



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

ESTUDIO DEL EFECTO DEL PESO MOLECULAR Y EL  
GRADO DE INJERTO DE POLIETILENGLICOL EN LAS  
PROPIEDADES SUPERFICIALES Y DE  
BIOCOMPATIBILIDAD DE SUSTRATOS DE  
POLIURETANO

Tesis que presenta

ANTONIO DAVID ABREU REJÓN

En opción al título de

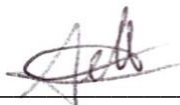
DOCTOR EN CIENCIAS  
MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, México

2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.

Firma:  \_\_\_\_\_

Nombre: Antonio David Abreu Rejón

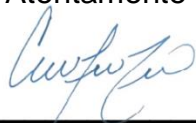
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Antonio David Abreu Rejón titulado **Estudio del efecto del peso molecular y el grado de injerto de polietilenglicol en las propiedades superficiales y de biocompatibilidad de sustratos de poliuretano**, fue realizado en la Unidad de Materiales, en los laboratorios de biomateriales y química macromolecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc y de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de noviembre de 2022

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de esta investigación, con número de CVU 700249; y por el financiamiento recibido a través del proyecto de Ciencia Básica CB-2016-283972.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos en los laboratorios de la Unidad de Materiales (Química Macromolecular, Biomateriales, y Fisicoquímica I).

A mis directores de tesis, el Dr. José Manuel Cervantes Uc y la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por todo el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto, así como su guía y consejos a lo largo de este trayecto.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Jorge Alonso Uribe Calderón y el Dr. Alejandro Ávila Ortega por sus valiosas críticas y apoyo en este trabajo de investigación.

A mis revisores de tesis, el Dr. Rolando Ríos Soberanis y la Dra. Lucía Fabiola Cano Salazar por todas sus observaciones y consejos que apoyaron a la mejora de este trabajo.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por el acceso al laboratorio de química macromolecular, así como el uso de sus equipos.

Al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao por su valioso apoyo durante las pruebas de caracterización y el trabajo en el laboratorio. Al Q.I Santiago Duarte Aranda por su apoyo en el análisis de las muestras por SEM. Al Dr. Alejandro May Pat por las caracterizaciones de AFM. A la M.C. Ángela Francisca Kú González por su apoyo para la obtención de las imágenes de microscopía confocal.

Al personal de la biblioteca y cómputo por su colaboración y amabilidad.

A los maestros Alejandro Viera y Carlos Belman por su apoyo, amistad y compañía. A Andrea de Jesús Sosa Pool, por su ayuda en los ensayos biológicos.

A mi familia por su paciencia, apoyo y siempre estar ahí para mí.

# CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>1.1 AMBIENTE EXTRACELULAR</b>	<b>3</b>
1.1.1 <i>Proteínas de la membrana celular</i>	4
<b>1.2 BIOMATERIALES</b>	<b>7</b>
1.2.1 <i>Química superficial</i>	8
1.2.2 <i>Topografía</i>	8
<b>1.3 POLIURETANOS</b>	<b>9</b>
1.3.1 <i>Modificación superficial de poliuretanos</i>	9
<b>1.4 ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>ESPECÍFICOS</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA</b>	<b>15</b>
<b>2.1 MATERIALES</b>	<b>15</b>
<b>2.2 PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE POLIURETANO</b>	<b>15</b>
<b>2.3 INJERTO DE POLIETILENGLICOL SOBRE LOS SUSTRATOS DE POLIURETANO</b>	<b>15</b>
<b>2.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SUSTRATOS MODIFICADOS</b>	<b>17</b>
2.4.1 <i>Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier</i>	17
2.4.2 <i>Análisis termogravimétrico</i>	17
2.4.3 <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	17
2.4.4 <i>Ángulo de contacto y energía superficial</i>	18
2.4.5 <i>Microscopía de fuerza atómica</i>	18
<b>2.5 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS SUSTRATOS</b>	<b>18</b>
2.5.1 <i>Cultivo celular</i>	18
2.5.2 <i>Viabilidad celular</i>	19
2.5.3 <i>Tinción con cristal violeta</i>	19
2.5.4 <i>Ensayo Live/Dead</i>	19
2.5.5 <i>Contacto directo</i>	20
<b>2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>20</b>

<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA</b>	<b>21</b>
3.1.1 <i>Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier</i>	21
3.1.2 <i>Análisis termogravimétrico</i>	24
3.1.3 <i>Topografía de los sustratos</i>	25
3.1.4 <i>Ángulo de contacto y energía superficial</i>	28
<b>3.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA</b>	<b>30</b>
3.2.1 <i>Ensayos de viabilidad</i>	30
3.2.2 <i>Tinciones de cristal violeta</i>	34
3.2.3 <i>Ensayo Live/Dead</i>	38
3.2.4 <i>Adhesión celular sobre los sustratos</i>	41
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 2.1</b> COMPOSICIÓN DE LOS SUSTRATOS DE PU INJERTADOS CON PEG. _____	17
<b>TABLA 3.1</b> RAZÓN DE BANDAS CARBONILO DE LOS SUSTRATOS. _____	24
<b>TABLA 3.2</b> TEMPERATURAS DE DESCOMPOSICIÓN TÉRMICA (Td) DEL PU, PEG Y LOS SUSTRATOS DE PU MODIFICADOS. _____	25
<b>TABLA 3.3</b> PH DEL MEDIO DE CULTIVO (DMEM) CON PEG DISUELTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES. _____	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b> COMPONENTES DEL AMBIENTE EXTRACELULAR. _____	3
<b>FIGURA 1.2</b> UNIONES CÉLULA-CÉLULA. _____	5
<b>FIGURA 1.3</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS INTEGRINAS EN LA MEMBRANA CELULAR [41]. FN: FIBRONECTINA; PM: MEMBRANA PLASMÁTICA. _____	6
<b>FIGURA 1.4</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE TRANSPORTE EN LA MEMBRANA CELULAR. _____	7
<b>FIGURA 1.5</b> REACCIÓN DEL GRUPO ISOCIANATO CON HIDROXILO PARA FORMAR EL GRUPO URETANO. _____	9
<b>FIGURA 1.6</b> REACCIÓN DE INJERTO DE CADENAS DE PEG SOBRE SUPERFICIES DE PU [70]. _____	10
<b>FIGURA 2.1</b> ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE INJERTO DE PEG EN LOS SUSTRATOS DE PU. <b>A)</b> INJERTO DE GRUPOS ISOCIANATO; <b>B)</b> REACCIÓN DEL PEG CON LOS GRUPOS ISOCIANATO DE LA SUPERFICIE DE LOS SUSTRATOS. ____	16
<b>FIGURA 3.1</b> ESPECTROS FTIR DE LOS SUSTRATOS DE PU, PU INJERTADOS CON PEG Y PEG. <b>A)</b> PEG2; <b>B)</b> PEG6; <b>C)</b> PEG10. _____	22
<b>FIGURA 3.2</b> DECONVOLUCIÓN DE LAS BANDAS DE CARBONILO DE LOS SUSTRATOS. <b>A)</b> PEG2; <b>B)</b> PEG6; <b>C)</b> PEG10. _	23
<b>FIGURA 3.3</b> IMÁGENES DE SEM DE LOS SUSTRATOS DE PU. _____	26
<b>FIGURA 3.4</b> IMÁGENES DE AFM DE LOS SUSTRATOS DE PU. _____	27
<b>FIGURA 3.5 A):</b> ÁNGULOS DE CONTACTO DE LOS SUSTRATOS CON AGUA, GLICEROL Y DIYODOMETANO; <b>B):</b> ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL DE LOS SUSTRATOS OBTENIDA CON EL MODELO DE VAN OSS Y GOOD. <b>SE:</b> ENERGÍA SUPERFICIAL; $\sqrt{s}$ <b>LW:</b> COMPONENTE DISPERSIVA; $\sqrt{s}$ <b>AB:</b> COMPONENTE POLAR. _____	29
<b>FIGURA 3.6</b> VIABILIDAD CELULAR POR CONTACTO INDIRECTO CON LOS SUSTRATOS. <b>A)</b> OSTEÓBLASTOS; <b>B)</b> FIBROBLASTOS. (*) DIFERENCIA ESTADÍSTICA $P < 0.05$ . _____	32
<b>FIGURA 3.7</b> IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS CON LOS EXTRACTOS DE LOS SUSTRATOS, TEÑIDOS CON CRISTAL VIOLETA. LAS FLECHAS INDICAN CÉLULAS CON AMPOLLAS EN LA MEMBRANA CELULAR. 36	
<b>FIGURA 3.8</b> IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON LOS EXTRACTOS DE LOS SUSTRATOS, TEÑIDOS CON CRISTAL VIOLETA. LAS FLECHAS INDICAN CÉLULAS CON AMPOLLAS EN LA MEMBRANA CELULAR. 37	
<b>FIGURA 3.9</b> IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL DEL ENSAYO LIVE/DEAD DE OSTEÓBLASTOS EN CONTACTO CON EXTRACTOS DE LOS SUSTRATOS DE PU POR 24 H CON AUMENTO DE 40X. _____	40
<b>FIGURA 3.10</b> OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE LOS SUSTRATOS DE PU SIN TRATAMIENTO E INJERTADOS CON PEG. _____	42



## RESUMEN

El injerto de polietilenglicol (PEG) en la superficie de los polímeros ha sido usado ampliamente para mejorar la biocompatibilidad de estos materiales al reducir la adhesión de proteínas y células. Se considera que el PEG es bioinerte y que su incorporación a biomateriales mejora la viabilidad celular dependiendo de la cantidad y el peso molecular utilizados; sin embargo, este fenómeno no ha sido bien estudiado. En este trabajo, se injertó PEG de tres pesos moleculares en sustratos de poliuretano (PU) a tres concentraciones molares diferentes para evaluar su efecto sobre las propiedades superficiales del PU y sobre la viabilidad de osteoblastos y fibroblastos. El injerto de PEG se confirmó mediante análisis FTIR-ATR y TGA. Las imágenes SEM revelaron una cubierta de PEG en los sustratos, la cual aumentó la hidrofilia y la energía libre superficial del PU a medida que aumentó el peso molecular y la concentración molar de PEG. En general, el PEG tuvo un efecto positivo sobre la viabilidad de las células, especialmente en osteoblastos, cuya viabilidad aumentó para todos los pesos moleculares y concentraciones de PEG en comparación con el PU sin tratamiento. Sin embargo, la viabilidad de los fibroblastos solo aumentó en ciertas combinaciones de peso molecular y concentraciones de PEG, lo que sugiere un nivel óptimo de estos parámetros. El injerto de PEG también promovió una morfología celular más extendida que la exhibida por el PU sin modificar; no obstante, las células se contrajeron y se volvieron apoptóticas a medida que aumentó el peso molecular de PEG y el grado de injerto. Estos efectos sobre las células podrían deberse a que el PEG afecta el pH del medio de cultivo, el cual se vuelve más alcalino a mayor peso molecular y mayores concentraciones de PEG. Los resultados respaldan la hipótesis de que la energía superficial de los sustratos de PU puede ser ajustada controlando el peso molecular y el grado de injerto de PEG, pero estos parámetros deben optimizarse para promover la viabilidad celular sin inducir un comportamiento similar al de la apoptosis.

## ABSTRACT

Grafting polyethylene glycol (PEG) onto polymer surface is widely used to improve biocompatibility by reducing protein and cell adhesion. PEG is considered to be bioinert and its incorporation to biomaterials has shown to improve cell viability depending on the amount and molecular weight (MW) used; this phenomenon has not been well studied. In this work, PEG of three MW was grafted onto polyurethane (PU) substrata at three different molar concentrations to assess their effect on both PU surface properties and viability of osteoblasts and fibroblasts. PEG grafting was confirmed by FTIR-ATR and TGA analysis. A PEG covering on the substrata was revealed by SEM analysis, which increased the hydrophilicity and surface free energy of PUs as the MW and molar concentration of PEG increased. In general, PEG had a positive effect on the viability of the cells, especially for osteoblasts, which increased for all MW and grafting densities of PEG compared with untreated PU. However, fibroblast viability only increased at certain combinations of MW and grafting densities of PEG, suggesting an optimal level of these parameters. PEG grafting also promoted a more spread cell morphology than that exhibited by unmodified PU; nevertheless, cells became contracted and apoptotic-like as PEG MW and grafting density were increased. These effects on cells could be due to PEG affecting culture medium pH, which became more alkaline at higher MW and concentrations of PEG. Results support the hypothesis that surface energy of PU substrates can be tuned by controlling the MW and grafting density of PEG, but these parameters should be optimized to promote cell viability without inducing apoptotic-like behavior.

