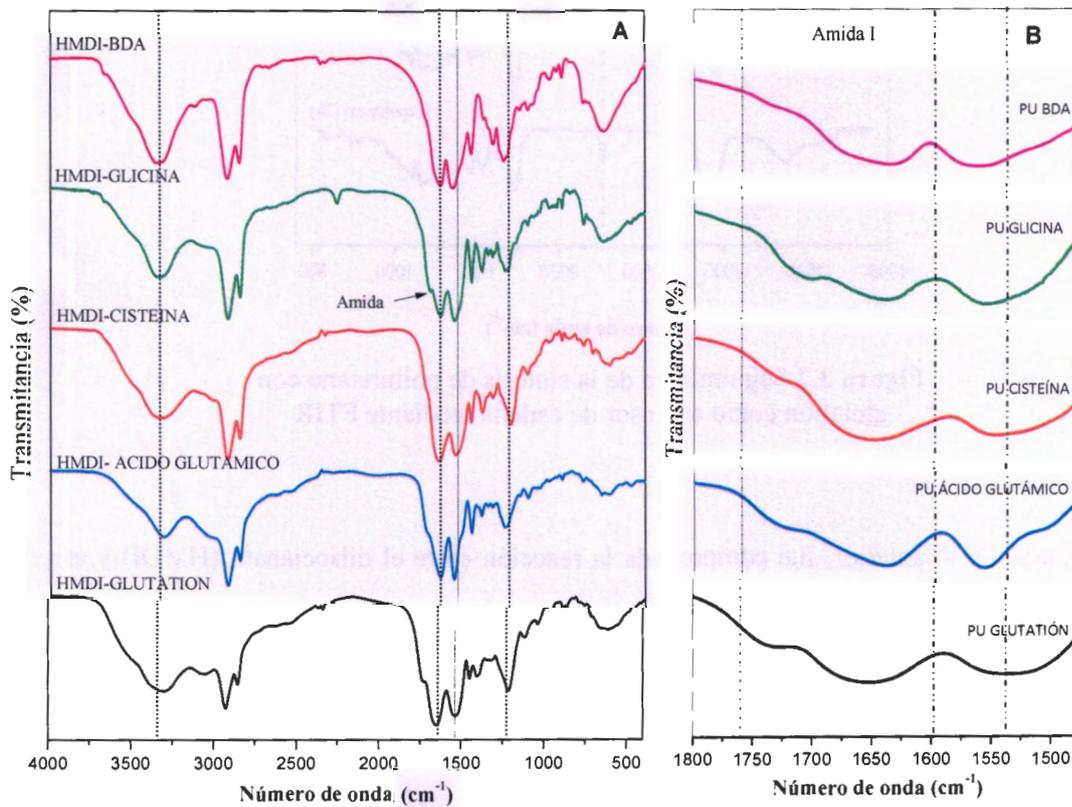


Figura 3.3 A) Compuestos modelo (diisocianato-extensor de cadena): L-glutión, L-ácido glutámico, L-cisteína, glicina, y el control BDA. B) ampliación de la región de carbonilos

En la Figura 3.4 se presenta el análisis de infrarrojo del compuesto modelo NCO-Glutión, así como el espectro de sus constituyentes, corroborando la formación de los enlaces amida a los que se hace referencia en la Figura 3.3. El mismo análisis se realizó con los extensores de cadena restantes. De esta forma también se demuestra que se lleva a cabo la reacción entre el diisocianato y los amino ácidos.

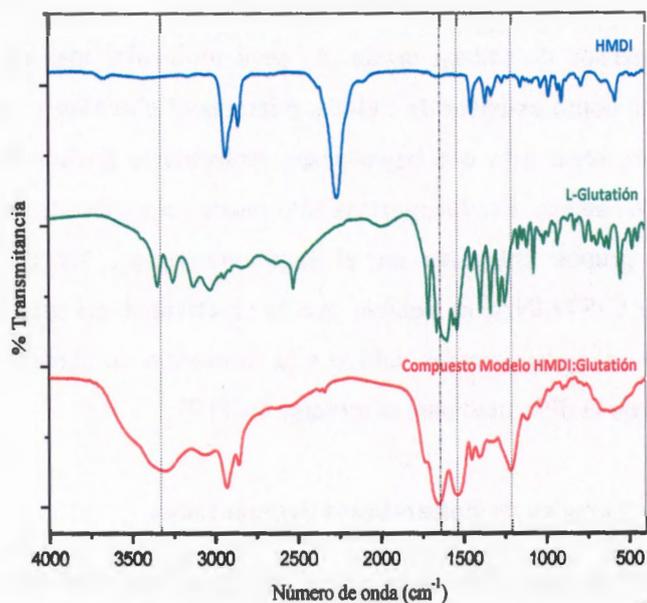


Figura 3.4 Espectros del compuesto modelo HMDI-Glutatión y de los compuestos que lo forman

Aun cuando los compuestos modelos resultaron ser compuestos entrecruzados dada su nula solubilidad, la banda amida I fue claramente detectada en 1640 cm^{-1} , ésta incluye amidas libres y amidas enlazadas⁹⁵; mientras que la amida II se observó entre $1538\text{-}1558\text{ cm}^{-1}$. La reacción entre el isocianato y los grupos tiol (L-glutatión y L-cisteína) conduce a la formación de tiocarbamato cuya señal se esperaba ser observada en 1689 cm^{-1} , sin embargo en este caso fue enmascarada por la absorción de la amida I. Por lo tanto, no fueron detectadas reacciones secundarias de isocianato formadoras de alofanatos o biuretes las cuales pueden conducir a entrecruzamientos; este comportamiento se debe a diversos factores que influyen en la síntesis como la baja concentración de grupos tiol y ácidos carboxílicos, la alta reactividad de otros grupos funcionales presentes como NH_2 y OH , o debido a la baja reactividad de los isocianatos alifáticos (HMDI).

3.2 Cromatografía de permeación en gel (CPG)

Debido a que en ésta caracterización no se empleó LiCl se observó una distribución de pesos moleculares multimodal, ya que solo se usó DMF (grado HPLC) como eluente.

Se determino el peso molecular de la fracción soluble de los poliuretanos, los valores se reportan en la Tabla 3.1. Se observan diferentes pesos moleculares y polidispersidad dependiendo del extensor de cadena usado. El peso molecular más alto se observa cuando se usa glicina como extensor de cadena, mientras el glutatión y la cisteína, que contienen grupos tiol, resultaron con bajos pesos moleculares posiblemente debido a una baja extensión de cadena. Ese comportamiento puede ser explicado debido a la baja reactividad de los grupos colgantes en el segmento rígido. En el caso de PU GLUTATION y PU CISTEINA, es posible que la reactividad del grupo tiol evite la formación de macromoléculas grandes debido a la formación de puentes de disulfuro, siendo esto evidente en la dificultad para disolverse en THF.

3.3 Caracterización Térmica de Poliuretanos Segmentados

En la mayoría de los casos, los dispositivos que han sido fabricados a partir de materiales poliméricos se ven sometidos a diferentes condiciones térmicas. Por tal motivo es fundamental llevar a cabo la caracterización correspondiente en trabajos como el presente, en el que se desarrollan nuevos materiales.

3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En cuanto al análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en ingles) (Figura 3.5) se detectó la temperatura de fusión de la policaprolactona (PCL) en un intervalo de 38 a 57°C, siendo esta diferente dependiendo del aminoácido empleado como extensor de cadena, el cual de acuerdo a sus grupos pendientes, tienen un efecto en el volumen libre del polímero y su cristalinidad^{76,96}. El segmento rígido no mostró temperatura de fusión como ya se había reportado para SPU's similares en cuanto al uso de amino ácidos como extensores de cadena^{67,76}, esto último debido a la baja proporción de segmento rígido en relación a la cantidad de segmento suave en esta serie de poliuretanos^{76,96}. Aunado al trabajo anterior se realizaron pruebas de DSC en compuestos modelo del segmento rígido, haciendo reaccionar el diisocianato con los amino ácidos en relación 1:1, corroborándose tal comportamiento. La cristalinidad es un parámetro importante debido a que en los poliuretanos segmentados esta propiedad se ve afectada por la interacción entre el segmento rígido y el segmento flexible⁹⁷. El porcentaje de cristalinidad fue calculado de acuerdo a reportes previos en los cuales

utilizan la entalpía de fusión y como referencia la entalpía de la PCL de 100% de cristalinidad (136 J/g)⁹⁸⁻¹⁰⁰ estos resultados se reporta en la Tabla 3.1. Los datos de ésta muestran que el porcentaje de cristalinidad es mayor en el PU GLICINA y el menor porcentaje lo presenta el poliuretano control PU BDA. De lo anterior es importante destacar que aun cuando los dos poliuretanos se conforman a partir de un extensor de cadena bifuncional (glicina y BDA), la estructura de la molécula de la glicina es más corta que la molécula de BDA. La primera no posee una extensión más allá de los cuatro sustituyentes en el carbono alfa del amino ácido lo cual permite un mayor empaquetamiento de las macromoléculas adyacentes y por lo tanto la mayor cristalinidad que exhibe; mientras que en el BDA presenta cuatro grupos metileno a lo largo de su estructura. Esto último conlleva a que una macromolécula extensa pueda tener mayor probabilidad de rotar o flexionarse y con ello se limita la probabilidad de que las estructuras de las macromoléculas puedan experimentar un ordenamiento tal que pueda conducir a la formación de regiones cristalinas en el polímero. En cuanto a los extensores de cadena con ramificaciones ($f > 2$) es de esperarse que aumente el volumen libre y con ello se restrinja la formación de zonas cristalinas en la estructura del polímero, de ahí que el porcentaje de cristalinidad sea menor al que presenta un monómero con funcionalidad 2.

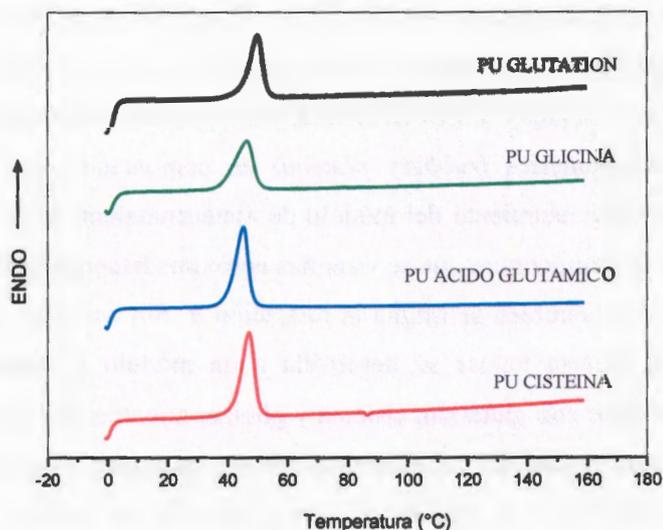


Figura 3.5 Termogramas de DSC de la serie De SPU's con diferente extensor de cadena.