# INTRODUCCIÓN

Los biomateriales utilizados en medicina regenerativa deben promover una adecuada respuesta celular que incluya la proliferación, adhesión y actividad celular, con el fin de recuperar o sanar tejidos en el organismo [1,2]. Por lo tanto, deben tener propiedades específicas como ser biodegradables, biomiméticos, biocompatibles y bioactivos [3,4]. Entre los materiales más utilizados para este fin se encuentran los polímeros sintéticos y naturales. Por una parte, los polímeros naturales generalmente presentan las características mencionadas anteriormente; sin embargo, estos polímeros suelen degradarse rápidamente, tener bajas propiedades mecánicas, ser difíciles de procesar o bien presentar una respuesta celular limitada para la recuperación completa de los tejidos. Por otra parte, los polímeros sintéticos tienen mejores propiedades mecánicas, mayor resistencia a la biodegradación y son más fáciles de procesar; no obstante, su bioactividad e interacción celular es menor, lo cual limita su uso en medicina regenerativa [5].

Los poliuretanos son una familia de polímeros sintéticos ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas y de medicina regenerativa debido a que presentan buena biocompatibilidad, así como una gran versatilidad en sus propiedades mecánicas y químicas. Sin embargo, la mayoría de poliuretanos presentan una baja hidrofiliidad lo cual puede provocar la adsorción y desnaturalización de proteínas en su superficie [6,7]; esto reduce su biocompatibilidad y bioactividad, además de crear la posibilidad de provocar trombosis y una reacción de cuerpo extraño [8,9].

Para evitar lo anterior se han realizado modificaciones físicas o químicas en los poliuretanos con el fin de incrementar su hidrofiliidad. Una de las estrategias más comunes para aumentar la biocompatibilidad de sustratos poliméricos es el injerto de un polímero hidrofílico en la superficie de los sustratos. En este contexto, el polietilenglicol (PEG) es ampliamente usado debido a su alta hidrofiliidad y elevada biocompatibilidad [10]. El mecanismo más aceptado por el que el injerto de PEG mejora la biocompatibilidad de los polímeros es debido a un efecto de exclusión de volumen generado por moléculas de agua adsorbidas a las cadenas de PEG; este efecto puede modular la interacción de proteínas y otras moléculas con la superficie de un material, permitiendo controlar así la bioactividad del sustrato [11]. El volumen excluido depende de la cantidad de moléculas de agua adsorbidas en las cadenas de PEG; por lo tanto, los principales factores para regular este efecto de exclusión son el grado de injerto y el peso

molecular (PM) del PEG utilizado [12]. Sin embargo, un alto volumen excluido puede conducir a un efecto de ocultamiento del sustrato creando una superficie no bioactiva, por lo que la bioactividad de las superficies poliméricas puede ser mantenida e incluso mejorada con una cantidad adecuada de PEG [13–15].

Por esta razón, se ha estudiado el injerto de PEG en poliuretanos para mejorar su biocompatibilidad e hidrofiliidad. En este sentido, la mayoría de trabajos en poliuretanos se han enfocado en reducir la adsorción de proteínas y crear superficies bioinertes debido al efecto de ocultamiento del PEG [10,16–20]; aún más, algunos estudios han demostrado que el injerto de PEG, en cantidad y PM adecuados, sobre la superficie de algunos polímeros puede incrementar su bioactividad promoviendo una mayor viabilidad, proliferación y adhesión celular [21,22]. A pesar de esto, aunque el mecanismo del volumen excluido y el efecto de ocultamiento del PEG ha sido ampliamente estudiado, la razón por la cual el injerto de PEG puede incrementar la viabilidad celular no ha sido tomado en cuenta y su mecanismo aún no es bien entendido. Por lo tanto, en este trabajo, sustratos de poliuretano injertados con diferentes concentraciones de PEG de distinto PM fueron sintetizados para evaluar el efecto de estos parámetros tanto sobre las propiedades superficiales de los sustratos de PU como en la viabilidad y morfología de fibroblastos y osteoblastos.

En el capítulo 1 de este trabajo se describe brevemente las interacciones celulares con el ambiente extracelular y los biomateriales. De igual forma, se presenta una revisión bibliográfica acerca de los poliuretanos y el PEG. El capítulo 2 describe detalladamente los materiales y la metodología utilizada para la fabricación y caracterización de los sustratos. El capítulo 3 presenta los resultados de los análisis fisicoquímicos y biológicos de los andamios poliméricos, y la discusión de los mismos. Finalmente, se presentan las conclusiones a las que se llegaron con los resultados obtenidos en este trabajo.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Ambiente extracelular

La célula es considerada la unidad básica de los organismos vivos. Una sola célula puede ser un organismo completo, como en el caso de las bacterias; sin embargo, los organismos complejos están formados por un gran número y variedad de éstas, que forman los distintos tejidos que lo componen. Por lo tanto, las células interactúan con otras células, moléculas solubles en el medio acuoso que las rodea, factores físicos y con elementos que incluyen a la matriz extracelular (MEC); lo anterior constituye el ambiente extracelular (Figura 1.1) [23,24]. Estas interacciones con el ambiente extracelular generan señales que pueden activar rutas celulares específicas que determinan en gran medida el comportamiento celular y regulan distintas funciones de gran importancia para el funcionamiento de un organismo como su propia supervivencia, entre las cuales se encuentran la proliferación, migración, adhesión y síntesis de proteínas y otras biomoléculas [24–26].

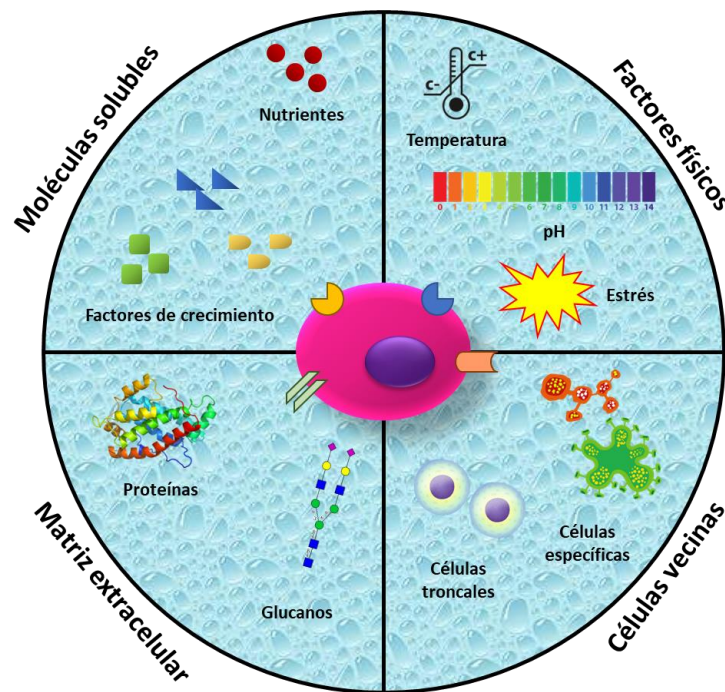


Figura 1.1 Componentes del ambiente extracelular.

Las interacciones celulares con el exterior ocurren principalmente a través de receptores en la membrana de las células y pueden ser específicas o no específicas. En las interacciones específicas, los receptores en la membrana celular se unen a ligandos, por ejemplo: proteínas, glucanos, factores de crecimiento o receptores de la membrana de otras células. Por otra parte, las interacciones no específicas se deben a factores externos que influyen en la actividad de los receptores, por ejemplo: la temperatura, el pH, la concentración de iones minerales, entre otros. Ambos tipos de interacción pueden ocurrir de forma simultánea y generar distintas señales de acuerdo a la naturaleza de las interacciones y del tipo de célula; por lo que se genera un fenómeno complejo que puede producir distintas respuestas celulares aún en condiciones similares [27–31].

### **1.1.1 Proteínas de la membrana celular**

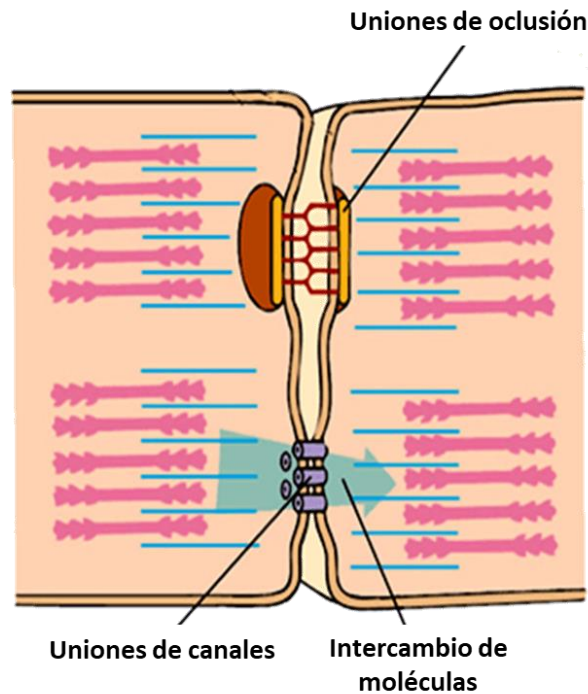
La célula se encuentra separada del exterior por una membrana celular, la cual está formada por una bicapa de fosfolípidos. La función principal de la membrana celular es la de proteger y separar a la célula del exterior; esta estructura realiza muchas otras funciones de gran relevancia para la célula. Estas funciones son realizadas principalmente por moléculas embebidas en la membrana, que de acuerdo a su función pueden clasificarse en moléculas de adhesión, receptores de transducción o proteínas de transporte [27,32].

#### *1.1.1.1 Moléculas de adhesión*

La adhesión celular es necesaria para la supervivencia en la mayoría de células y afecta casi todos los procesos celulares; esta adhesión puede ser entre células o con la MEC y ambos tipos de adhesión influye en el comportamiento celular [33]. La adhesión celular se caracteriza por un gran número de interacciones que le permite a la célula modificar su respuesta de forma rápida y dinámica. Estas interacciones pueden ser a través de enlaces covalentes que involucran la formación de un enlace químico entre los receptores de la membrana y las moléculas del sustrato; o interacciones no covalentes que involucran enlaces de largo alcance (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.) [34].

En la adhesión célula-célula, las principales clases de receptores son las cadherinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs). Las cadherinas forman uniones de tipo dentado que son dependientes del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Por otra parte, los principales receptores de la superfamilia de Igs, las moléculas de adhesión celular neural, intercelular y vascular (NCAM, ICAM, VCAM),

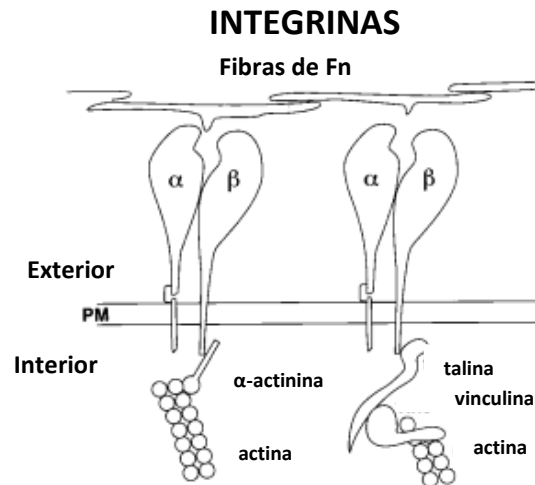
pueden formar enlaces homotípicos o heterotípicos con otras células [35]. Otras uniones célula-célula incluyen a las uniones de oclusión que forman barreras impermeables, y las uniones formadoras de canales que permiten el intercambio de iones y moléculas pequeñas de una célula a otra (ver Figura 1.2) [34].



**Figura 1.2** Uniones célula-célula.

Las principales moléculas de adhesión célula-sustrato son las integrinas, las cuales son proteínas heterodiméricas con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 1.3); existen 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  conocidas, de las cuales se han observado 24 combinaciones distintas en la naturaleza [36]. La mayoría de las integrinas se unen a las fibras de actina del citoesqueleto, permitiendo así el anclaje de la célula y el intercambio de señales mecánicas con el exterior. Después de la adhesión de un receptor con su ligando, inicia el reclutamiento de más integrinas y proteoglicanos en la zona de adhesión, generando así un clúster de moléculas ancladas a la MEC, conocido como “complejo de adhesión focal”. En esta región, las integrinas se comunican internamente con muchas moléculas estructurales (talina,  $\alpha$ -actinina, paxilina, filamina o vinculina) y de señalización (cinasas,  $\beta$ 3-endonexina, GTPasas, entre otras) llamadas “proteínas de adhesión focal” [37,38].

Otra familia de proteínas involucradas en la adhesión celular son las selectinas, que incluye tres miembros de lectinas tipo C: selectina P, selectina L y selectina E. Estas proteínas participan tanto en la adhesión célula-célula como en la adhesión célula-sustrato, especialmente en la migración celular en sitios de inflamación [39,40].



**Figura 1.3** Representación esquemática de las integrinas en la membrana celular [41]. Fn: Fibronectina; PM: Membrana plasmática.