Tabla 3.1 Propiedades fisicoquímicas de Poliuretanos.

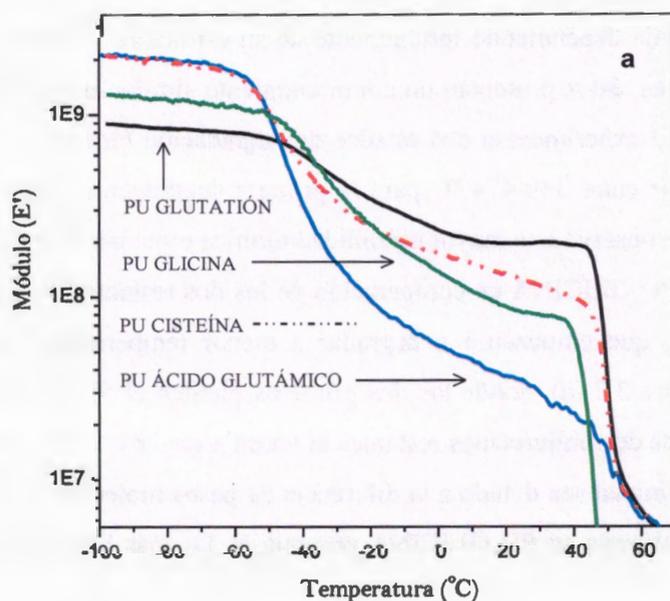
POLIURETANO	Mn(g/mol)/PDI*	T _g (°C)	T _m (°C)	T _{d1} /T _{d2} (°C)	Cristalinidad (%)
PU GLUTATION	24,073/ 2.14	-36	49.6	360/466	43.5
PU CISTEINA	30, 349/ 2.51	-33	43.7	350/469	34.6
PU ACIDO GLUTAMICO	57,376/1.65	-30	42.2	358/471	37.5
PUGLICINA	111,790 /1.55	-32	52.2	349/472	50.5
PU BDA	128,000/1.38	-43	53.9	375/474	16.3

* Índice de polidispersidad

3.3.2 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

En el análisis dinámico-mecánico (Figuras 3.6a y 3.6b) se muestra el módulo de almacenamiento y la $\tan \delta$ relacionados con la rigidez de los polímeros y su capacidad de absorción de energía, y las transiciones α que se relacionan con la T_g del polímero cuyos valores se muestran en la Tabla 3.1. Las transiciones y relajaciones que se detectan mediante esta técnica están relacionadas con el comportamiento dinámico de las macromoléculas cuando se les va adicionando energía, en éste caso, mediante el aumento de temperatura. En el caso de PU CISTEÍNA (2.1×10^3 MPa) y PU ÁCIDO GLUTÁMICO (2.1×10^3 MPa) éstos se exhiben como materiales con mayor rigidez que PU GLUTATIÓ (883 MPa) y PU GLICINA (1.2×10^3 MPa) al presentar aquellos un valor de módulo de almacenamiento inicial mayor. Se observa también que PU CISTEÍNA, PU GLUTATIÓ y PU GLICINA una transición más sutil de la parte vítrea a la parte elastomérica (*rubbery plateau*) en comparación con PU ÁCIDO GLUTÁMICO, cuyo decrecimiento del módulo de almacenamiento (E') es abrupto en un intervalo menor de temperatura que se visualiza aproximadamente entre -60 °C y -50 °C, intervalo en el cual también se asigna la relajación α . Sin embargo, después de la transición vítrea la meseta hulosa se desarrolla a un módulo E' mayor para los poliuretanos sintetizados con glutatió, cisteína y glicina; mientras que dicha meseta no está bien definida para el caso del poliuretano con ácido glutámico. A pesar de que Bae et al.¹⁰¹ sugieren que la T_g y el módulo (E') en la zona hulosa (*rubbery plateau*) son mayores en el caso de segmentos rígidos conformados con extensores de cadena lineales, el PU GLICINA, cuya funcionalidad es 2, presentó un módulo de almacenamiento (93 MPa) menor en la zona hulosa inclusive más bajo que PU

GLUTATION (198 MPa) y PU CISTEINA (106 MPa) que tienen grupos colgantes en su estructura; sin embargo, se debe resaltar que los grupos funcionales provenientes de los amino ácidos son grupos reactivos, mientras que los presentados por el trabajo al que se hace referencia no lo son (CH_3). La parte coincidente con éste trabajo es el hecho de que los extensores de cadena moderadamente voluminosos exhiben una región hulsosa bien definida y extendida, lo cual sucede con la serie de poliuretanos que aquí se analiza; además, una meseta bien definida indica que el polímero tiene cierto grado de entrecruzamiento relacionado con la cantidad de segmento rígido en la muestra¹⁰², siendo esto observado en la formación de gel identificada como la parte insoluble del polímero que se mencionó en la sección experimental. Finalmente en la Figura 3.5a se puede observar la relajación atribuida a la temperatura de fusión en el intervalo de temperatura de 40 °C a 55 °C. Por otro lado en la Figura 3.5-b correspondiente a la $\text{Tan } \delta$, en general se observa una transición intensa atribuida a la gran movilidad molecular del segmento suave en la cercanía de su T_g , éste último parámetro está relacionado con la relajación alfa en el análisis dinámico mecánico. El cambio en la T_g se puede atribuir a la distribución del segmento rígido en la matriz del segmento suave. El comportamiento de poliuretanos elastoméricos ya ha sido reportado a través la asignación de una relajación característica relacionada con el movimiento casi total de las moléculas de segmento flexible¹⁰³. Una característica de los uretanos de grado médico y otros polímeros entrecruzados es que presentan una T_g no muy definida, por esa razón la sensibilidad del DMA es aprovechada para detectar ese tipo de relajaciones estructurales ya que en DCS no siempre es posible visualizar¹⁰⁴.



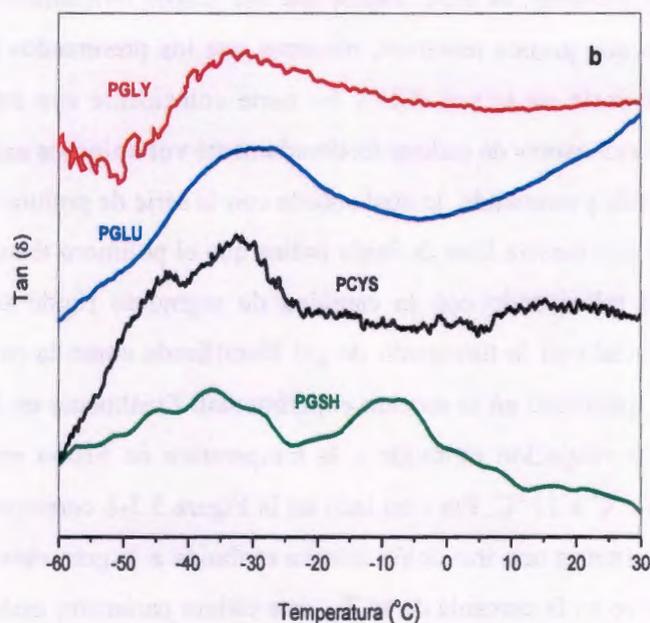


Figura 3.6 Análisis dinámico-mecánico de la serie de SPU con diferente extensor de cadena, a) Módulo y b) Tan δ .

3.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Las características de estabilidad térmica de los polímeros son importantes en vías de establecer las condiciones óptimas de procesamiento, en éste caso, se resaltan las temperaturas de descomposición. Se sabe que la estabilidad térmica de los poliuretanos es relativamente baja dependiendo íntimamente de su estructura¹⁰⁵. En el caso de esta serie de poliuretanos, éstos presentan un comportamiento similar en cuanto al intervalo en el cual los SPU experimentan dos estados de degradación térmica (T_{d1} y T_{d2} de la Tabla 3.1), es decir entre 349-474 °C para la primera degradación. Dentro del 5% de pérdida de masa se observó una mayor estabilidad térmica especialmente en PU ACIDO GLUTÁMICO y PU GLICINA en comparación de los dos restantes PU GLUTATIÓ N y PU CISTEÍNA, que empezaron a degradar a menor temperatura, tal y como se observa en la Figura 3.7 (a), donde los dos primeros pierden el 5% de masa a los 308 °C, mientras que los dos poliuretanos restantes lo hacen a los 283 °C. Es probable que la mayor estabilidad inicial sea debida a la diferencia de pesos moleculares. Sin embargo, éste hecho no se observa en PU GLICINA presenta la T_{d1} más baja, mientras que PU

GLUTATION, que posee bajo peso molecular, exhibió la T_{d1} más alta (349 °C vs 360 °C). La mayor estabilidad térmica de PU GLUTATION y PU CISTEÍNA es probable se origine por la formación de entrecruzamiento.

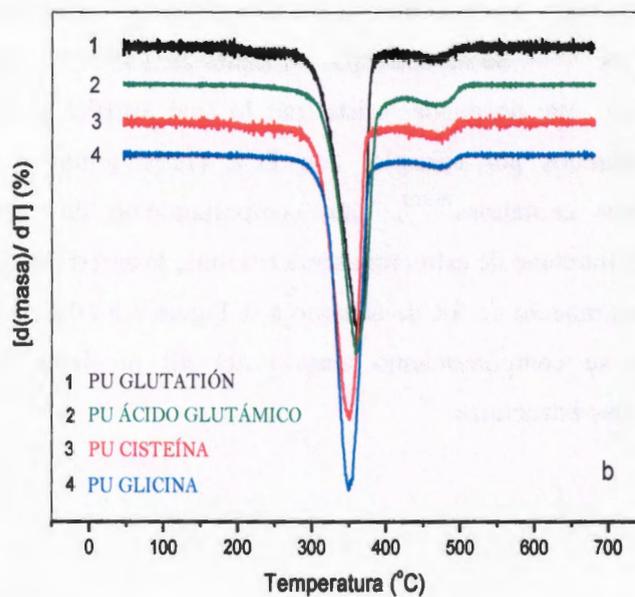
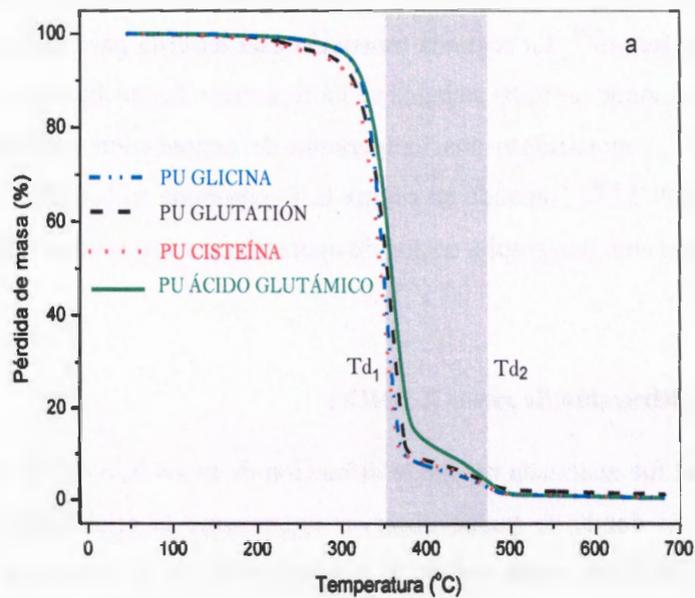


Figura 3.7 Termogramas de análisis gravimétrico de la serie de SPU con diferente extensor de cadena, a) % pérdida de masa y b) derivada de la masa.

La Figura 3.7 (b) muestra las derivadas de los termogramas de descomposición donde se sugiere que la primera transición corresponde a la degradación del segmento rígido⁷² principalmente en la descomposición del uretano^{10,106}, aunque la degradación del segmento flexible (PCL) también ocurre en el primer estado debido a que su estabilidad térmica (poliésteres alifáticos) depende en gran medida del ácido carboxílico que se libera en la degradación¹⁰⁷. La segunda transición está descrita para la degradación del segmento rígido, aunque en otros trabajos se ha reportado T_{d2} atribuible en éste caso al segmento suave¹⁰⁶, reportándose una temperatura de degradación máxima de 388 °C para el caso de la PCL¹⁰⁸. Tomando en cuenta la T_g reportada en la Tabla 3.1, esta serie de poliuretanos presenta una amplia región de operación para su procesamiento.

3.4 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

La cristalinidad fue analizada mediante difracción de rayos X como se muestra en la Figura 3.8 (A), en donde se puede observar únicamente la cristalinidad de la PCL ($2\theta=21.27^\circ$ and 23.5°) en parte debido a la proporción de la misma en el polímero (~75%) y por otro lado debido a que los enlaces secundarios del segmento rígido (SR) forman entrecruzamientos con macromoléculas adyacentes evitando la posibilidad de la cristalización del SR^{67,76,96}. Se ha detectado un límite para la PCL ($M_n = 2000$ g/mol) por debajo del cual éste no puede cristalizar; lo cual justifica el hecho de que los poliuretanos sintetizados por ejemplo, con PCL (1250 g/mol o 530 g/mol) no desarrollen regiones cristalinas^{76,102}. Este comportamiento da como resultado la formación de un poliuretano de estructura semicristalina; lo anterior se puede corroborar con los compuestos modelo de SR de acuerdo a la Figura 3.8 (B,C,D,E), cuyo análisis por DRX exhibe su comportamiento amorfo del SR mediante un discreto halo característico de estas estructuras.

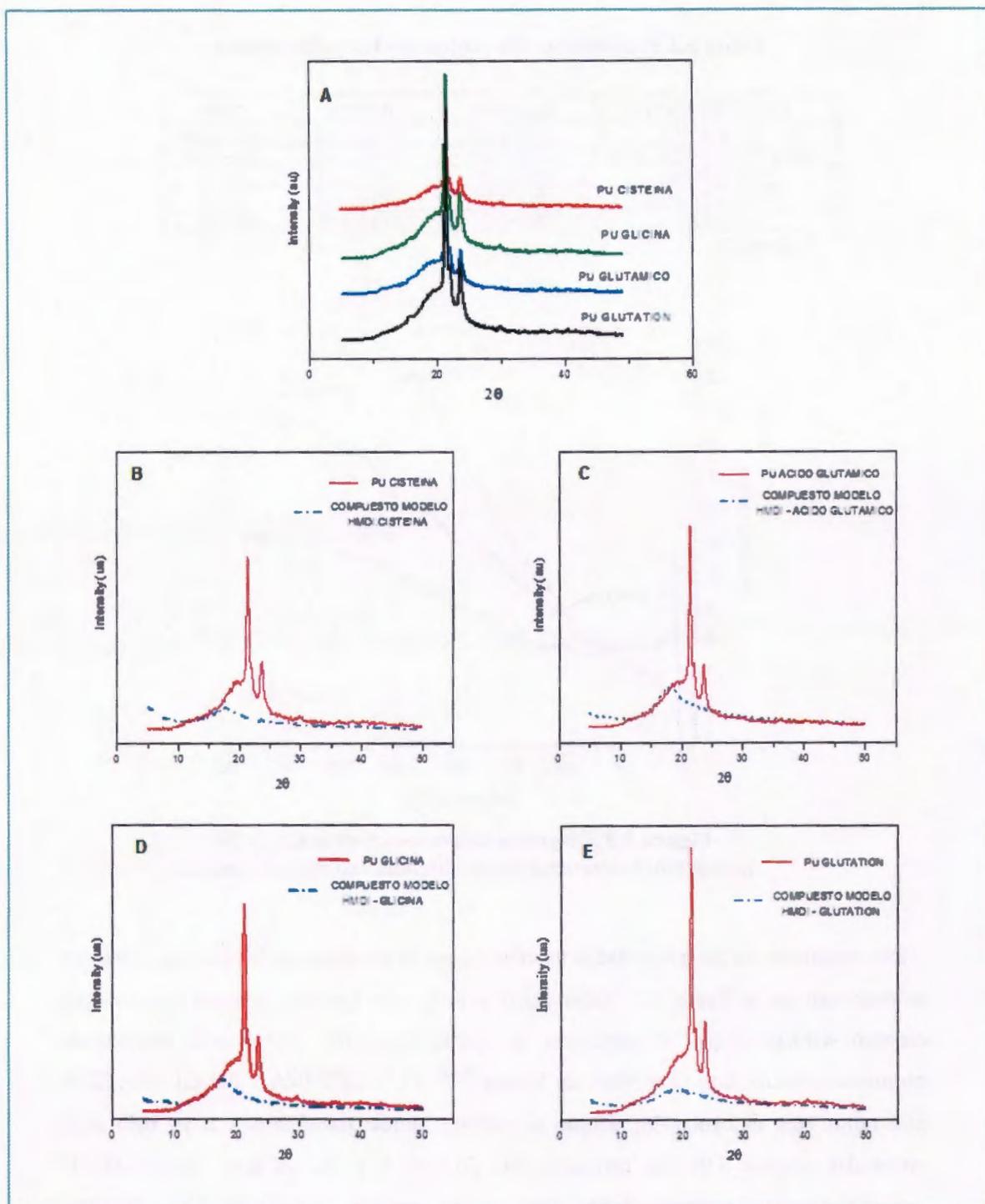


Figura 3.8 Análisis por difracción de rayos X: A) SPU y compuestos modelo B) PU CISTEINA, C) PU ÁCIDO GLUTÁMICO, D) PU GLICINA, y E) PU GLUTATIÓ. N.

3.5 Ensayos Mecánicos de Tensión

Tabla 3.2 Propiedades Mecánicas de los poliuretanos

POLIURETANO	E_{100} (MPa)	σ (MPa)	ϵ (%)
PU GLICINA	7.71 ± 0.68	19.79 ± 2.15	1429 ± 160
PU ÁCIDO GLUTÁMICO	6.73 ± 1.26	12.40 ± 2.68	1224 ± 81
PU CISTEÍNA	0.52 ± 0.13**	4.81 ± 2.34	24 ± 7
PU GLUTATION	0.91 ± 0.31**	6.83 ± 2.48	17 ± 5
PU BDA	2.09 ± 0.2	22.40 ± 3.50	982 ± 103

* A la ruptura

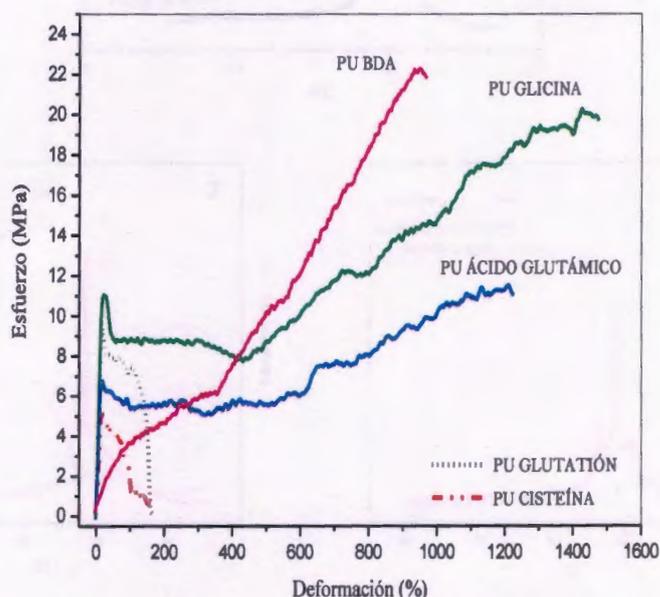


Figura 3.9 Diagrama esfuerzo-deformación de los poliuretanos sintetizados con diferente extensor de cadena.

Los resultados de las propiedades mecánicas que se obtienen de las pruebas a tensión se muestran en la Tabla 3.2. Tales datos indican que los SPU poseen bajo módulo elástico debido a que el contenido de segmento rígido (23%) está relacionado proporcionalmente con el módulo de Young^{76,109}. PU CISTEÍNA y PU GLUTATION mostraron baja deformación, debido a posibles entrecruzamientos y a su bajo peso molecular (Figura 3.9). En contraste, PU GLICINA y PU ÁCIDO GLUTÁMICO experimentaron un comportamiento elastomérico y módulo elástico superior a las otras formulaciones de poliuretano. La diferencia en el desempeño mecánico de los PURS puede ser explicado a través de la conformación estructural de cada uno de los poliuretanos. En éste sentido, la regularidad estructural de PU GLICINA y PU ÁCIDO

GLUTÁMICO permite el empaquetamiento entre las macromoléculas por medio de enlaces secundarios del segmento rígido formándose regiones cristalinas que producen buenos valores de módulo elástico y deformación que ya han sido reportados para otros sistemas^{76,45}.

Tomando en cuenta el uso de los poliuretanos en aplicaciones cardiovasculares, PU CISTEÍNA y PU GLUTATIÓN exhiben valores más altos en términos de esfuerzo y módulo elástico comparados con la arteria iliaca ($\sigma = 64$ kPa y $E = 0.4$ MPa), pero su valor es bajo en deformación ($\epsilon = 150\%$). El hecho de que PU GLUTATIÓN y PU CISTEÍNA tengan en su estructura un grupo tiol (SH) incrementa su reactividad conduciendo a la posible formación enlaces disulfuro entre diferentes macromoléculas, o también se pueden experimentar otras reacciones de entrecruzamiento como la formación de tiocarbamatos. El PU ACIDO GLUTAMICO no está exento de formar entrecruzamientos, en éste caso mediante la reacción del isocianato (NCO) y el ácido carboxílico del amino ácido (COOH) formando un enlace amida intermolecular. Un caso especial es el de PU GLICINA, ya que al ser un compuesto bifuncional no presenta grupos colgantes disponibles para una probable reacción de entrecruzamiento.