### 1.1.1.2 Receptores de transducción

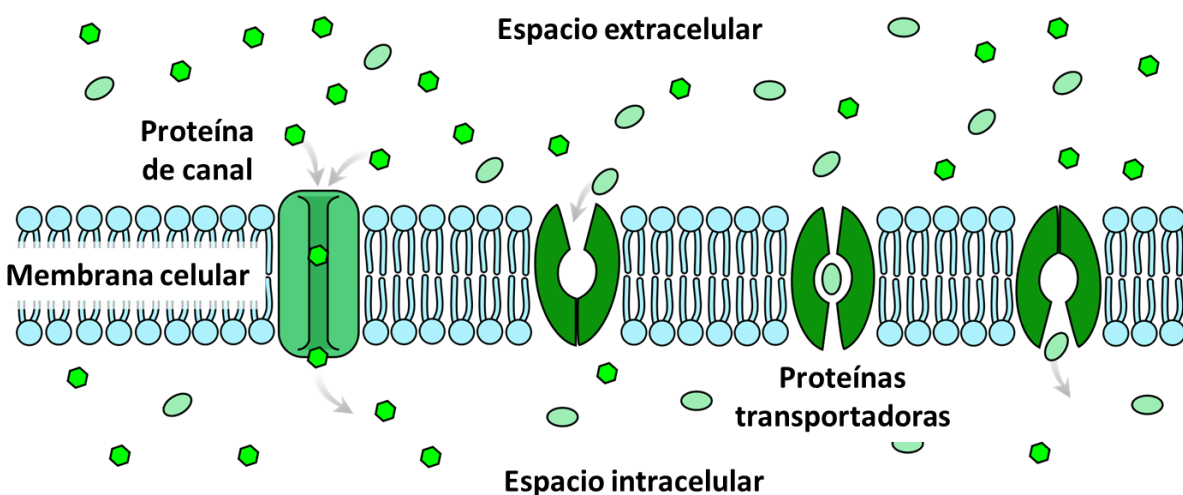
Los receptores de transducción son proteínas que pueden encontrarse en la membrana celular y en el espacio intracelular. Estas proteínas tienen una alta afinidad a ciertas moléculas en particular (ej., hormonas, factores de crecimiento, antígenos, etc.) que producen respuestas celulares específicas. Algunos ejemplos de estos receptores son la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano, receptores de proteína G, tirosina cinasa, serina cinasa, entre otros. La transmisión de las señales de estos receptores puede ser a través de la fosforilación de ciertas proteínas que activan una ruta celular específica, o alterando el nivel de un mensajero secundario, como puede ser el calcio, que regula la actividad de ciertas proteínas [27,32].

### 1.1.1.3 Proteínas de transporte

La membrana celular es impermeable para la mayoría de moléculas polares, por lo que su transporte depende de proteínas especializadas para ello. Las proteínas de transporte se dividen en proteínas transportadoras y proteínas de canal, mostradas en la Figura 1.4. Estas últimas forman un poro en la membrana que permite el transporte pasivo de moléculas específicas



cuando están abiertos. Por otra parte, las proteínas transportadoras, se unen directamente a la molécula de interés y la transportan a través de la membrana celular por una serie de cambios conformacionales; cada proteína transportadora es específica para cierto tipo o clase de moléculas (iones, aminoácidos, azúcares, etc.). Una subclase importante de proteínas de transporte son los canales de iones dependientes del voltaje o de ligandos, y los transportadores iónicos consumidores de energía, por ejemplo: la bomba ATPasa de sodio/potasio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) que expulsa  $\text{Na}^+$  e importa  $\text{K}^+$ ; o la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  que ayuda a mantener los niveles intracelulares de calcio [27,32].



**Figura 1.4** Representación esquemática de las proteínas de transporte en la membrana celular.

## 1.2 Biomateriales

El uso principal de los biomateriales en medicina regenerativa es el de servir como reemplazo de tejidos dañados, o como andamios temporales para su regeneración [5]. La eficacia de los biomateriales en estas aplicaciones depende de la habilidad de la superficie del material para regular la respuesta celular, principalmente la adhesión celular al funcionar como sustratos. Esta adhesión puede ser caracterizada en términos de interacciones covalentes y no covalentes, las cuales pueden ser reguladas a través del diseño de la superficie del material [37]. Las células no se adhieren directamente al sustrato, en cambio, forman complejos de adhesión focal con una capa de proteínas adsorbidas en las superficies de éste; a su vez, la adsorción de esta capa de proteínas depende de las interacciones no covalentes entre las proteínas y el sustrato [42,43]. Al entrar en contacto el biomaterial con el medio líquido se forma una interfaz entre las dos fases, la

cual es estabilizada por la adsorción de iones y moléculas, entre ellas, las proteínas. Estas proteínas modifican su estructura y función de acuerdo a las propiedades superficiales del biomaterial [44].

### **1.2.1 Química superficial**

Las superficies pueden ser hidrofóbicas (que repelen moléculas polares) o hidrofílicas (que atraen agua u otras moléculas polares). Las superficies hidrofóbicas generalmente no presentan una buena adhesión celular; sin embargo, la química superficial de los sustratos puede ser modificada para introducir ciertos grupos polares, con la finalidad de incrementar su hidrofilia [38].

Se han realizado numerosos estudios para relacionar la energía superficial de distintos materiales (como polímero y metales), con la adhesión celular [45–50]. Estos estudios demostraron que la adhesión celular aumenta con el incremento de la energía superficial de los sustratos. Otros trabajos han evaluado el efecto de ciertos grupos funcionales presentes en la superficie de sustratos poliméricos [51–57]. Los resultados de estos trabajos indican que los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) y ácidos carboxílicos ( $\text{COOH}$ ) producen una adhesión superior comparado con grupos hidrofóbicos ( $\text{CH}_3$ ).

### **1.2.2 Topografía**

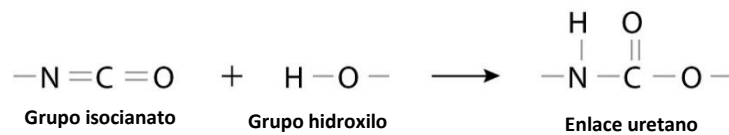
Las características superficiales de un material pueden cambiar según la topografía de los sustratos e influir en la adhesión celular [58]. La MEC de la mayoría de los tejidos está formada por patrones topográficos a micro y nanoescala. El tamaño, la forma y el arreglo geométrico de las estructuras topográficas son factores que afectan el comportamiento celular; estas estructuras pueden incrementar el área de contacto para la adhesión de proteínas o células, o bien, restringirla; además cada tipo de célula tiene una respuesta diferente a estas características [59].

Existen ejemplos de cómo la introducción de una superficie nanoestructurada reduce la adhesión celular en comparación con la misma superficie lisa. De esta forma, la combinación de los efectos de la química superficial y la topografía puede ser complicada y generar otros efectos en la conducta celular [58]. Se han realizado estudios que revelan que las células se adhieren y proliferan con una orientación que puede ser dirigida por la topografía del sustrato [60–63]. Superficies con surcos paralelos restringen la adhesión celular a la superficie de los bordes, generando así la orientación del citoesqueleto en dirección paralela a los surcos. Estos sustratos

tienen la capacidad de modular la adhesión celular, la síntesis de proteínas de la MEC y la diferenciación celular [61,64].

### 1.3 Poliuretanos

Los poliuretanos (PUs) son polímeros que contienen el grupo uretano, y son obtenidos típicamente por medio de la reacción de isocianatos y alcoholes (la reacción se muestra en la Figura 1.5). Las diversas modificaciones que pueden hacerse durante su síntesis dan lugar a una amplia variedad de productos de PUs, tales como espumas flexibles y rígidas, elastómeros sólidos, recubrimientos y adhesivos entre otros [65].



**Figura 1.5** Reacción del grupo isocianato con hidroxilo para formar el grupo uretano.

Los PUs han sido utilizados como biomateriales por varias décadas debido a sus propiedades físicas únicas y a su relativa biocompatibilidad [66]. Además, es posible la modificación de su balance hidrófilo/hidrófobo mediante el injerto de macromoléculas de otros polímeros, o bien, de especies biológicamente activas como anticoagulantes, proteínas inhibitorias, grupos bioreconocibles, etc., a través de los grupos que contienen hidrógenos en la estructura del PU [67].

Por su estructura química, los PUs pueden ser termoplásticos o termofijos. Los PUs termoplásticos son un copolímero compuesto de un segmento rígido (A) y uno suave (B) dispuesto en bloques (AB)<sub>n</sub>. El segmento rígido está compuesto por un diisocianato y un extensor de cadena, mientras que el segmento suave por un poliol o poliéster con terminación hidroxilo o amino, o bien, por un policarbonato, poliolefina, o un hidrocarburo con las mismas terminaciones [67–69]. Los PUs termofijos están compuestos también por dos segmentos: uno formado por un diisocianato y un extensor de cadena, y otro formado por un compuesto con una funcionalidad mayor a dos (como un triol), formando una red tridimensional.

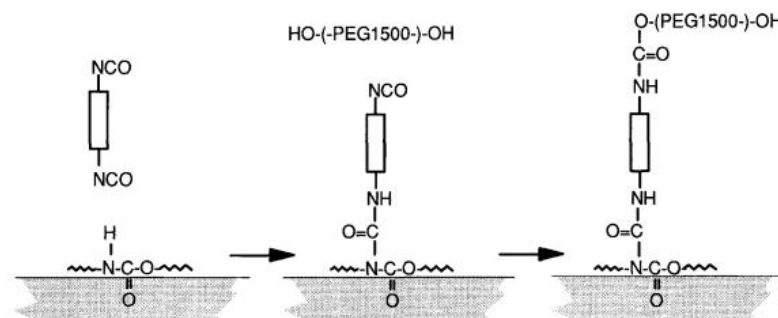
#### 1.3.1 Modificación superficial de poliuretanos

La capacidad de modificar la estructura de los PUs es muy alta; se ha demostrado que el injerto de biomacromoléculas sobre las superficies de PU incrementa su biocompatibilidad [68,70]. Se

han publicado numerosos trabajos acerca del injerto de distintas macromoléculas sobre la superficie de los PUs para aumentar su hidrofiliidad, mejorar su biocompatibilidad, o mejorar la respuesta celular en éstos [70–73].

El polietilenglicol (PEG) con grupos terminales hidroxilo se ha usado ampliamente como extensor de cadena o como injerto debido a su carácter hidrófilo, también se ha injertado PEG con diferentes grupos terminales como amino, carboxilo, etc., para funcionalizar la superficie de los PUs. El proceso para injertar las cadenas de PEG en la superficie de un PU consta de dos pasos (Figura 1.6): el primero, consiste en la funcionalización de la superficie del PU con un diisocianato, lo cual deja un grupo isocianato libre en la superficie. El segundo paso involucra la reacción de los grupos terminales del PEG (hidroxilo, carboxilo, o amino) con los grupos isocianato libres en la superficie de los PUs, generándose un enlace covalente que une las cadenas de PEG al PU [74–76].

La incorporación de cadenas de PEG de distintas longitudes tiene un efecto sobre la topografía del sustrato. En este caso, la rugosidad se ve incrementada por la diferencia de tamaño de las cadenas injertadas, lo que genera valles y crestas en la superficie. Esta rugosidad puede afectar la conducta de adhesión y proliferación celular [70,75].



**Figura 1.6** Reacción de injerto de cadenas de PEG sobre superficies de PU [70].

## 1.4 Antecedentes

Los poliuretanos se utilizan ampliamente en aplicaciones biomédicas y de medicina regenerativa debido a que tienen buenas propiedades mecánicas y biocompatibilidad [77]. Sin embargo, la mayoría de poliuretanos de grado médico tienen una baja hidrofiliidad, lo cual puede conducir a una fuerte adsorción de proteínas en su superficie y su desnaturalización; esto genera una baja

adhesión celular sobre los PUs y reduce su biocompatibilidad, además de incrementar el riesgo de producir una trombosis o reacción de cuerpo extraño [78,79].

Por lo anterior, se emplean modificaciones físicas o químicas para aumentar la hidrofiliidad, agregar grupos funcionales o modificar la topografía de los poliuretanos, y de esta manera incrementar la adhesión celular sobre su superficie. Una estrategia comúnmente utilizada es el injerto de PEG, el cual es un polímero altamente hidrofílico y ampliamente biocompatible. En este sentido, numerosos trabajos han reportado el incremento de la hidrofiliidad y biocompatibilidad de sustratos de poliuretano a través del injerto de PEG [75,80–83].

Como se mencionó antes, el injerto de PEG genera un volumen excluido en una disolución acuosa [10,11,84]. Al controlar el volumen excluido, es posible generar superficies biocompatibles y bioactivas. Los dos factores más importantes que determinan el volumen excluido son el peso molecular y el grado de injerto de PEG [12]. En este contexto, tanto Wang *et al.* [22] como Tang *et al.* [85] reportaron un incremento en la viabilidad de distintos tipos celulares, al incrementar el grado de injerto de PEG en sustratos de poli(glicerol sebacato) y polietiliminina, respectivamente. De igual forma, Cai *et al.* [86] estudiaron el efecto del grado de injerto de PEG en sustratos de polipropilénfumarato sobre la proliferación, adhesión y actividad de osteoblastos MC3T3. Todos estos parámetros aumentaron con el grado de injerto de PEG hasta cierta concentración; sin embargo, incrementos más allá de la concentración óptima tuvieron un impacto negativo. Por otra parte, Mao *et al.* [87] y Kasálková *et al.* [88] mostraron un incremento en la viabilidad de fibroblastos L929 y células de músculo liso vascular al aumentar el peso molecular del PEG injertado en copolímeros de quitosano y polietileno, respectivamente.

Estos estudios demuestran que el injerto de PEG en sustratos poliméricos puede incrementar su biocompatibilidad; además con un peso molecular y un grado de injerto de PEG adecuados es posible controlar la bioactividad de los sustratos. Sin embargo, el efecto del grado de injerto y el peso molecular de PEG sobre las propiedades superficiales y sobre el aumento de la viabilidad que exhiben los osteoblastos y los fibroblastos sobre sustratos de PU injertados con este polímero no ha sido entendido por completo.

Por lo tanto, en este trabajo se modificaron sustratos de PU mediante el injerto con PEG de tres pesos moleculares diferentes y con tres concentraciones molares distintas, con el objetivo de estudiar su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad de los

sustratos; para esto último, se evaluó la respuesta ejercida por los sustratos sobre la viabilidad y morfología de osteoblastos y fibroblastos.

## **Justificación**

Los poliuretanos son ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas ya que se consideran biocompatibles y tienen buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, la mayoría de poliuretanos comerciales de grado médico tienen una baja hidrofiliidad, lo cual reduce su bioactividad, biocompatibilidad y puede generar otros problemas como una trombosis. El injerto de PEG sobre sustratos de poliuretano permite incrementar su hidrofiliidad y biocompatibilidad; de esta forma se reduce la probabilidad de generar los problemas antes mencionados; no obstante, la bioactividad de los sustratos es reducida. A pesar de que el injerto de PEG en poliuretanos ha sido ampliamente estudiado, la mayoría de los trabajos se han centrado en reducir la adhesión celular y la adsorción de proteínas, y no se han realizado estudios para entender de forma adecuada el incremento de la biocompatibilidad y viabilidad celular producidos por el injerto de PEG a diferentes concentraciones con distintos pesos moleculares.

## **Hipótesis**

El injerto de cadenas de PEG de distinto peso molecular y a diferentes densidades de injerto permitirá regular el balance hidrofílico/hidrofóbico, la energía superficial superficial y la rugosidad de sustratos de PU, lo cual incrementará la viabilidad y la adhesión de osteoblastos y fibroblastos.

# Objetivos

## General

Modificar sustratos de PU (Tecoflex™ SG-80A) mediante el injerto de PEG de tres pesos moleculares a tres concentraciones distintas y estudiar el efecto que tiene en su composición balance hidrofílico/hidrofóbico, energía superficial y rugosidad, así como sobre la adhesión y viabilidad de distintos fibroblastos y osteoblastos.

## Específicos

- Modificar los sustratos poliméricos obtenidos mediante distintas densidades de injerto de PEG de distintos pesos moleculares.
- Caracterizar fisicoquímicamente los sustratos obtenidos, mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, análisis termogravimétrico, microscopía de fuerza atómica y ángulo de contacto.
- Estudiar la biocompatibilidad de los sustratos utilizando fibroblastos y osteoblastos.



# CAPÍTULO 2

## METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales

Muestras de polietilenglicol de 3 diferentes pesos moleculares: 2 kDa, 6 kDa y 10 kDa (PEG2, PEG6 y PEG10) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Los reactivos hexametileno diisocianato (HMDI, 98%) y trietilamina (TEA, 99%), y los disolventes tolueno (99.5%) y tetrahidrofurano (THF,  $\geq 99\%$ ) fueron adquiridos también de Sigma-Aldrich. El poliuretano segmentado de grado médico Tecoflex™ SG-80A (PU) fue obtenido de Lubrizol.

### 2.2 Preparación de los sustratos de poliuretano

Los sustratos de poliuretano se prepararon a partir de una disolución de Tecoflex™ SG-80A en THF (1:15 m/v), la cual fue dejada en agitación magnética por 24 h a temperatura ambiente; esta solución fue vertida en cajas Petri de 5.5 cm de diámetro y se dejó secar durante 48 h en una campana de extracción. Posteriormente se recortaron las películas obtenidas en cuadrados de 2 cm de lado y se secaron en una estufa de vacío durante 48 h a 60 °C.

### 2.3 Injerto de polietilenglicol sobre los sustratos de poliuretano

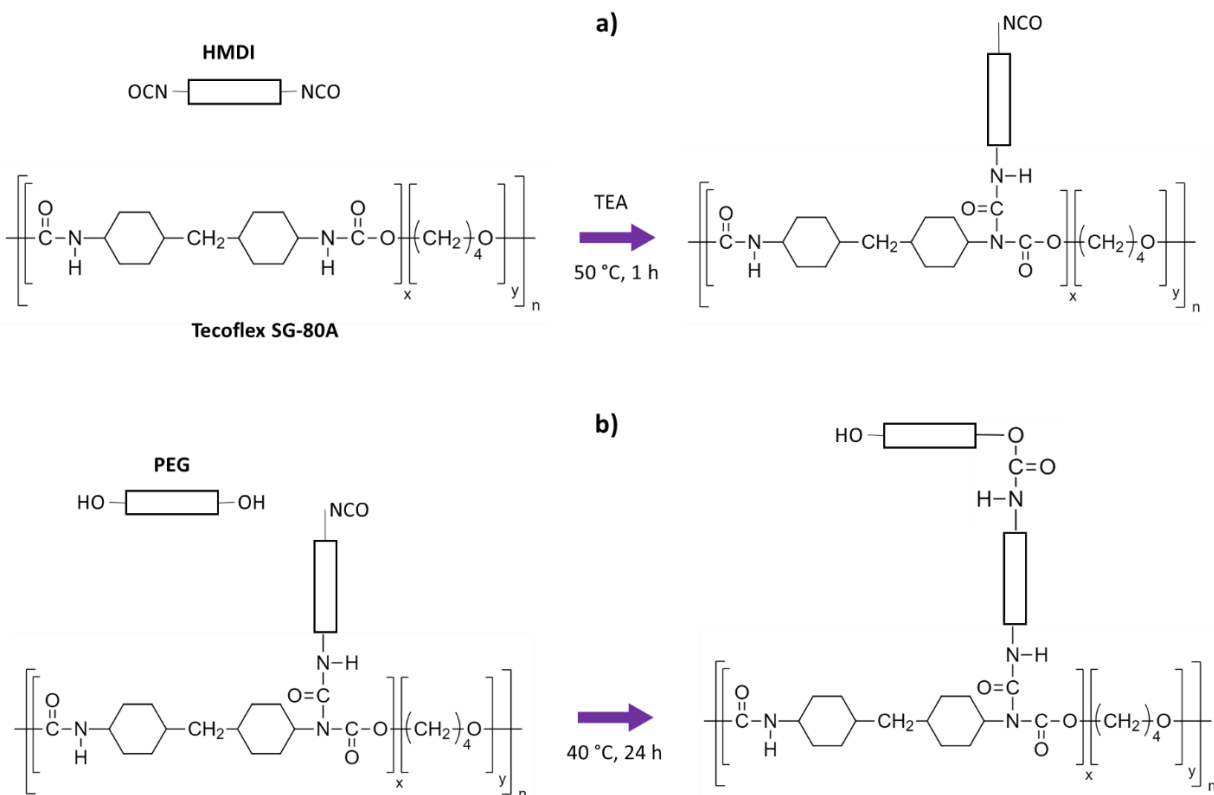
El injerto de PEG sobre los sustratos de PU fue realizado siguiendo el procedimiento reportado por Freij-Larsson y Wesslén [74]. Para esto se siguió una reacción de dos etapas, la cual es ilustrada en la Figura 2.1:

En la primera etapa se injertaron grupos isocianato en la superficie de las películas; esto se consiguió sumergiendo las películas en una solución de tolueno con HMDI y TEA. Para esto, se añadieron 30 mL de tolueno a un frasco de vidrio y este sistema se precalentó durante 20 min hasta alcanzar 50 °C; posteriormente se añadieron las cantidades respectivas de HMDI y TEA (ver Tabla 2.1) usando una micropipeta y se sumergió la película en esta disolución; la cantidad de TEA utilizada fue 1/3 v/v de HMDI. La reacción se mantuvo durante una hora con agitación magnética; al terminar, se extrajo la película y se cambió la disolución por 20 mL de tolueno, se puso nuevamente la película en el frasco y se lavó durante 20 min con agitación magnética.

En la segunda etapa se hizo reaccionar el PEG con los grupos isocianato para formar un enlace alofanato. Para esto se preparó una disolución de PEG en 30 mL de tolueno y se sumergió

en ésta la película obtenida de la etapa anterior. La reacción se mantuvo durante 24 h a 40 °C con agitación magnética. Al terminar, se lavó la película con 20 mL de tolueno durante 20 min.

Ambas reacciones se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno dentro de una caja de guantes. Después de la reacción, las películas se dejaron secar entre dos cajas Petri recubiertas de papel aluminio durante 72 h. Posteriormente, se secaron los sustratos en una estufa de vacío a 55 °C durante 48 h.



**Figura 2.1** Esquema de la reacción de injerto de PEG en los sustratos de PU. **a)** Injerto de grupos isocianato; **b)** reacción del PEG con los grupos isocianato de la superficie de los sustratos.

**Tabla 2.1** Composición de los sustratos de PU injertados con PEG.

Sustrato	PEG		HMDI
	Peso molecular (kDa)	Concentración (mmol)	(mmol)
PU-PEG2 0.05	2	0.05	0.05
PU-PEG2 0.10	2	0.10	0.10
PU-PEG2 0.15	2	0.15	0.15
PU-PEG6 0.05	6	0.05	0.05
PU-PEG6 0.10	6	0.10	0.10
PU-PEG6 0.15	6	0.15	0.15
PU-PEG10 0.05	10	0.05	0.05
PU-PEG10 0.10	10	0.10	0.10
PU-PEG10 0.15	10	0.15	0.15

## 2.4 Caracterización fisicoquímica de los sustratos modificados

### 2.4.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Los sustratos fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro ThermoFisher Scientific Nicolet 8700. El estudio se hizo por el método de reflectancia total atenuada (ATR) usando un cristal de ZnSe. Se realizaron 100 barridos en un intervalo de número de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$  con una resolución  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.4.2 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo Perkin-Elmer TGA 8000. Las muestras se analizaron de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $650\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una tasa de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en atmósfera de nitrógeno. La masa de las muestras utilizadas fue de 10 mg.

### 2.4.3 Microscopía electrónica de barrido

La topografía de los sustratos se observó por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un equipo JEOL JSM-6360LV. Los sustratos fueron recubiertos con una fina capa de oro y se utilizó un voltaje de aceleración de 20 kV.

#### 2.4.4 Ángulo de contacto y energía superficial

Para evaluar el balance hidrofílico/hidrofóbico de los sustratos se midieron los ángulos de contacto formados por una gota sésil (5  $\mu\text{L}$ ) de agua destilada, glicerol y diyodometano, usando un goniómetro ramé-hart 250-U1; se realizaron 5 repeticiones por cada disolvente. La energía superficial de los sustratos se calculó a partir de los ángulos de contacto obtenidos mediante el modelo de Van Oss y Good usando las siguientes ecuaciones [89,90]:

$$\frac{1}{2}(1 + \cos \theta)\gamma_L = (\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW})^{1/2} + (\gamma_S^+\gamma_L^-)^{1/2} + (\gamma_S^-\gamma_L^+)^{1/2} \quad (1)$$

$$\gamma_S^{AB} = 2(\gamma_S^+\gamma_S^-)^{1/2} \quad (2)$$

Donde  $\theta$  representa el ángulo de contacto;  $\gamma_L$  es la energía libre superficial del líquido;  $\gamma_L^{LW}, \gamma_L^-, \gamma_L^+$  son las componentes dispersiva, básica y ácida de la energía libre superficial del líquido, mientras que  $\gamma_S^{LW}, \gamma_S^{AB}, \gamma_S^-, \gamma_S^+$  representan las componentes dispersiva, polar, básica y ácida de la energía libre superficial del sólido, respectivamente.

#### 2.4.5 Microscopía de fuerza atómica

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de los sustratos se obtuvieron con un equipo Bruker INNOVA usando una punta de silicón TESP nanoprobe, la cual tiene una constante elástica de 42/N.m y una punta de 2 nm de radio. El análisis se realizó usando el modo tapping con una frecuencia de resonancia de 320 kHz y una frecuencia de escaneo de 0.3 Hz a temperatura ambiente. Para obtener la rugosidad, el área de escaneo de 20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  fue dividida en 4 subáreas de 10  $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  y analizadas con el software Nanoscope Analysis.