3.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En las micrografías que se muestran en la Figura 3.9 se pueden apreciar las diferentes topografías de superficie de los PUS sintetizados. El comportamiento anterior es resultado del proceso de evaporación del disolvente. La velocidad de evaporación en los polímeros PU GLICINA y PU ÁCIDO GLUTÁMICO fue menor y en adición presentan una superficie con morfología uniforme (lisa) y con irregularidades moderadas en comparación con PU GLUTATIÓN y PU CISTEÍNA, cuya evaporación de disolvente resultó más lenta. En este contexto, PU GLUTATIÓN y PU CISTEÍNA presentan ligeros entrecruzamientos en su estructura, lo cual puede limitar la difusión del solvente dentro de la red polimérica resultando en una estructura porosa al evaporar el disolvente. Por otro lado, aun cuando la PCL es el componente de mayor proporción en todos los poliuretanos, solo se pudieron observar esferulitas en PU GLICINA y PU ÁCIDO GLUTÁMICO, debido a que las partículas de gel dispersas en el sistema de disolución interfieren en la formación de una película continua y evita que el polímero recupere su conformación original cuando se ha evaporado el disolvente.

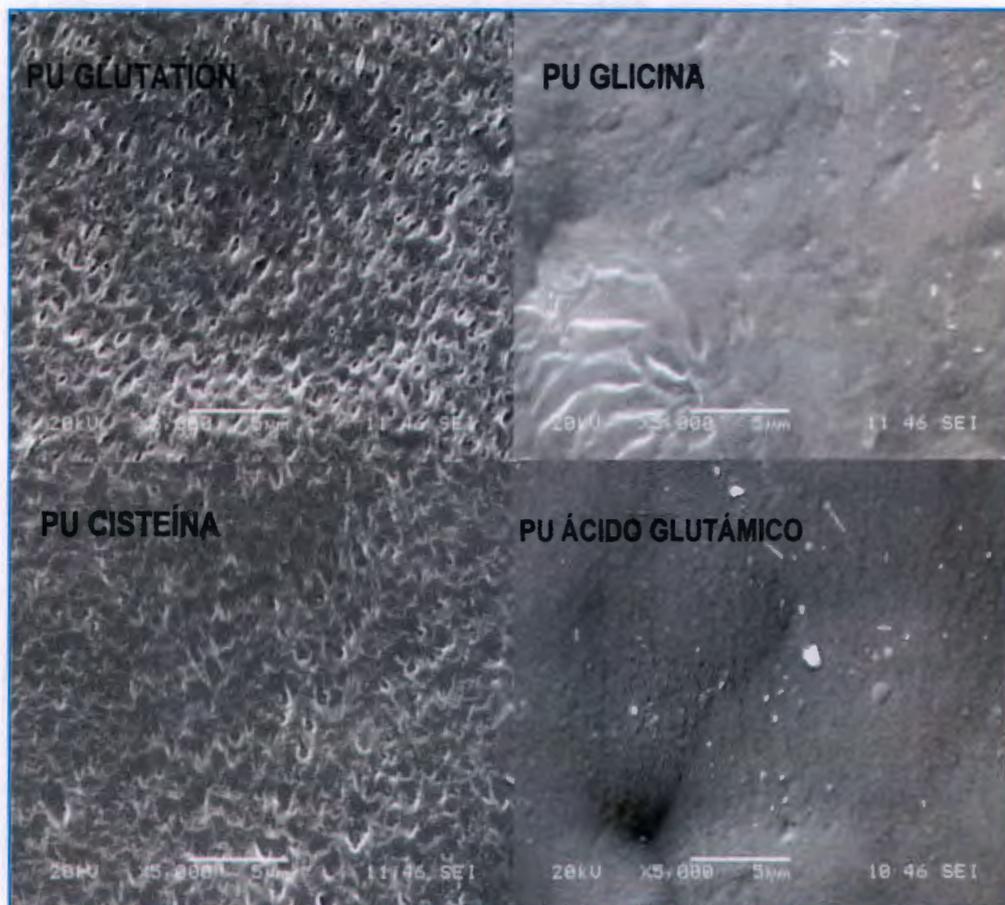


Figura 3.10 Micrografías SEM de la serie de SPU sintetizados con diferente extensor de cadena

3.7 Degradación acelerada

Los resultados de las pruebas de degradación resumidas en la Tabla 3.3 muestran que la degradación hidrolítica (HCl y NaOH) conduce a una mayor pérdida de masa que la respectiva con agentes oxidativos (H_2O_2 y NaClO). La pérdida de masa es mayor (por encima de 75%) en la degradación con NaOH y HCl debido a la susceptibilidad a la degradación hidrolítica de los enlaces ester de la PCL y algunos enlaces secundarios en el segmento rígido. Por otra parte, la PCL no es afectada de la misma forma por los agentes oxidantes⁶⁴ como el caso de los segmentos rígidos que si se degradan en medios oxidativos. La degradación en agua destilada muestra que la pérdida de masa es baja en toda la serie de poliuretanos en las condiciones de reflujo establecidas, sin embargo, en

cuanto al marco de tiempo es difícil de predecir la tasa de degradación debido a que son otros factores los que se deben considerar; como el peso molecular de la PCL, la cristalinidad, y en este caso el grado de entrecruzamiento. En contra parte, estudios llevados a cabo en poliuretanos similares han demostrado que ese tipo de polímeros son estables hasta seis meses¹¹².

Tabla 3.3 Pérdida de masa de poliuretanos preparados con L-glutación y sus amino ácidos después de la degradación en diferentes medios.

	H ₂ O	H ₂ O ₂	NaClO	HCl	NaOH
PUGLUTACIÓN	2.93±0.33	26.69±2.47	16.34±1.45	81.12±4.19	85.71±2.17
PUCISTEÍNA	3.15±0.53	25.76±0.98	49.86±2.61	74.43±0.554	85.07±4.83
PUACIDO GLUTAMICO	2.52±0.42	19.76±1.20	60.16±3.20	79.74±5.91	87.69±4.21
PUGLICINA	2.20±0.24	17.21±1.34	38.59±3.04	83.84±0.656	80.93±5.13
PUBDA	4.00±0.34	25.47±1.72	43.37±4.21	78.72±5.46	84.42±2.17

A pesar de que los resultados muestran que se lleva a cabo la degradación parcial de los poliuretanos que se estudian en éste trabajo, y que además ya se han reportado estudios de éste tipo en trabajos anteriores, se debe tomar en cuenta que el proceso degradativo se lleva a cabo en condiciones extremas de temperatura (100 °C). No se debe perder de vista que las temperaturas de fusión de ésta serie de poliuretanos oscilan entre los 47 °C y 52 °C. Por lo tanto, en futuros trabajos se debe establecer con mayor claridad el efecto de la combinación de las dos variables: temperatura y pH, y relacionar el método tomando en cuenta la temperatura corporal; ya que aunque se sabe que en el organismo se llevan a cabo diversos mecanismos metabólicos que implican ambientes agresivos, tanto oxidativos como hidrolíticos, éstos siempre suceden a temperatura que no excede los 37 °C. Como fundamento, se sabe que en los procesos fisicoquímicos la temperatura es un factor que no se debe soslayar. En adición, a continuación se muestran resultados (Tabla 3.4) de pruebas a las que se sometieron los poliuretanos en algunos medios reportados para la degradación acelerada a 37 °C en forma estática en incubadora, observándose que incluso en un medio tan agresivo como NaOH, los poliuretanos perdieron masa prácticamente en una tercera parte de lo obtenido a 100 °C. Cabe resaltar, de acuerdo a la Tabla 3.4, que la pérdida de masa casi se triplica a las 72 horas a lo obtenido a las 24 horas de incubación sin que haya de por medio un incremento de la temperatura en el sistema. Por otro lado, en pruebas a altas temperaturas, la degradación en medios hidrolíticos desintegro completamente el

poliuretano obteniéndose un residuo seco en forma de polvo; mientras que en las pruebas a 37 °C se pueden recuperar las probetas casi en sus dimensiones en las primeras 24 h, esta ventaja garantiza que en trabajos posteriores se pueda hacer otro tipo de caracterización a los productos de degradación.

Tabla 3.4 Pérdida de masa de SPUs en NaOH a 37°C en estado estático

POLIURETANO	PUGLUTATION	PUCISTEINA	PUGLICINA	PUACIDO GLUTAMICO
NaOH 5N (24 h/37 °C)	8.44%	5.18%	11.55%	11.07%
NaOH 5N (72 h/37 °C)	35.95%	13.14%	21.41%	37.66%

3.8 Ángulo de contacto

Una forma de evaluar la hidrofiliidad de los SPU es midiendo el ángulo de contacto con agua, cuyos datos se encuentran en la Tabla 3.5. La serie de poliuretanos se evaluaron comparativamente con un compuesto hidrofóbico como el politetrafluoruro de etileno (110°) exhibiendo superficies ligeramente hidrofílicas. Sin embargo en PU GLUTATION se observó el ángulo de contacto más alto de la serie a pesar de que en su estructura se presentan más grupos hidrofílicos (amidas) en su estructura en comparación de los restantes SPU. Tal aseveración puede ser explicada por su bajo peso molecular y la proporción con la PCL, cuyo comportamiento superficial es hidrofóbico. Trabajos previos que incluyen monocapas autoensambladas (SAMs por sus siglas en inglés) con superficies de alcanotiol sugiere que un ángulo de contacto adecuado para promover la adhesión de HUVECs está dentro del intervalo de 40-60°¹¹⁰, valores cercanos a los obtenidos en las formulaciones de poliuretano que aquí se analizan, especialmente el PU ACIDO GLUTAMICO que resultó con el menor ángulo de contacto (58.0°±1.4), valores que ya han sido reportados para éste tipo de materiales dada su aplicación^{109,111}. En adición, también se observó un ángulo similar de PU GLUTATION en relación con el poliuretano de control Tecoflex™ (71.2°), poliuretano comercial que ofrece buen desempeño en aplicaciones de contacto con sangre.

Tabla 3.5 Hemocompatibilidad y adhesión de HUVEC en poliuretanos preparados con glutatión y sus amino ácidos.