### 2.5 Caracterización biológica de los sustratos

#### 2.5.1 Cultivo celular

Osteoblastos de rata y fibroblastos humanos fueron expandidos en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de solución antibiótica y antimicótica de penicilina/estreptomicina a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>; el medio osteoblástico fue suplementado adicionalmente con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido ascórbico. Al alcanzar 80% de confluencia, las células fueron despegadas con una solución de 0.25% tripsina-EDTA. La densidad de células viables fue obtenida usando una cámara de Neubauer.

### 2.5.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada por contacto indirecto de acuerdo a la norma internacional ISO 10993-5. Los sustratos se esterilizaron con radiación UV por 30 min y luego se realizaron lavados con búfer fosfato salino (PBS); después se prepararon extractos de los sustratos colocándolos en DMEM a una razón de 100:25 (mg/mL) e incubados bajo condiciones estándar de cultivo por 72 h. Se sembraron las células en placas de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo e incubadas por 24 h con 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Después de esto, el medio de cultivo fue reemplazado con 100  $\mu$ L de los extractos e incubados por 24 h; células en 100  $\mu$ L de medio de cultivo y solución de peróxido al 5% fueron usadas como control positivo y negativo, respectivamente. Para evaluar la viabilidad celular se agregaron 20  $\mu$ L de solución CellTiterBlue a los pozos y se incubaron durante 4 h. Posteriormente, se midió la absorbancia de los pozos a 570 nm en un lector de placas BioTek Cytation 3. Se reportó la viabilidad celular como el promedio de 5 mediciones utilizando la siguiente fórmula:

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{A - A_n}{A_p - A_n} \times 100 \quad (3)$$

Donde A es el promedio de la absorbancia de los pozos de cada tratamiento y  $A_p$  y  $A_n$  son la absorbancia de los controles positivo y negativo, respectivamente.

### 2.5.3 Tinción con cristal violeta

La morfología celular fue observada en un microscopio óptico invertido Labomed TCM 400 después de una tinción con cristal violeta de las células utilizadas para el ensayo de viabilidad. Para esto, se retiró el medio de los pozos y se lavaron las células dos veces con PBS; después se fijaron las células con 50  $\mu$ L de metanol durante 5 min. Se retiró el metanol de los pozos y se colocaron 50  $\mu$ L de solución de cristal violeta durante 5 min; posteriormente se retiró la solución de cristal violeta de los pozos, se hicieron 3 lavados con agua destilada y se dejaron secar.

### 2.5.4 Ensayo *Live/Dead*

Se realizó un ensayo *Live/Dead* para evaluar la citotoxicidad de los sustratos en osteoblastos. Para esto, se esterilizaron cubreobjetos lavándolos con etanol (96%) durante 30 min y, posteriormente con radiación UV por 30 min. Los cubreobjetos se colocaron en una placa de 48 pozos y se lavaron dos veces con PBS estéril. Se sembraron osteoblastos sobre los cubreobjetos a una densidad de  $15 \times 10^3$  células por pozo y se incubaron con 200  $\mu$ L de medio de cultivo por 72

h; después de esto, se retiró el medio, se colocaron los extractos de los sustratos y se incubaron los osteoblastos por 24 h. Posteriormente, se retiraron los extractos y se incubaron las células con 100  $\mu\text{L}$  de disolución de 3  $\mu\text{mol/mL}$  de calceína y 3  $\mu\text{mol/mL}$  de homodímero de etidio (EthD-1) en PBS durante 1 h a 37 °C en cuarto oscuro. Finalmente, se retiró la disolución del ensayo y los cubreobjetos fueron colocados sobre portaobjetos con 10  $\mu\text{L}$  del medio de montaje. La fluorescencia de las muestras fue observada en un microscopio confocal Olympus Corp. FV-100 usando una excitación de 421 nm para calceína y 480 para EthD-1.

### **2.5.5 Contacto directo**

Se realizó un ensayo de viabilidad por contacto directo con las células para evaluar su adhesión sobre los sustratos. Debido a que los sustratos flotaban en el medio, se elaboraron unos anillos de poli(ácido láctico) (PLA) para mantenerlos en el fondo de los pozos de cultivo. Para esto se imprimieron anillos de PLA de 6 mm de diámetro externo y 4.5 mm de diámetro interno en una impresora 3D; estos anillos fueron lavados con extrán (2%) y esterilizados en etanol durante 24 h. Se prepararon discos de los sustratos de 4.5 mm de diámetro, los cuales fueron colocados en una placa de 96 pozos; los sustratos fueron esterilizados durante 30 min por radiación UV y lavados dos veces con PBS estéril. Posteriormente, se sembraron células sobre los sustratos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo y se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo durante 24 h. Después de esto se observaron las células en un microscopio óptico invertido Labomed TCM 400.

### **2.6 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey usando el software Origin 2008, empleando una  $P < 0.05$ .

# CAPÍTULO 3

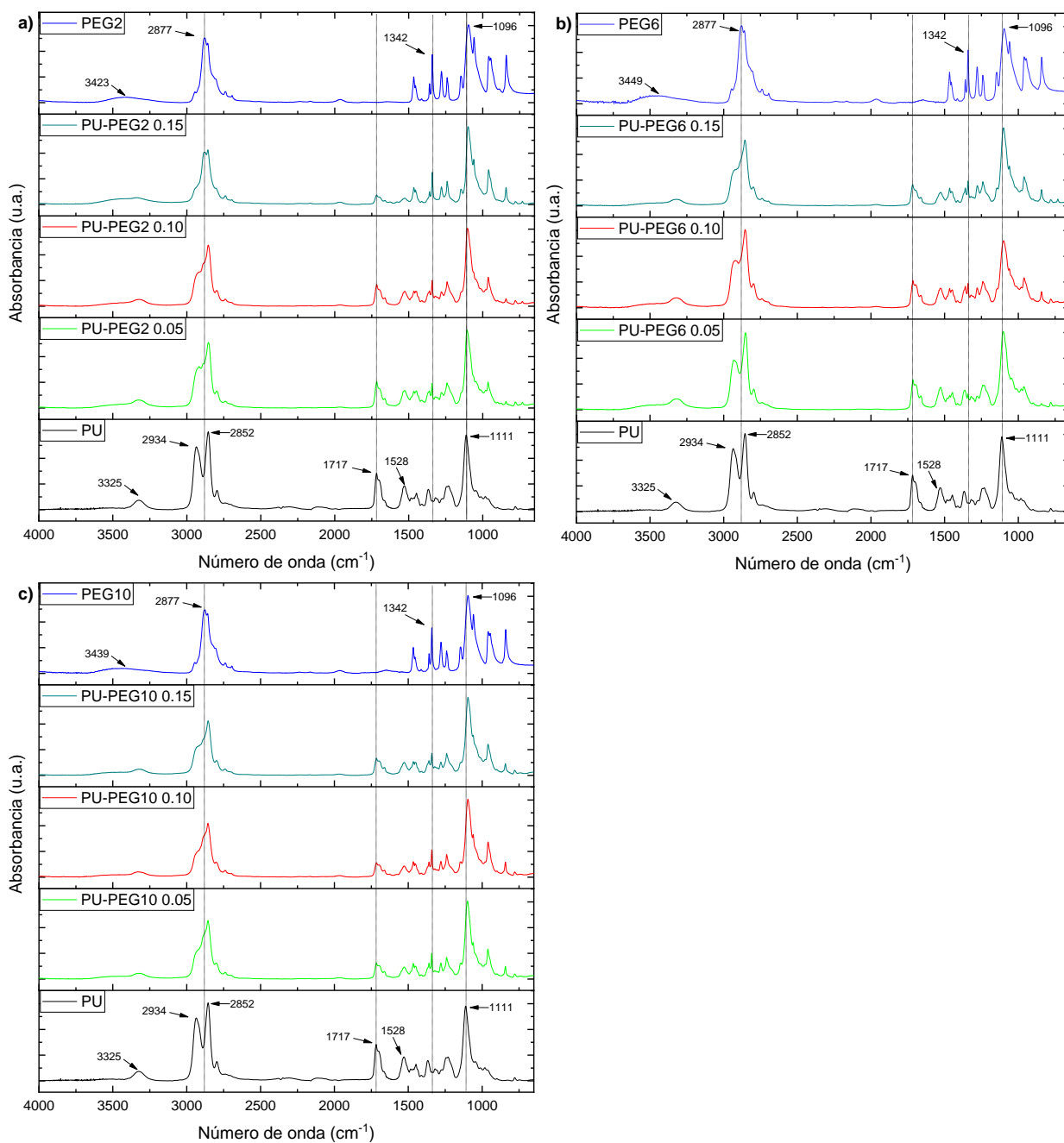
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización fisicoquímica

#### 3.1.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Para evaluar los cambios químicos producidos por las reacciones de injerto en la superficie de las películas de PU, se realizó espectroscopía FTIR-ATR. Los espectros FTIR de los sustratos de PU modificados y no modificados, y de los PEG se muestran en la Figura 3.1. En el espectro del Tecoflex™ SG-80A se observan bandas en:  $3325\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace N-H; en  $2934$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ); en  $1717\text{ cm}^{-1}$  que pertenecen al estiramiento del enlace carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ , amida I);  $1528\text{ cm}^{-1}$  de la vibración de flexión del enlace C-N (amida II); y en  $1111\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración asimétrica del enlace C-O. Por su parte, los PEG (PEG2, PEG6 y PEG10) presentan bandas características en:  $3423\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace O-H;  $2877\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los enlaces C-H;  $1342\text{ cm}^{-1}$  de la flexión del enlace O-H; y en  $1096\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-O-C. No se observaron diferencias significativas entre los PEG independientemente de su peso molecular.

Los espectros de los sustratos de PU modificados muestran las bandas características de ambos polímeros, aunque éstos son más parecidos a los espectros de los PEG a medida que se incrementa la concentración molar de PEG utilizada en la reacción de injerto. De esta manera, las bandas en  $2934$  y  $1717\text{ cm}^{-1}$  decrecen, y aparece una banda en  $1342\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la flexión de grupos O-H, la cual no se observa en el PU prístino. Adicionalmente, la banda en  $1111\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los enlaces C-O se mueve a números de onda menores, mientras que la banda en  $2852\text{ cm}^{-1}$  muestra un comportamiento contrario, al aumentar la concentración de PEG en los sustratos modificados; esto sugiere que aumentó la cantidad de PEG en los sustratos modificados.

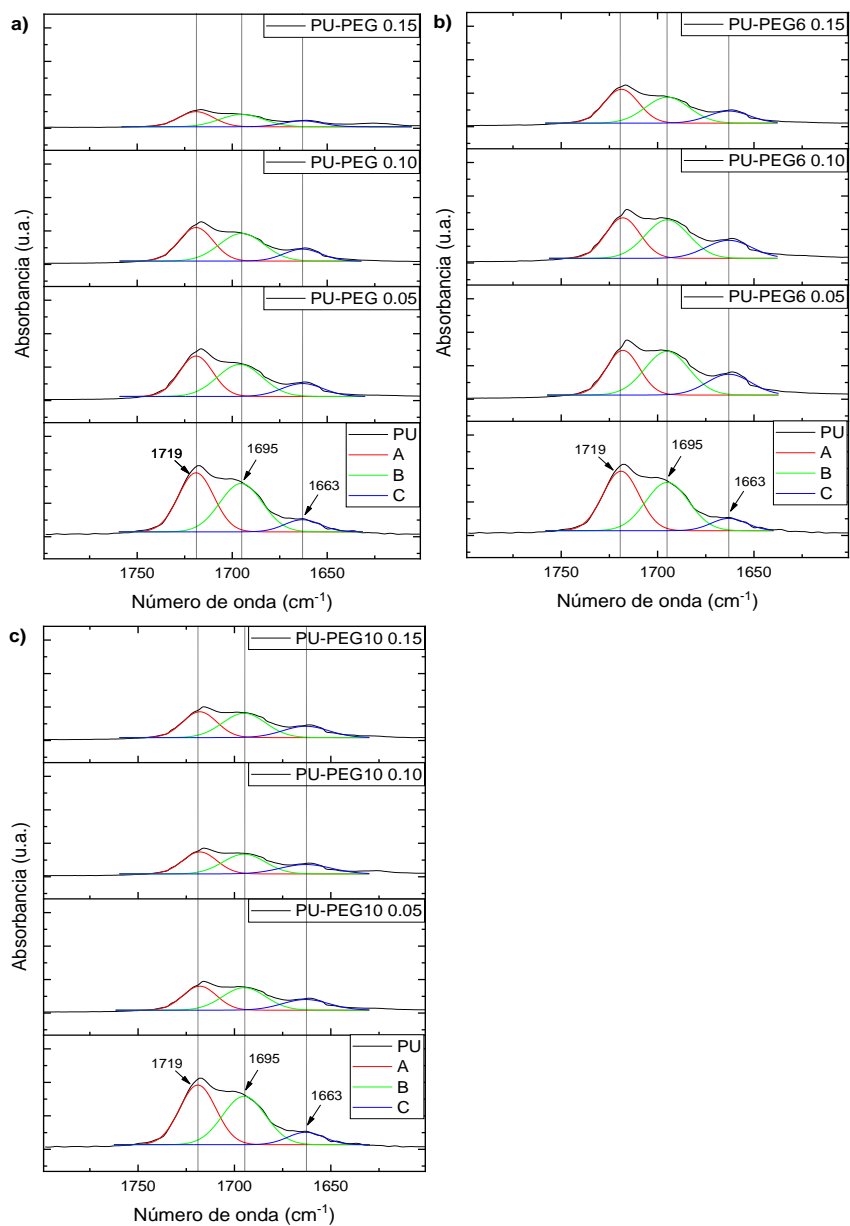


**Figura 3.1** Espectros FTIR de los sustratos de PU, PU injertados con PEG y PEG. **a)** PEG2; **b)** PEG6; **c)** PEG10.