POLIURETANO	Ángulo de contacto (°)	Lee-White (s)	APTT (s)	Células vivas (%)
Tecoflex®	71.2±0.5	352±42	81±15 ^a	75.4
PU GLICINA	61.0±1.0	489±14 ^{a,b}	106±9 ^{a,b}	64.9
PU ACIDO GLUTAMICO	58.0±1.4	373±13	71±11 ^a	43.8
PU GLUTATION	74.0±1.6	464±18 ^{a,b}	55±9 ^a	42.1
PUCISTEINA	63.0±1.0	368±34	66±14 ^a	66.4
VIDRIO	25.0	283±11	35±4 ^b	No Disponible

3.9 Hemocompatibilidad: Evaluación de la activación plaquetaria por citometría de flujo, prueba de Lee-White y APTT.

Una vez que el biomaterial ha sido implantado, el primer evento que se lleva a cabo es la absorción de proteínas y otras biomoléculas que desencadenan una serie de reacciones bioquímicas que conducen a la respuesta inflamatoria y a los procesos de coagulación¹¹³. Durante su activación, las plaquetas exhiben ciertas proteínas empleadas como receptores de superficie para factores específicos de coagulación como glicoproteína (GP IIIb/IIa), factor de von Willebrand (vWF) o colágeno entre otros, y tienen la capacidad de conducir a la agregación plaquetaria a través de secreciones granulares^{114,115}. De ahí que el colágeno Tipo I haya sido incluido en el presente trabajo como el factor que desencadena la activación de plaquetas.

La citometría de flujo es una técnica analítica que permite hacer un análisis multiparamétrico de las células mediante el cual se pueden evaluar algunas características de la célula como complejidad y tamaño, lo cual convierte en una herramienta fundamental en la evaluación de la función plaquetaria¹¹⁶. A pesar de que paralelamente se ha considerado a la citometría de flujo como un método de baja sensibilidad¹¹⁷, su mayor ventaja es que el desarrollo de esta técnica implica el uso de sangre completa en comparación con otros métodos (inmuno ensayos por radiación o agregación plaquetaria) que presentan problemas en el desarrollo de la metodología e inclusive activación en la manipulación de la sangre *in vitro*¹¹⁶.

La demarcación de la población de plaquetas de otras células como los eritrocitos y leucocitos (rojo) en sangre completa, se hizo marcando el subgrupo con FITC-CD61 como eventos positivos delimitado en forma elíptica (ver Figura 3.11 A) que incluye plaquetas activadas (azul) y plaquetas sin activar (verde).

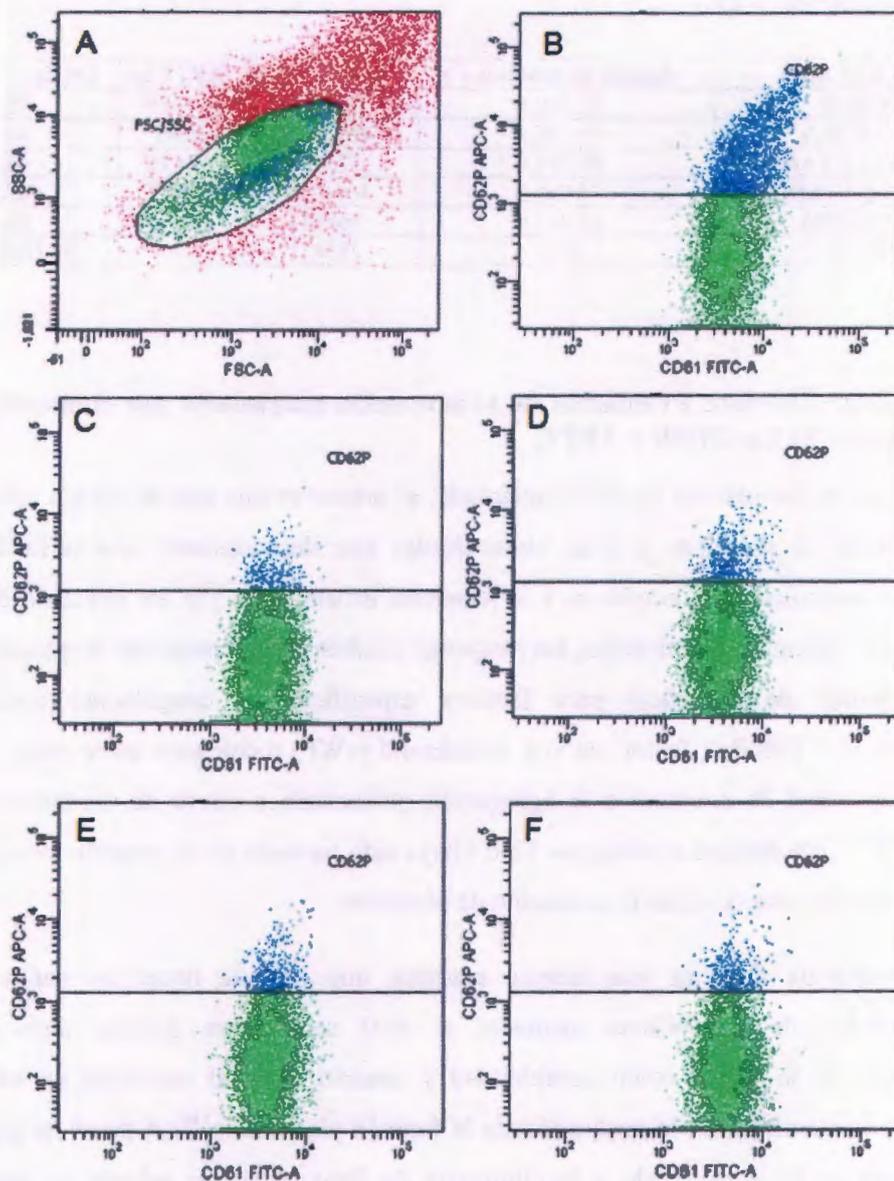


Figura 3.11 Citometría de flujo: A) identificación de la subpoblación de plaquetas de la población total de las células sanguíneas. Identificación de la subpoblación de plaquetas activadas (arriba de la línea) para B) control positivo. Para la serie de SPU: C) PU GLUTATION, D) PU CISTEINA, E) PU GLICINA y F) PU ACIDO GLUTAMICO.

En el mismo contexto, las Figuras 3.11 (C,D,E y F) corresponden al análisis de la sangre completa en contacto con los diferentes SPU, arrojando como resultado una baja activación de las plaquetas cuando es comparado con el control positivo colágeno Tipo I¹⁷, lo cual se resume en la Figura 3.12. Además, los resultados para PU GLUTACIÓN

y PU ÁCIDO GLUTÁMICO fueron estadísticamente parecidos al poliuretano control sin amino ácido (PU BDA). Sin embargo, a pesar de la baja activación de plaquetas inducida por estos poliuretanos, se debe resaltar que éste trabajo se condujo en condiciones de estado estacionario y no en estado dinámico, lo cual puede ser más representativo en cuanto al desempeño de un vaso sanguíneo nativo.

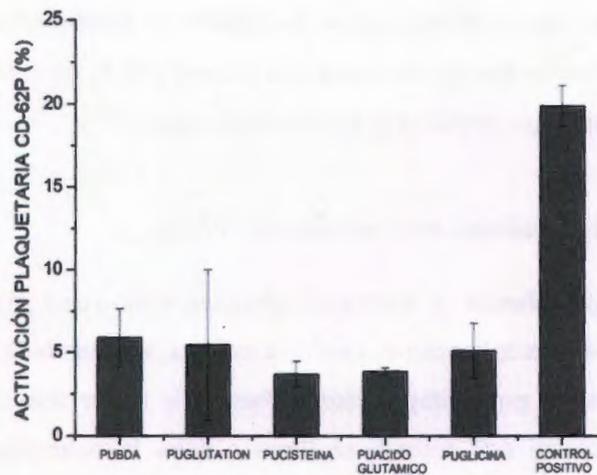


Figura 3.12 Porcentaje de Plaquetas activadas CD62P (%) en SPU y Colágeno Tipo I como control positivo

En cuanto a la hemocompatibilidad, en el caso de las pruebas de coagulación Lee-White (Tabla 3.5), los SPU muestran tiempos más altos que el vidrio usado como control en concordancia con los resultados de activación plaquetaria. En especial el PU GLICINA exhibe tiempos de coagulación mayores comparados con los restantes SPU y con otras investigaciones, sugiriéndose como una buena hemocompatibilidad de los SPU^{118,119}. Complementando esta observación, las pruebas APTT (Tabla 3.5) fueron aplicadas a los SPU mostrando tiempos de formación del coagulo proteico más altos que los observados en vidrio, empleado como control negativo. Es evidente que mientras más se prolongue el tiempo de coagulación, se puede establecer que los datos obtenidos sugieren que la inclusión de aminoácidos y péptidos en la estructura del SPU

puede retardar el proceso de coagulación mejorando así su hemocompatibilidad. Un aspecto que se debe resaltar de éste análisis es el hecho de que PU GLICINA y PU GLUTATIÓN exhiben casi el mismo valor en la prueba de coagulación de Lee-White pero diferentes valores en APPT. Este comportamiento se puede relacionar con el cambio conformacional del fibrinógeno y a la diferente cantidad de proteínas absorbidas en la superficie de los poliuretanos como ya se ha reportado¹¹⁷.

A partir de los resultados mostrados se puede establecer que los SPU sintetizados con glutatión o cualquiera de sus aminoácidos inducen ligeramente la activación plaquetaria y general tiempos altos de coagulación relativo a los controles empleados; lo anterior reafirma la idea de que la ruta de trabajo que se ha seguido es factible para considerar estos SPU como una alternativa que puede mejorar el desempeño de un material cuando éste se destina a aplicaciones que implican el contacto con sangre¹²⁰.

3.10 Citocompatibilidad con células endoteliales (HUVECs)

Un biomaterial con baja adhesión y activación plaquetaria no representan la única condición o requerimiento para aplicaciones cardiovasculares, sino también la presencia de células endoteliales es un punto importante en busca de lograr una superficie no trombogénica. Por lo que en éste trabajo se llevó a cabo la determinación de la biocompatibilidad de los poliuretanos mediante pruebas de adhesión a 24 h con células endoteliales (HUVECs). Dada la baja cobertura con HUVECs que presentan los poliuretanos, estudios previos en biocompatibilidad de materiales establecen que la adhesión celular sobre polímeros en gran medida está determinada por las propiedades fisicoquímicas de superficie, por lo que la adhesión y proliferación de células pueden ser mejoradas modificando la superficie del polímero^{121,122}, y en éste sentido los aminoácidos poseen grupos reactivos que pueden inducir a la endotelización^{122,123}. Además se han aplicado procedimientos alternativos a los ya mencionados incluyendo la modificación superficial mediante foto inducción de péptidos¹²⁴ modificación superficial con péptidos mediante el tratamiento con plasma¹²⁵ y otras técnicas de inmovilización de péptidos adhesivos en la superficie¹²⁶.

De acuerdo a la Figura 3.13 se puede corroborar que los poliuretanos obtenidos son capaces de retener la población de células endoteliales en pruebas a 24 horas, tomando como referencia el control positivo (cubreobjetos con poli D-lisina).

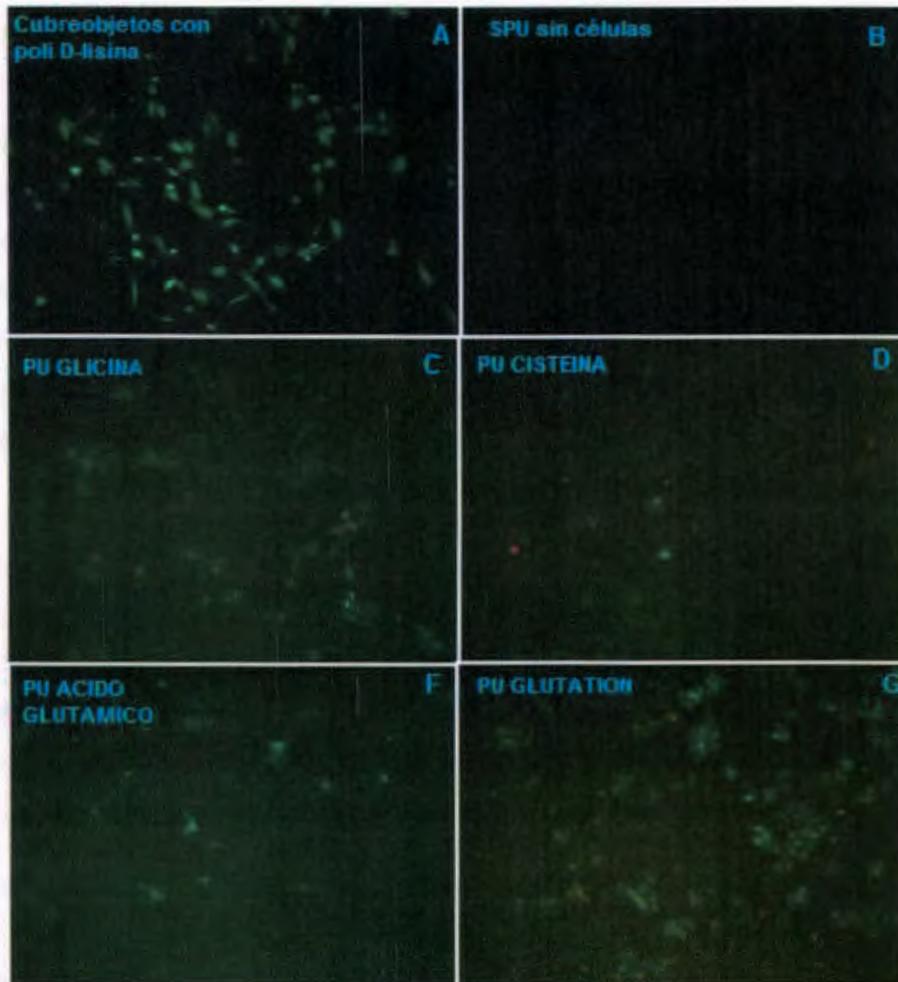


Figura 3.13 Evidencia de pruebas de adhesión celular (HUVECs) sobre un control positivo (A) y la serie de SPU: (C), (D), (E) Y (F).

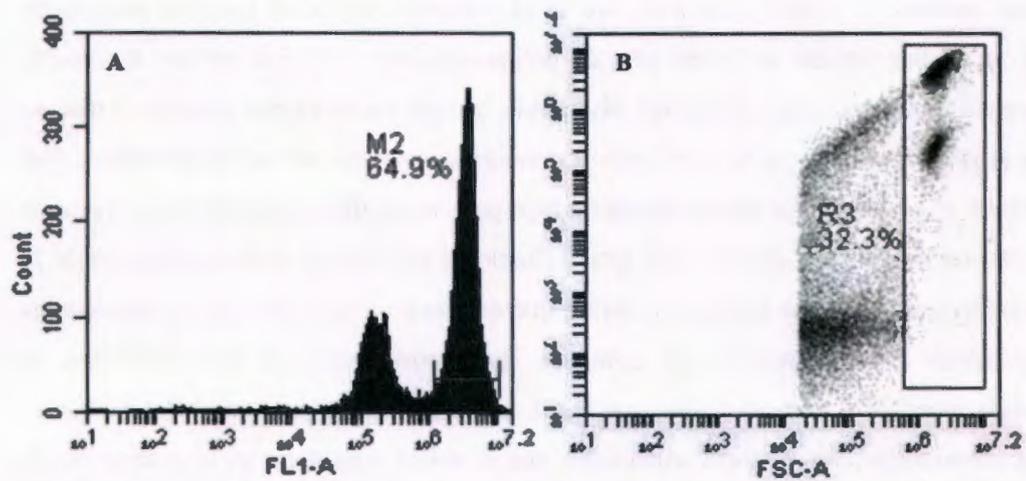


Figura 3.14 Pruebas de adhesión celular (HUVECs) utilizando citometría de flujo.

Por otro lado, dos poblaciones distintas de CE fueron teñidas con Calceina AM para identificar viabilidad positiva a través del conteo porcentual de células con respecto a la fluorescencia (ver Figura 3.14 A). De esta forma, el porcentaje total de células que producen la señal fluorescente de Calceina AM fueron cuantificadas como indicativo de citocompatibilidad en cada material. En la Figura 3.14 B, la fluorescencia vs el tamaño celular (FSC por sus siglas en inglés) fue empleado para determinar la población celular de interés (R3). Los resultados obtenidos (Tabla 3.5) demuestran que, en adición con los que se ha comentado de la evidencia de la Figura 3.12, estos polímeros exhiben buena citocompatibilidad.

En este trabajo los amino ácidos y péptidos fueron usados no solo por la factibilidad de ser moléculas biológicas que pueden ser reconocidas durante la degradación del poliuretano, sino también porque pueden mejorar la adhesión celular debido a la presencia de grupos funcionales como OH, CH, NH, y SH^{110,127}. En éste sentido se ha reportado que cada grupo funcional aporta un efecto selectivo sobre una superficie específica, incrementando el crecimiento celular¹²⁸.

Los resultados mostrados en la Tabla 3.5, indican que PU GLICINA y PU CISTEINA experimentan mayor eficiencia en la adhesión de HUVECs (64% y 66% respectivamente) comparado con los poliuretanos restantes, PU ACIDO GLUTAMICO y PU GLUTATION. Reportes de trabajos anteriores sugieren la importancia de los grupos funcionales disponibles en la superficie del polímero¹²⁹. Sin embargo, la glicina como extensor de cadena (funcionalidad 2) no presenta otro grupo reactivo después de que ya ha intervenido en la reacción de polimerización; y en este sentido la cisteína tampoco tiene otro grupo funcional disponible, ya que en secciones previas se discute que el grupo tiol (SH) ya ha participado en entrecruzamientos por puente disulfuro. Por lo tanto, el hecho de que una molécula de bajo peso molecular empleada como extensor de cadena presente un determinado grupo funcional no influyó en la moderación de la adhesión celular. De lo anterior se deriva que adicionalmente a los grupos funcionales disponibles en la superficie del polímero, parámetros como la humectabilidad, la energía interfacial, la morfología superficial, la conformación estructural del polímero, y la cristalinidad, son factores adicionales que se deben considerar en la evaluación de la biocompatibilidad y la hemocompatibilidad.

Por lo tanto, éste trabajo aporta datos importantes que permitirán adentrarse con argumentos más firmes en la evaluación del desempeño de poliuretanos o de otros polímeros en el ambiente biológico. Por lo anterior, se puede establecer que el uso de aminoácido como extensores de cadena en la síntesis de poliuretanos, es una buena alternativa para el diseño de nuevos biomateriales para su uso en aplicaciones cardiovasculares.

CONCLUSIONES

En éste trabajo se han desarrollado nuevos poliuretanos segmentados con potencial aplicación en el área cardiovascular. La ruta de síntesis seguida, aunque ya es de dominio en el grupo de Biomateriales del CICY, ha sido corroborada y la formación de los poliuretanos fue verificada a través del análisis por FTIR. La caracterización térmica (T_m , T_g , T_d) y mecánica (E , σ_u , ϵ_u), además del análisis por difracción de rayos X, determinaron el carácter semicristalino y el comportamiento elastomérico de la estructura de los SPU sintetizados con glicina y ácido glutámico, lo cual se relaciona con las características de los vasos sanguíneos nativos.

A partir de las pruebas de coagulación de Lee-White y APTT se obtuvieron resultados alentadores para toda la serie de SPU haciendo evidente su hemocompatibilidad. En el mismo sentido, la evaluación de la activación plaquetaria que pudiera causar se llevó a cabo usando la citometría de flujo obteniéndose buenos resultados en comparación con el control positivo empleado. La aplicación de ésta técnica en presente trabajo fue de gran importancia y a partir de ella se pudo verificar que los SPU que se evaluaron inducen a la activación plaquetaria en un bajo porcentaje. Por otro lado, las pruebas de adhesión con HUVECs demostraron que una de las ventajas de éstos materiales es que se pueden adherir y retener células endoteliales sin haber modificado la superficie polimérica ya sea por algún método de plasma o por algún tratamiento químico; situación que impacta en el tiempo y en el costo de evaluación de este tipo de poliuretanos, haciendo más asequible el desarrollo de nuevos biomateriales. Este trabajo se puede establecer como un claro indicativo de que el uso de aminoácidos o una secuencia de ellos (péptidos) como extensores de cadena en la síntesis de los poliuretanos, pueden ser considerados como una alternativa para el diseño, obtención y evaluación biológica de materiales para aplicaciones médicas en el ámbito cardiovascular.

TRABAJO A FUTURO

Aunque los poliuretanos que se han analizado presentan buenas propiedades tanto mecánicas, fisicoquímicas y en su interacción con el ambiente celular (hemocompatibilidad y citocompatibilidad), este trabajo se significa como una aportación a los fundamentos del desarrollo de injertos vasculares sintéticos, y como tal se proponen las siguientes vertientes a seguir.

- Se podrían realizar un estudio más detallado de los compuestos modelo en donde se aporten más elementos con el objetivo de entender la reacción que se lleva a cabo entre los diferentes grupos funcionales involucrados en la síntesis del poliuretano, especialmente los que tienen que ver con la reacción del isocianato con ácidos carboxílicos que poco se ha estudiado.

- Se debe hacer un estudio más profundo de la caracterización de la superficie del poliuretano ya que, como se ha comentado, este factor tiene una incidencia directa en la hemocompatibilidad y la biocompatibilidad. Por ello se hace obligado el detectar los grupos químicos libres en la superficie, un análisis de la topografía superficial y su efecto en la adhesión y proliferación celular, así como en la adhesión y activación de plaquetas.

- En cuanto a la activación plaquetaria se sugiere realizar las pruebas en estado dinámico, con el objetivo de simular en lo posible el flujo sanguíneo.

- Las pruebas de adhesión realizadas sobre estos materiales se deben extender al análisis de la proliferación celular por lo menos a siete días.