La reacción de injerto ocurre en los enlaces uretano del PU, resultando en la formación de enlaces alofanato debido a la reacción de un grupo isocianato del HMDI con la amina secundaria del enlace uretano. Se realizó una deconvolución de las bandas en la zona de carbonilos (de 1800  $\text{cm}^{-1}$  a 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) para evaluar las modificaciones en los enlaces uretano y la formación de grupos alofanato (Figura 3.2). Se puede observar que la banda de absorción de los enlaces carbonilo está formada por la contribución de tres señales: una en 1719  $\text{cm}^{-1}$  (A), otra en 1695  $\text{cm}^{-1}$  (B) y la



última en  $1661\text{ cm}^{-1}$  (C). A y B corresponden a las vibraciones de estiramiento de los enlaces carbonilo libres y asociados a puentes de hidrógeno, respectivamente; mientras que la banda C es asociada al estiramiento del grupo carbonilo de la subestructura similar a una urea de los enlaces alofanato [91,92]. Interesantemente, la razón  $C/(A+B)$  incrementa para todos los sustratos modificados al compararlos con el PU sin modificar (ver Tabla 3.1); esto sugiere que el número de enlaces alofanato se incrementa con respecto al número de enlaces uretano.



**Figura 3.2** Deconvolución de las bandas de carbonilo de los sustratos. **a)** PEG2; **b)** PEG6; **c)** PEG10.

**Tabla 3.1** Razón de bandas carbonilo de los sustratos.

<b>Muestra</b>	<b>C/(A+B)</b>
PU	0.146
PU-PEG2 0.05	0.211
PU-PEG2 0.10	0.226
PU-PEG2 0.15	0.243
PU-PEG6 0.05	0.256
PU-PEG6 0.10	0.254
PU-PEG6 0.15	0.234
PU-PEG10 0.05	0.260
PU-PEG10 0.10	0.254
PU-PEG10 0.15	0.234

A: banda 1719  $\text{cm}^{-1}$ ; B: banda 1695  $\text{cm}^{-1}$ ; C: banda 1663  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.1.2 Análisis termogravimétrico

Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) para conocer la estabilidad térmica de los materiales. El PU exhibe dos pérdidas de masa (Tabla 3.2); la primera localizada en 247 °C, es asociada a la degradación del segmento duro del poliuretano segmentado (Td1), mientras que la segunda pérdida de masa ocurre en 413 °C y es asociada a la descomposición del segmento suave (Td2) [93]. En contraste, los termogramas de los PEG exhiben una única descomposición térmica en 405 °C, 413 °C y 417 °C para el PEG2, PEG6, PEG10, respectivamente.

La estabilidad térmica de los sustratos de PU es reducida con el injerto de PEG, lo cual puede apreciarse por la disminución en Td1. Esto confirma que el segmento duro del PU está siendo modificado por la reacción de injerto, debido a que los enlaces alofanato tienen una menor estabilidad térmica que los enlaces uretano [94]; este efecto es menos apreciado al incrementar el peso molecular del PEG.

**Tabla 3.2** Temperaturas de descomposición térmica (Td) del PU, PEG y los sustratos de PU modificados.

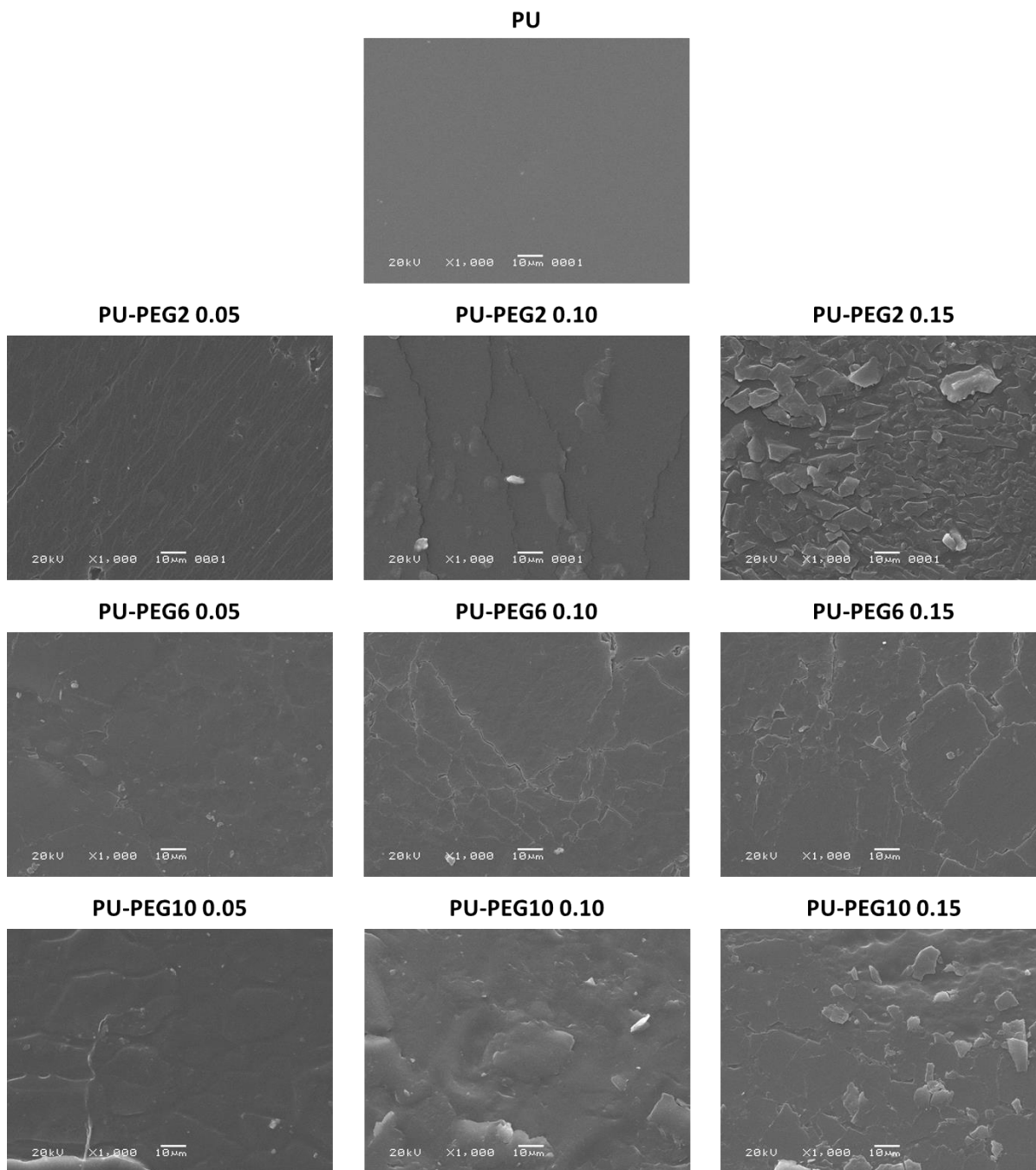
<b>Muestra</b>	<b>Td1 (°C)</b>	<b>Td2 (°C)</b>
PU	340	413
PEG2	-	405
PU-PEG2 0.05	315	406
PU-PEG2 0.10	319	405
PU-PEG2 0.15	328	405
PEG6	-	413
PU-PEG6 0.05	330	407
PU-PEG6 0.10	319	406
PU-PEG6 0.15	334	415
PEG10	-	417
PU-PEG10 0.05	340	411
PU-PEG10 0.10	340	414
PU-PEG10 0.15	340	414

### **3.1.3 Topografía de los sustratos**

Las imágenes de SEM de los sustratos (Figura 3.3) indican que el PU sin modificar presenta una superficie lisa y homogénea; sin embargo, el injerto de PEG modifica la superficie de los sustratos dependiendo del grado de injerto y el peso molecular de PEG. En general, la topografía de los sustratos cambió de ser ligeramente lisa para las concentraciones menores de PEG (0.05 mmol) a topografías más rugosas con la presencia de aglomerados, al incrementar el grado de injerto de PEG. Por otra parte, el peso molecular del PEG parece no tener un efecto significativo en la topografía de los sustratos al no observarse diferencias importantes entre los distintos pesos moleculares con el mismo grado de injerto.

Las imágenes de AFM presentadas en la Figura 3.4 corroboran que el injerto de PEG produce una topografía de los sustratos más irregular y rugosa. Adicionalmente, puede observarse la formación de dominios más grandes al incrementar el peso molecular del PEG; esto es debido a que el tamaño de las moléculas injertadas es mayor dependiendo del peso molecular. Estos resultados sugieren la formación de una cubierta en la superficie de los sustratos, la cual depende principalmente del grado de injerto de PEG; esta cubierta puede ser la razón por la que el efecto en la disminución de la estabilidad térmica de los sustratos modificados es menor al incrementar

el grado de injerto de PEG, pues evitaría la volatilización de los compuestos generados por la degradación térmica.