REFERENCIAS

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 125, 2–220, 2012.
2. Rosas-Peralta M., Fause Attie. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Arch Cardiol Mex*. 77, 91-93, 2007.
3. González Guzmán R., Alcalá Ramírez J. Enfermedad isquémica del corazón, epidemiología y prevención. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 53, 5, 2010.
4. L'Heureux N., Paquet S., Labbe R., Germain L., Auger F.A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 12, 47–56. 1998.
5. Zammaretti P., Jaconi M. Cardiac tissue engineering: regeneration of the wounded heart. *Current Opinion in Biotechnology*. 15, 430–434, 2004.
6. Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery*. 85(3), 253-6, 1979.
7. Edelman E.R. Vascular Tissue Engineering. *Circ Res*. 85, 1115-1117, 1999.
8. Hoenig M.R., Campbell G.R., Barbara E. Rolfe B.E., Campbell J.H. Tissue-Engineered Blood Vessels Alternative to Autologous Grafts? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1128-1134.
9. Nugent H.M., Edelman E.R. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 92, 1068-1078, 2003.
10. Keith L. Moore, Anne M. R. Agur, Marion E. Moore. Anatomía: con orientación clínica. 5ta edición. Editorial Médica Panamericana. 2010.
11. Ghassan S. Kassab. Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. *J. R. Soc. Interface*. 3, 719–740, 2006.
12. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NA, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G, Robbins RC, McAllister TN. 2006. Human tissue engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 12(3), 361–365, 2006.
13. Bourget J-M, et al., Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 2012.
14. Thomas L.V., et al, Tissue engineered vascular grafts — Preclinical aspects, *Int J Cardiol*, 2012.
15. Seal B.L, Otero T.C., Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials. Science and Engineering R34*, 147-230, 2001.
16. Isemberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. Small Diameter Artificial Arteries Engineered in Vitro. *Circulation Research*. 98, 25-35, 2006.
17. Voorhees A.B., Jaretzki A., Blakemore A.H. The use of tubes constructed from VINYON "N" cloth in bridging arterial defects. *Advancement of Blood Vessel Surgery. The department of surgery, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, New York*. 135, 3, 1952.

18. Campbell Ch. D., Goldfarb D., Roe R. Expanded Microporous Polytetrafluoroethylene: Patency Versus Porosity. *A Small Arterial Substitute*. 182, 2, 1975.
19. Greisler HP. Arterial regeneration over absorbable prostheses. *Arch Surg*. 117(11), 1425-31, 1982.
20. Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A, Krupicka O, Kadletz M. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg*. 6, 535-541, 1987.
21. Wang Y., Robertson J.L., Spillman W.B., Claus R.O. Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 8, 2004.
22. Stamm M. *Polymer Surfaces and Interfaces*. First Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 299-313, 2008.
23. Venkatraman S., Boey F., Lao L. Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired. *Progress in Polymer Science* 33, 2008.
24. Fuchs J.R., Nasseri B.A., Vacanti J.P., *Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction*. *Ann Thorac Surg*. 72, 577-91, 2001.
25. Vunjak-Novakovic G., Ian Freshney R. *Culture of cells for tissue engineering*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2006.
26. Eberli D. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*. In Tech. 2011.
27. Hoerstrup S.P., ZuÈnd G., Sodian R., Schnell A.M., GruÈnenfelder J., Turina M.I. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 20, 164-169, 2001.
28. Zilla P., Bezuidenhout D., Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 28, 5009-5027, 2007.
29. Zhang W.J., Liu W., Cui L., Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 11, No 5, 945-957, 2007.
30. Griffith L.G. Polymeric biomaterials. *Acta mater*. 48, 263-277, 2000.
31. Hua J., Chao W., Lee P., Huang Ch. Construction and characterization of an electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 13, 140-155, 2012.
32. Chung S., Ingle N.P., Montero G.A., Hyun Kim S.H., King M.W. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomaterialia* 6, 1958-1967, 2010.
33. Zhang L., Zhou J., Lu Q., Wei Y., Hu S. A novel small-diameter vascular graft. *In Vivo Behavior of Biodegradable Three-Layered Tubular Scaffolds*. *Biotechnol. Bioeng*. 99, 1007-1015, 2008.
34. Chen Wang, Lian Cen, Shuo Yin, Qihai Liu, Wei Liu, Yilin Cao, Lei Cui. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 31, 621-630, 2010.
35. Soldani G., Losi P, Bernabei M., Burchielli S., Chiappino D., Kull S., Briganti E., Dario Spiller D. Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network. *Biomaterials* 31, 2592-2605, 2010.

36. Honga Y., Ye S., Nieponice A., Soletti L., Vorp D.A., Wagner W.R. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend. *Biomaterials* 30, 2457–2467, 2009.
37. Thomas V., Muthu J. Biomechanical studies on aliphatic physically crosslinked poly(urethane urea) for blood contact applications. *J Mater Sci: Mater Med.* 19, 2721–2733, 2008.
38. Grenier S., Sandig M., Mequanint K. Polyurethane biomaterials for fabricating 3D porous scaffolds and supporting vascular cells. *J Biomed Mater Res.* 82A, 802–809, 2007.
39. Soletti L., Hong Y., Guan J., Stankus J., El-Kurdi M., Wagner W.R., Vorp D.A. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia.* 6, 110–122, 2010.
40. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A-21 Polyurethanes. 1992.
41. Thompson T. Polyurethanes as Speciality Chemical. Principles and Applications. 2005.
42. Vermette P., Griesser H.J. Biomedical Applications of Polyurethanes. Landes Bioscience, Georntown. 2001.
43. Guelcher S.A. Biodegradable Polyurethane: Synthesis and Application in Regenerative Medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 14(1), 3-17, 2008.
44. Han J., Chen B., Ye L., Zhang A., Zhang J., Feng Z. Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyurethane Based on poly(ϵ -caprolactone) and L-lysine ethyl Ester Diisocyanate. *Front. Mater. Sci. China* 3(1), 25–32, 2009.
45. Caracciolo P.C., Buffa F., Abraham G.A. Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes), *J Mater Sci: Mater Med* 20,145–155, 2009.
46. Zhang J., Doll B.A., Beckman E.J., Holliger J.O. A Biodegradable Polyurethane-Ascorbic Acid Scaffold for Bone Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res.* 67A, 389–400, 2003.
47. Xu Z., Huang X., Wan L. Surface Engineering of Polymer Membranes. Zhejiang University Press, Hangzhou and Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg, 2009.
48. Bacakova L. et al, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnol Adv*, 2011.
49. Wang Y., Robertson J.L., Spillman, W.B., Claus R. O. Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, 8, 2004.
50. Lin D., Young T., Fang Y. Studies on the effect of surface properties on the biocompatibility of polyurethane membranes. *Biomaterials* 22, 1521-1529, 2001.
51. Wang H., Feng Y., An B., Zhang W., Sun M., Fang Z., Yuan W., Khan M. Fabrication of PU/PEGMA crosslinked hybrid scaffolds by in situ UV photopolymerization favoring human endothelial cells growth for vascular tissue engineering *J Mater Sci: Mater Med.* 23,1499–1510, 2012.
52. Nesrin Hasirci, E. Ayse Aksoy. Synthesis and Modifications of Polyurethanes for Biomedical Purposes. *High Performance Polymers*,19, 621–637, 2007.
53. Klee D., Höcker H. Polymers for Biomedical Applications: Improvement of the Interface Compatibility. *Advances in Polymer Science*, Vol. 149, 2000.

54. Zanden C., Voinova M., Gold J., Morsdorf D., Bernhardt I., Liu J. Surface characterisation of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fibres and their interaction with red blood cells. *European Polymer Journal* 48, 472–482, 2012.
55. Li Y., Huang Y. The study of collagen immobilization on polyurethane by oxygen plasma treatment to enhance cell adhesion and growth. *Surface & Coatings Technology* 201, 5124–5127, 2007.
56. Hye Ryeon Lim, Hyun Sook Back, Mi Hee Lee, Yeon I Woo, Dong-Wook Han, Man Hyeop Han. Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films by microwave-induced argon plasma. *Surface & Coatings Technology*. 202, 5768–5772, 2008.
57. Alves P., Coelho J.F.J., Haack J., Rota A., Bruinink A., Gil M.H. Surface modification and characterization of thermoplastic polyurethane. *European Polymer Journal* 45, 1412–1419, 2009.
58. Arima Y., Iwata H., Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 28, 3074–3082, 2007.
59. Chuang T., Masters K. Regulation of polyurethane hemocompatibility and endothelialization by tethered hyaluronic acid oligosaccharides. *Biomaterials* 30, 5341–5351, 2009.
60. Hsu S., Sun S., Chen D. Improved Retention of Endothelial Cells Seeded on Polyurethane Small-diameter Vascular Grafts Modified by a Recombinant RGD-containing Protein. *Artificial Organs* 27, 1068–1078, 2008.
61. Gao Ch., Guan J., Zhu Y., Shen J. Surface Immobilization of Bioactive Molecules on Polyurethane for Promotion of Cytocompatibility to Human Endothelial Cells. *Macromol. Biosci.* 3, 157–162, 2003.
62. Jiehua Li, Mingming Ding, Qiang Fu, Hong Tan, Xingyi Xie, Yiping Zhong. A novel strategy to graft RGD peptide on biomaterials surfaces for endothelialization of small-diameter vascular grafts and tissue engineering blood vessel. *J Mater Sci: Mater Med.* 19, 2595–2603, 2008.
63. Deng Ch., Chen X., Sun J., Lu T., Wang W., Jing X. RGD Peptide Grafted Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer Poly(glutamic acid)-b-Poly(L-lactide)-b- Poly(glutamic acid): Synthesis and Self-Assembly. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 45, 3218–3230, 2007.
64. Chan Chan L.H., Solis-Correa R., Vargas-Coronado R.F., Cervantes-Uc J.M., Cauich-Rodríguez J.V. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia.* 6, 2035–2044, 2010.
65. Sarkar D., Yang J., Sen Gupta A., Lopina S.T. Synthesis and characterization of L-tyrosine based polyurethanes for biomaterial applications. *J Biomed Mater Res* 90A: 263–271, 2009.
66. Guan J., Sacks M.S., Beckman E.J., Wagner W.R. Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Elastomeric, Biodegradable Poly (ester-urethane) ureas Based on Polycaprolactone and Putresine. *J Biomed Mater Res* 61, 493–503, 2002
67. Skarja G.A., Goodhouse K.A. Structure-Property Relationships of Degradable Polyurethane Elastomers Containing an Aminoacid-Based Chain Extender. *Journal of Applied Polymer Science.* Vol. 75, 1522–1534, 2000.
68. Gogolewski S. Biocompatible-Biodegradable Polyurethane Materials with Controlled Hydrophobic to Hydrophilic Ratio. *Patente US 2008/0262613 A1.* 2008.
69. Thomas V., Muthu J. Biomechanical studies on aliphatic physically crosslinked poly (urethane urea) for blood contact applications. *J Mater Sci: Mater Med.* 19, 2721–2733, 2008.