**Figura 3.3** Imágenes de SEM de los sustratos de PU.

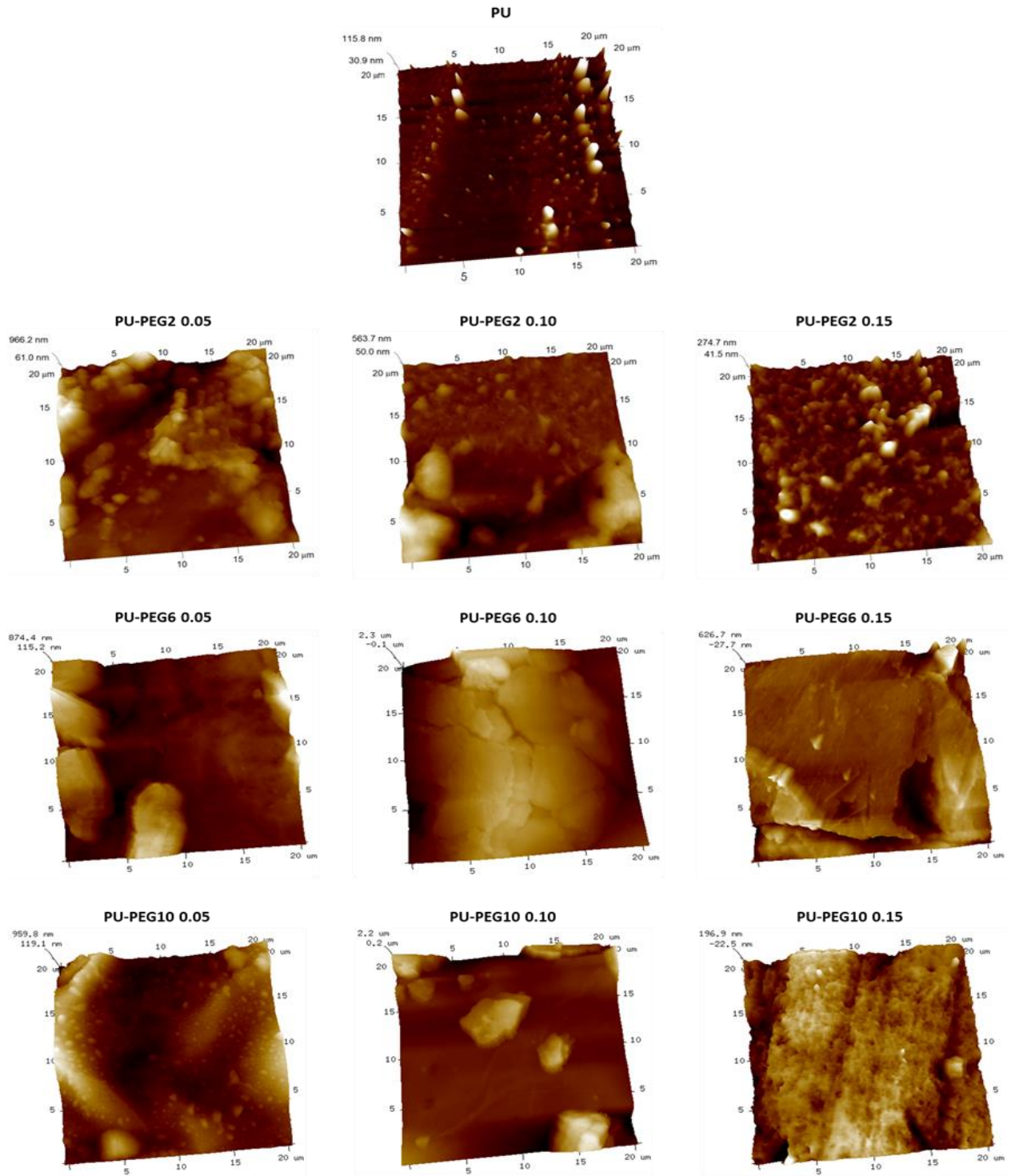
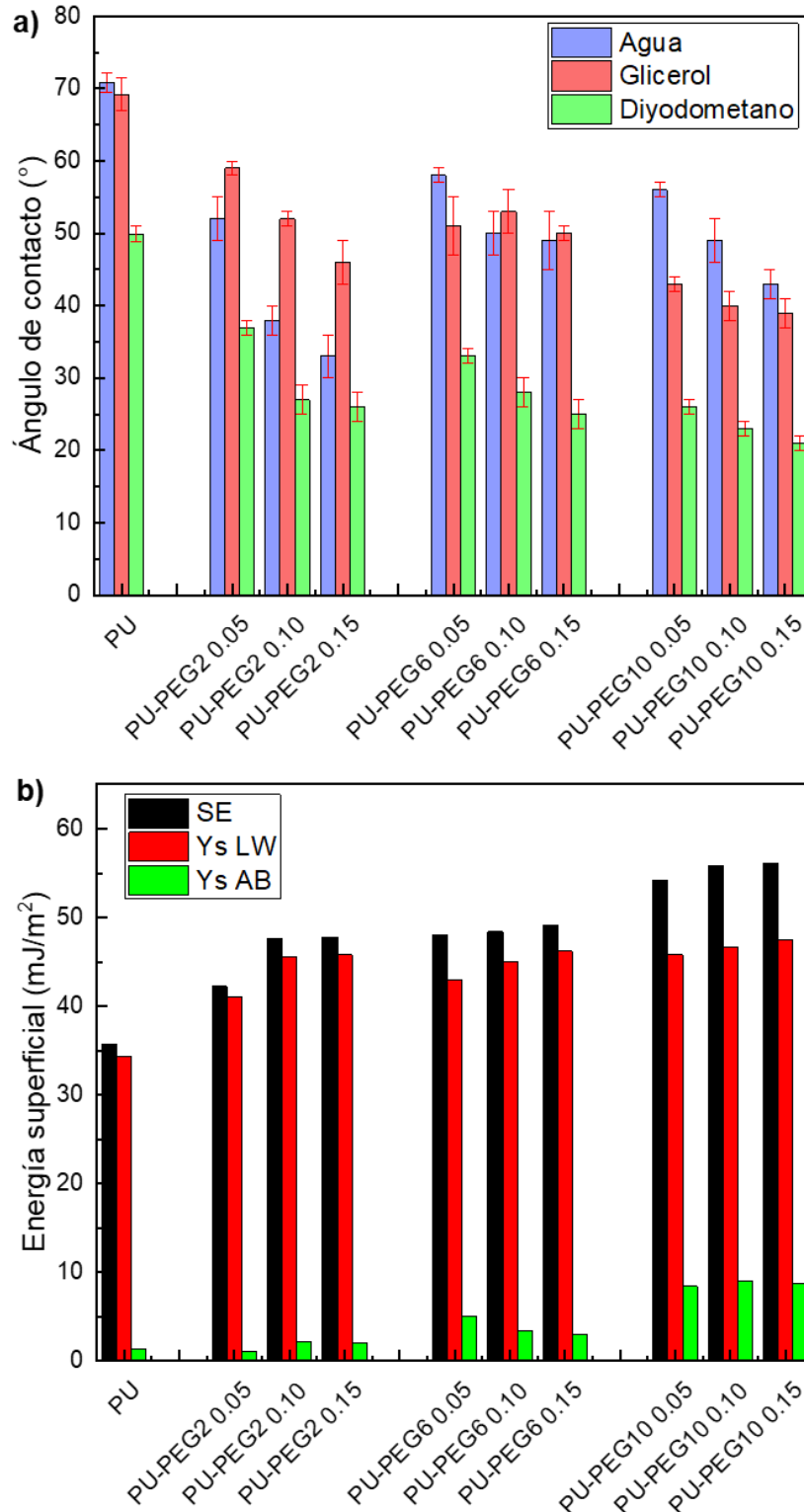


Figura 3.4 Imágenes de AFM de los sustratos de PU.

### 3.1.4 Ángulo de contacto y energía superficial

Los ángulos de contacto formados entre las gotas sésiles de diferentes disolventes (agua destilada, glicerol y diyodometano) y las superficies de los sustratos de PU se presentan en la Figura 3.5a. Como se puede observar, los ángulos de contacto del agua y glicerol con el PU son similares ( $\sim 70^\circ$ ), lo cual demuestra su baja hidrofiliidad; sin embargo, el diyodometano exhibe valores menores, debido a sus características no polares. También puede observarse que el ángulo de contacto de los tres líquidos disminuyó en los sustratos injertados al aumentar el contenido de PEG; más aún, los valores muestran una tendencia a disminuir con el grado de injerto y el peso molecular del PEG. Por una parte, la disminución de los ángulos de contacto del agua y el glicerol sugieren que la hidrofiliidad de los sustratos incrementa con el injerto de PEG; aunque, por otra parte, la reducción de los valores de los ángulos de contacto del diyodometano sugiere que el carácter hidrofóbico de los sustratos también incrementa. Esto es debido a la cubierta de PEG formada sobre los sustratos, debido a que el PEG tiene una naturaleza anfifílica debido a su estructura molecular ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); los grupos etilo forman un dominio no polar, mientras que los grupos éter actúan como dominios polares básicos [95–97].

La Figura 3.5b muestra la energía libre superficial de los sustratos, calculada como la suma de sus componentes polar y dispersiva. La energía libre superficial de los sustratos incrementó con el grado de injerto y el peso molecular del PEG. Más aún, las componentes polar y dispersiva incrementaron con el peso molecular y el grado de injerto de PEG, lo cual se debe a la presencia de dominios polares y no polares antes mencionados.



**Figura 3.5 a):** Ángulos de contacto de los sustratos con agua, glicerol y diyodometano; **b):** Energía libre superficial de los sustratos obtenida con el modelo de van Oss y Good. SE: energía superficial;  $\Upsilon_s$  LW: componente dispersiva;  $\Upsilon_s$  AB: componente polar.

## 3.2 Caracterización biológica

### 3.2.1 Ensayos de viabilidad

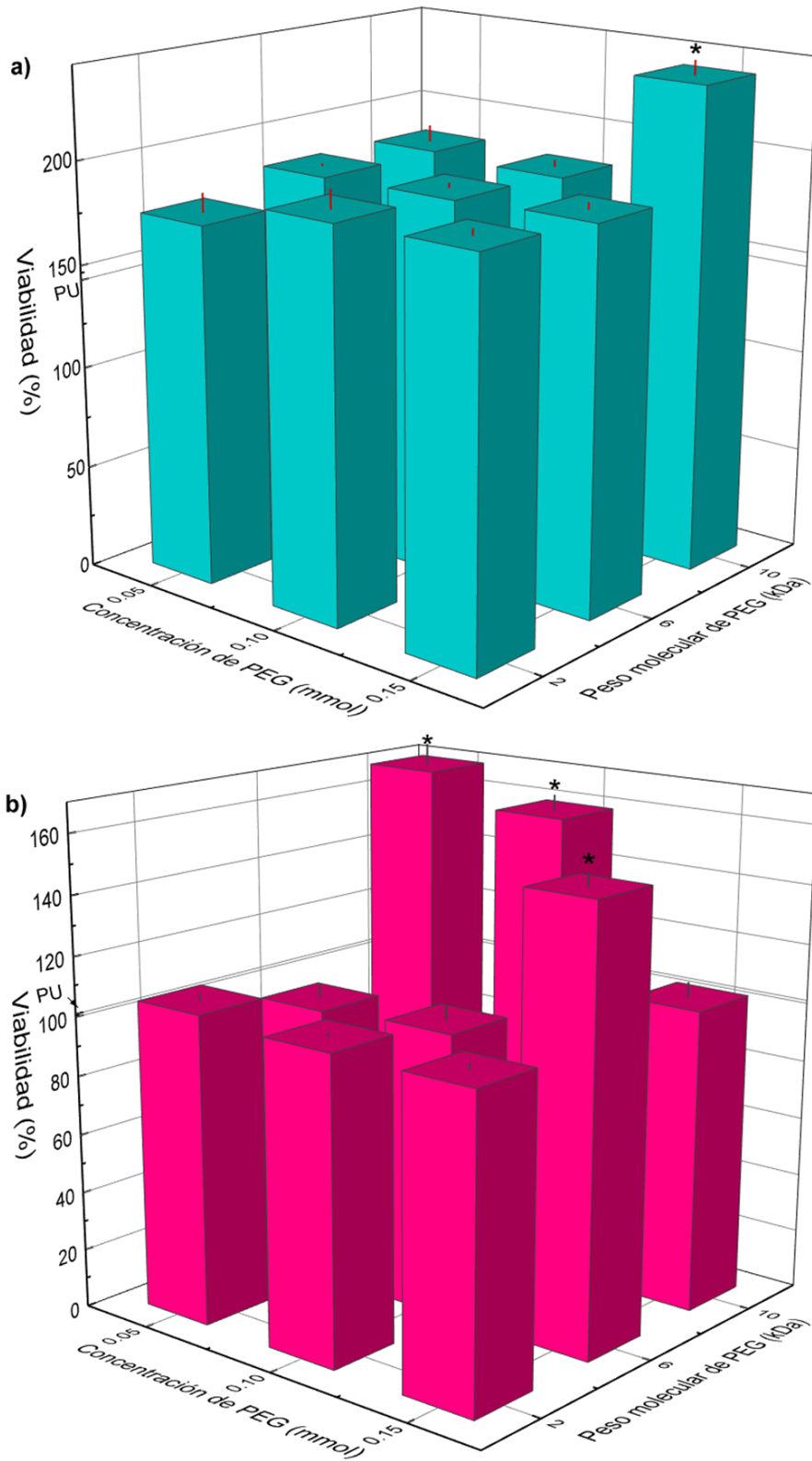
La viabilidad de osteoblastos y fibroblastos en contacto con los extractos de los sustratos es presentada en la Figura 3.6a y Figura 3.6b, respectivamente. Se puede observar que ninguna de las muestras generó una viabilidad menor a la del cultivo sin exposición a los extractos (CWE), el cual fue tomado como referencia para una viabilidad del 100%; esto indica que los lixiviados generados por los sustratos no son citotóxicos. Interesantemente, la viabilidad de los osteoblastos aumentó en comparación con el CWE para todos los sustratos (Figura 3.6a); más aún, el injerto de PEG generó una mayor viabilidad en los sustratos en comparación con el PU sin tratamiento. Sin embargo, no se observa diferencia estadística significativa entre las distintas concentraciones y pesos moleculares de PEG; excepto para el PU-PEG10 0.15 que promovió una mayor viabilidad en comparación con los demás sustratos. Por otra parte, la viabilidad de los fibroblastos (Figura 3.6b) no fue afectada por el injerto del PEG de menor peso molecular (PEG2), ni las concentraciones más bajas (0.05 y 0.10 mmol) del PEG de peso molecular intermedio (PEG6); no obstante, este parámetro aumentó con la concentración más alta de PEG6 (PU-PEG6 0.15). El mayor peso molecular de PEG (PEG10), promovió una mayor viabilidad de los fibroblastos, pero ésta disminuyó al incrementar el grado de injerto de PEG.

Este efecto puede atribuirse a la presencia de PEG en los extractos de los sustratos. En este contexto, se ha reportado una mayor proliferación y esparcimiento de osteoblastos en copolímeros que incluían PEG [98–100]; por ejemplo, Piotrowski *et al.* [101] reportaron un incremento en la viabilidad de osteoblastos incubados en medio de cultivo que contenía fullerenos injertados con PEG y atribuyeron este efecto a la biocompatibilidad del PEG y sus grupos OH terminales, lo cual está en acuerdo con los resultados aquí presentados. Sin embargo, atribuir este comportamiento únicamente a los grupos OH del PEG no explica del todo el efecto observado.

Algunos reportes han revelado que un pH alcalino en el medio de cultivo puede incrementar la viabilidad y la actividad de osteoblastos [102,103]. Como se mencionó antes, el PEG contiene grupos éter que tienen un comportamiento polar básico, por lo que se investigó si éstos tenían un efecto en el pH del medio de cultivo. Para esto, se agregó PEG de los tres pesos moleculares utilizados a tres concentraciones distintas en el medio de cultivo (DMEM) y se



midió el cambio en el pH utilizando un equipo Oakton pH 510; los resultados obtenidos son reportados en la Tabla 3.3.