70. Guan J., Fujimoto K.L., Wagner W.R. Elastase-Sensitive Elastomeric Scaffolds with Variable Anisotropy for Soft Tissue Engineering. *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 10, 2008.
71. Pkhakadze G., Grigorieva M., Gladir I., Momot V. Biodegradable Polyurethanes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 7, 265-267, 1996.
72. Howard G.T. Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 49, 245 – 252, 2002.
73. Adhikari R., Gunatillake P.A., Griffiths I., Tatai L., Wickramaratna M., Houshyar S, Moore T., Mayadunne R., Field J., McGee M., Carbone T. Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications. *Biomaterials*. 29, 3762–3770, 2008.
74. Tapan K. Dash, V. Badireenath Konkimalla. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*. 158, 15–33, 2012.
75. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010.
76. Marcos A., Abraham G.A., Valentin J.L., San Roman J. Synthesis and Characterization of Biodegradable Non-toxic polyester (urethane-urea). *Polymer* 47, 785–798, 2007.
77. Hong Y., Ye S., Nieponice A., Soletti L., Vorp D.A., Wagner W.R. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend. *Biomaterials* 30, 2457–2467, 2009.
78. Solís-Correa R.E., Vargas Coronado R. F., Aguilar-Vega M., Cauch-Rodríguez J.V., San Román J., Marcos A. Synthesis of HMDI-based segmented polyurethanes and their use in the manufacture of elastomeric composites for cardiovascular applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 18(5), 561-78, 2007.
79. Guelcher S.A., Srinivasan A., Dumas J.E., Didier J.E., Mc Bride S., Holliger J.O. Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials* 29, 1762-1775, 2008
80. Ciardinelli G., Rechichi A., D'Acunto M., Caporale A., Vozzi G., Giusti P. Bioactive Polyurethanes in Clinical Applications. *Proceeding of the 8th Polymers for Advanced Technologies International Symposium Budapest, Hungary*, 13-16, 2005
81. Woodhouse K.A., Skarja G.A. Biodegradable Polyurethanes. *Patente US* 6,221,997 B1. 2001
82. Hersel U., Dahmen C., Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 24, 4385–4415, 2003.
83. Deng C., Chen X., Sun J., Lu T., Wang W., Jin X. RGD Peptide Grafted Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer Poly (Glutamic Acid)-b-Poly (L-Lactide)-b-Poly (Glutamic Acid): Synthesis and Self Assembly. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 45: 3218–3230, 2007
84. Taite L.J., Yang P., Jun H., West J.L. Nitric Oxide Releasing Polyurethane –PEG Copolymer Containing Peptides Promotes Endotelization and Decreases Platelet Adhesion. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 81B: 000–000, 2007
85. Kearney M.F., Brien J.F., Marks G.S., Lei H., Nakatsu K. Thiol Agents Separate Nitric Oxide Formation from Vasodilatation Induced by Glyceryl Trinitrate. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 26, No. 6, 1998.
86. Singh S. P., Wishnok J. S., Keshive M., Deen W. M., Tannenbaum S. R. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry*. V 93, 14428–14433. 1996.
87. AL-SA'Doni H., Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical Science*. 98, 507–520, 2000.

88. Duan X., Lewis R.S. Improved haemocompatibility of cysteine-modified polymers via endogenous nitric oxide. *Biomaterials*. 23,,1197–1203, 2012.
89. Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: Potential target for medical interventions. *Journal of amino acids* Article ID 736837, doi:10.1155/2012/736837 , 2012.
90. Koenig J. L., *Infrared and Raman Spectroscopy of Polymers*. Vol 12-22, 2001
91. Zai-feng Li, Jin-yan Li, Jian Sun, Bao-qun Sun, Jin-jing Wang, Qiang Shen. Investigation of kinetics and morphology development for polyurethane-urea extended by DMTDA. *Front. Mater. Sci. China*. Higher Education Press and Springer-Verlag. 2(2): 200–204, 2008.
93. de Lima V., da Silva Pelissoli N., Dullius J., Ligabue R., Einloft S. Kinetic Study of Polyurethane Synthesis Using Different Catalytic Systems of Fe, Cu, Sn, and Cr. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 115,1797–1802, 2010.
94. Suchkova G.G., Maklakov L.I. Amide bands in the IR spectra of urethanes. *Vibrational Spectroscopy* 51, 333–339, 2009.
95. Silverstein R.M., Webster F.X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6th Edition. New York, John Wiley & Sons, Inc. 100-101
96. Bogdanov B., Toncheva V., Schacht E., Finelli L., Sarti B., Scandola M. Physical properties of poly(ester-urethanes) prepared from different molar mass polycaprolactone-diols. *Polymer*. 40, 3171–3182, 1999.
97. Li F., Hou J., Zhu W., Zhan W., Xu M., Luo X., Ma D., Kyu Kim B. Crystallinity and Morphology of Segmented Polyurethanes with Different Soft-Segment Length. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 62, 631-638, 1996.
98. Jiang S., Ji X., An L., Jiang B. Crystallization behavior of PCL in hybrid confined environment. *Polymer*. 42, 3901-3907, 2001.
99. Agarwal S., Christian Speyerer Ch. Degradable blends of semi-crystalline and amorphous branched poly(caprolactone): Effect of microstructure on blend properties. *Polymer*. 51, 1024–1032, 2010.
100. Heijkants R R. G. J. C., Calck V. v., van Tienen T. G. ., de Groot J. H., Buma P., A. J. Pennings J., Veth R.P.H., Schouten A.J. Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials*. 26, 4219-4228, 2005.
101. Bae J. Y., Chung D. J., An J. H. Effect of the structure of chain extenders on the dynamic mechanical behaviour of polyurethane. *Journal of Materials Science*. 34, 2523–2527, 1999.
102. Feng Kui , Jianan Hou, W. Zhu, X. Zhanc, Xu M., Luo M., Dezhu Ma, Kyu Kim B. Crystallinity and Morphology of Segmented Polyurethanes with Different Soft-Segment Length. *J Appl Polym Sci*. 62, 631-638, 1996.
103. Bagdi K., Pukanszky B. Jr., Molnar K., Pukanszky B. Thermal analysis of the structure of segmented polyurethane elastomers. Relation to mechanical properties. *J Therm Anal Calorim*. 98:825–832, 2009.
104. Menard K. P. *Dynamic mechanical analysis: a practical introduction*. CRC Press LLC, Boca Raton; 2000
105. Rueda-Larraz L., Fernandez d'Arlas B., Tercjak A., Ribes A., Mondragon I., Eceiza A. Synthesis and microstructure–mechanical property relationships of segmented polyurethanes based on a PCL–PTHF–PCL block copolymer as soft segment. *European Polymer Journal* 45, 2096–2109, 2009.

106. Chattopadhyay D.K., Webster D.C. Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes. *Progress in Polymer Science*. 34, 1068–1133, 2009.
107. Tang D. Biobased thermoplastic polyurethanes synthesized by isocyanate-based and isocyanate-free routes. Technische Universiteit Eindhoven, 2011.
108. Ang K.C., Leong K. F., Chua C. K., Chandrasekaran M., Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 80A, 655-660, 2007.
109. Thomas V., J. Muthu. Biomechanical studies on aliphatic physically crosslinked poly(urethane urea) for blood contact applications. *J Mater Sci: Mater Med*. 19, 2721–2733, 2008.
110. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 28, 3074–3082, 2007.
111. Huang S., Ou Ch., Lai J. Surface composition and protein adsorption of polyurethane membrane. *Journal of Membrane Science*. 161, 21-29, 1999.
112. Chan-Chan LH, Tkaczyk C, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, Tabrizian M, Cauch-Rodríguez JV. Characterization and biocompatibility studies of new poly(urea)urethanes prepared with arginine, glycine or aspartic acid as chain extenders. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* Submitted for publication.
113. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:81–110., Hu WJ, Eaton JW, -Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood*. 98, 1231–8, 2001.
114. Pierce T.B., Razzuk M.A., Razzuk L.M., Hoover S.J. A comprehensive review of the physiology of hemostasis and antithrombotic agents. *BUMC Proceedings*. 12, 39-49, 1999.
115. Colman R.W., Mechanism of thrombus formation and dissolution. *Cardiovas Pathol*. Vol. 2, No. 3 1993.
116. Hagberg I.A., Limberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimized methods for clinical studies. *Platelets*. 11, 137–150, 2000.
117. Blit P.H., McClung W.G., Brash J.L., Woodhouse K.A., Santerre J.P. Platelet inhibition and endothelial cell adhesion on elastin-like polypeptide surface modified materials. *Biomaterials*. 32, 5790-5800, 2011.
118. Zhifei Ch., Shaoting Ch., Li Z., Xu K., Guo-Qiang Ch. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Prepared by Melting Polymerization. *Journal of Biomaterials Science*. 20, 1451–1471, 2009.
119. Zibiao L., Shaoting Ch., Song L., Qiaoyan L., Kaitian X., Guo-Qiang Ch. Novel amphiphilic poly(ester-urethane)s based on poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]: synthesis, biocompatibility and aggregation in aqueous solution. *Polym Int*. 57, 887–894 , 2008.
120. Brash J.L. Exploiting the current paradigm of blood–material interactions for the rational design of blood-compatible materials. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 11, 1135–1146, 2000.
121. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JL . *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic, New York. 1997.
122. Roach P., David Eglin, Kirsty Rohde, Carole C. Perry. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci: Mater Med* , 18, 1263–1277, 2007.

123. Tidwell C.D., Ertel S.I., Ratner B.D. Endothelial Cell Growth and Protein Adsorption on Terminally Functionalized, Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *Langmuir*, 13, 3404–3413, 1997
124. Gao Ch, Guan J, Zhu Y, Shen J. Surface immobilization of bioactive molecules on polyurethane for promotion of cytocompatibility to human endothelial cells. *Macromol. Biosci*. 3:157–162, 2003.
125. Kawamoto Y, Nakao A, Ito Y, Wada N, Kaibara M. Endothelial cells on plasma-treated segmented polyurethane. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 8:551–557, 1997.
126. Kouvroukoglou S, Dee KC, Bizios R, McIntire LV, Zygourakis K. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials*;21, 1725–1733, 2000.
127. Roach Paul, Eglin David, Rohde Kirsty, Perry Carole C. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. – Mater. Med.*;18,1263–1277, 2007.
128. Tidwell CD, Ertel SI, Ratner BD. Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir*;13:3404–3413, 1997.
129. Dong-an W., Lin-xian F., Jian J., Yong-hong S, Xiao-xiang Z., Elisseeff JH. Novel human endothelial cell-engineered polyurethane biomaterials for cardiovascular biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res.*65A, 498–510, 2003.