**Figura 3.6** Viabilidad celular por contacto indirecto con los sustratos. **a)** Osteoblastos; **b)** Fibroblastos. (\*) diferencia estadística  $p < 0.05$ .

Como puede observarse, el pH del medio de cultivo incrementa al agregar PEG; más aún, este incremento es dependiente de la concentración de PEG, siendo más alcalino al aumentar la concentración. Esto puede atribuirse a que existe una interacción entre los grupos éter del PEG con las moléculas de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) disueltas en el medio de cultivo. Como se ha mencionado, los grupos éter tienen un comportamiento polar básico, mientras que el  $\text{CO}_2$  tiene un comportamiento polar ácido; por lo tanto, las moléculas de PEG disueltas en el medio secuestran el  $\text{CO}_2$  por interacciones ácido-base de Lewis [104–107]. Es importante mencionar que el DMEM requiere bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) como búfer para regular su pH en un intervalo de 7.2-7.6 al ser incubado bajo una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ; por consiguiente, al ser secuestradas las moléculas de  $\text{CO}_2$  por el PEG disuelto en el medio, éstas no interactúan con el  $\text{NaHCO}_3$  resultando en la alcalinización del medio de cultivo. Al incrementar el grado de injerto de PEG, una mayor cantidad de PEG puede ser liberado en los extractos de los sustratos, lo que llevaría a una mayor cantidad de  $\text{CO}_2$  capturado por el PEG y un mayor incremento en el pH de los extractos. Adicionalmente, puede notarse que, aunque las concentraciones molares utilizadas fueron menores al incrementar el peso molecular del PEG, el aumento del pH fue similar al mostrado por el PEG de menor peso molecular (PEG2). Esto está relacionado con la cantidad de grupos éter que contienen las cadenas de PEG, la cual incrementa con el peso molecular; en consecuencia, al incrementar el peso molecular del PEG, una sola molécula puede interactuar con una mayor cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto en el medio. Esto lleva a que el PEG liberado por los sustratos tenga un mayor efecto en el pH del medio al incrementar el peso molecular del PEG. Lo anterior lleva a que el pH de los extractos incremente tanto con el grado de injerto, como con el peso molecular del PEG.

**Tabla 3.3** pH del medio de cultivo (DMEM) con PEG disuelto a diferentes concentraciones.

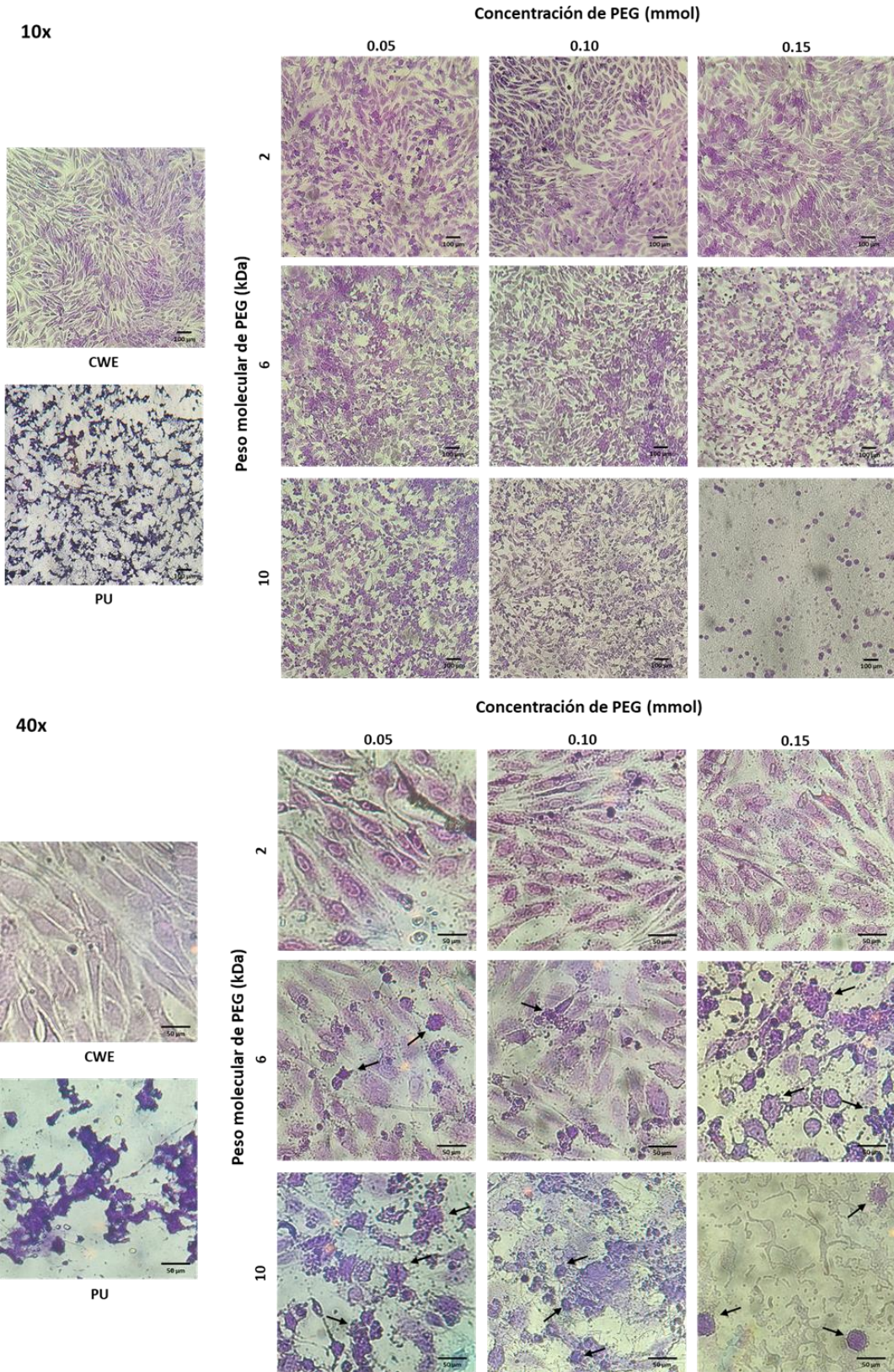
	PEG		pH
	(mg/mL)	( $\mu$ mol/mL)	
<b>DMEM</b>	0	0.0	8.50
<b>DMEM-PEG2</b>	1	0.5	8.57
	2	1.0	8.65
	3	1.5	8.70
<b>DMEM-PEG6</b>	1	0.2	8.57
	2	0.3	8.64
	3	0.5	8.70
<b>DMEM-PEG10</b>	1	0.1	8.57
	2	0.2	8.65
	3	0.3	8.70

Es importante mencionar que los osteoblastos tienen un rol en la regulación de la homeostasis ácido-base, pues el hueso funciona como un reservorio de iones minerales que pueden ser utilizados como búferes alcalinos [102]; esto explicaría el incremento en la viabilidad de los osteoblastos con todos los extractos de los sustratos. Por otro lado, los fibroblastos no tienen un rol similar en el mantenimiento de la homeostasis ácido-base, por lo que su viabilidad no incrementa tan significativamente; sin embargo, ésta aún se ve afectada por los cambios en el pH del medio de cultivo [108,109], pero el mecanismo por el que esto pasa es diferente.

### **3.2.2 Tinciones de cristal violeta**

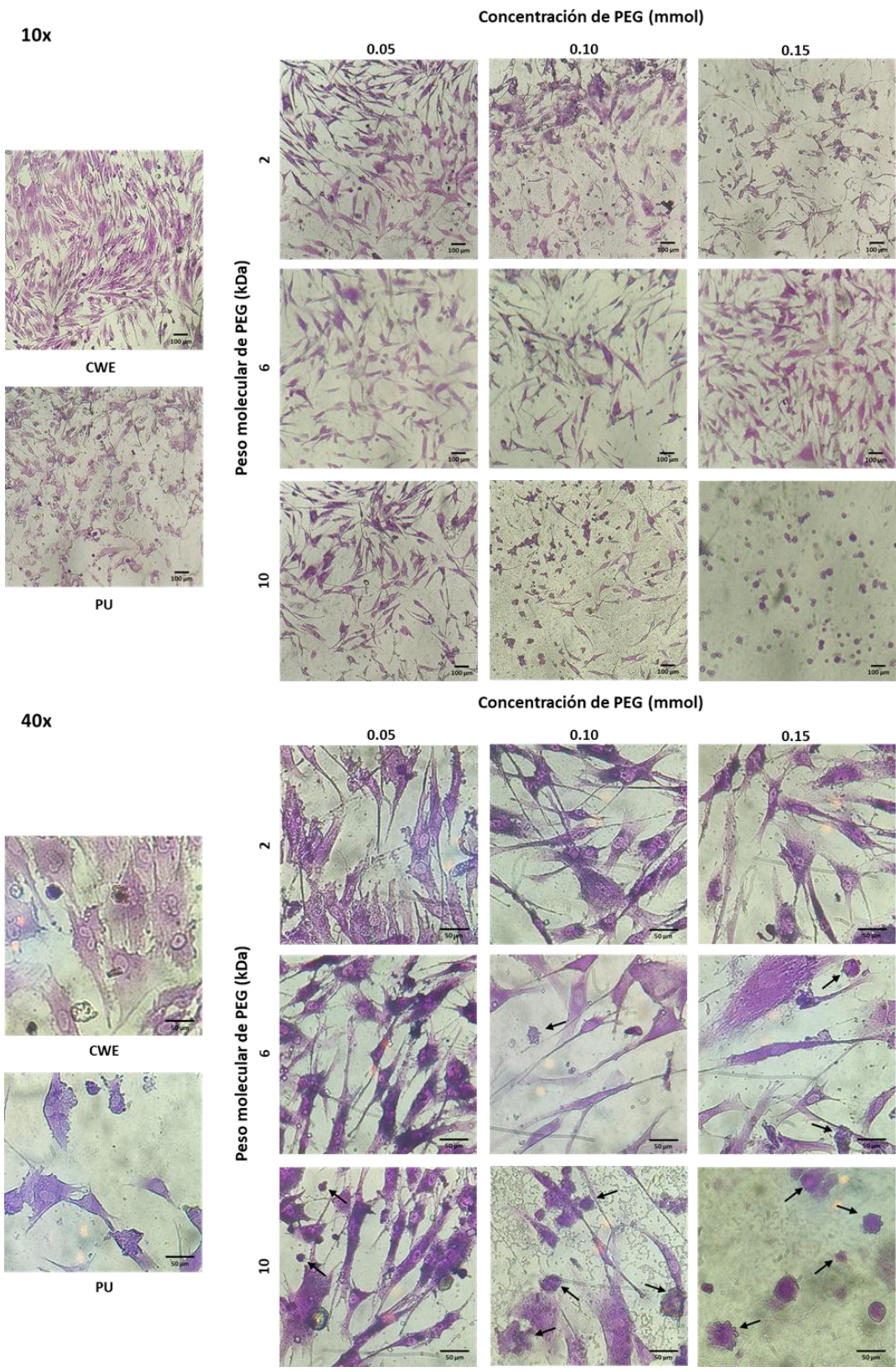
La morfología exhibida por los osteoblastos y fibroblastos en contacto con los extractos de los sustratos de PU es mostrada en la Figura 3.7 y Figura 3.8, respectivamente. Aunque ninguno de los extractos fue citotóxico, la morfología de los osteoblastos y fibroblastos mostró diferencias al ser incubados con los extractos de los sustratos; en este sentido, tanto los fibroblastos, como los osteoblastos, presentaron una morfología irregular y contraída en contacto con los extractos del PU sin tratamiento. Por otro lado, cuando estas células fueron cultivadas con los extractos de los sustratos modificados, exhibieron una morfología más extendida, similar a la del CWE; sin embargo, algunas células mostraron una morfología redondeada con los sustratos modificados.

Es interesante notar que el número de células redondeadas incrementa con el grado de injerto y el peso molecular del PEG; más aún, el número de células se redujo con los extractos de PU-PEG10 0.15 y todas las células observadas tenían una morfología circular. Además de esto, es importante notar que algunas de las células redondeadas exhibieron ampollas en la membrana celular, lo cual puede observarse en la Figura 3.7-40x y Figura 3.8-40x; esto parece indicar que dichas células iniciaron procesos apoptóticos. Interesantemente, al incrementar el grado de injerto y el peso molecular del PEG, un mayor número de células con ampollas en la membrana celular fueron observadas, mientras que el número de células viables se vio reducido.



**Figura 3.7** Imágenes microscópicas de osteoblastos cultivados con los extractos de los sustratos, teñidos con cristal violeta. Las flechas indican células con ampollas en la membrana celular.





**Figura 3.8** Imágenes microscópicas de fibroblastos cultivados con los extractos de los sustratos, teñidos con cristal violeta. Las flechas indican células con ampollas en la membrana celular.

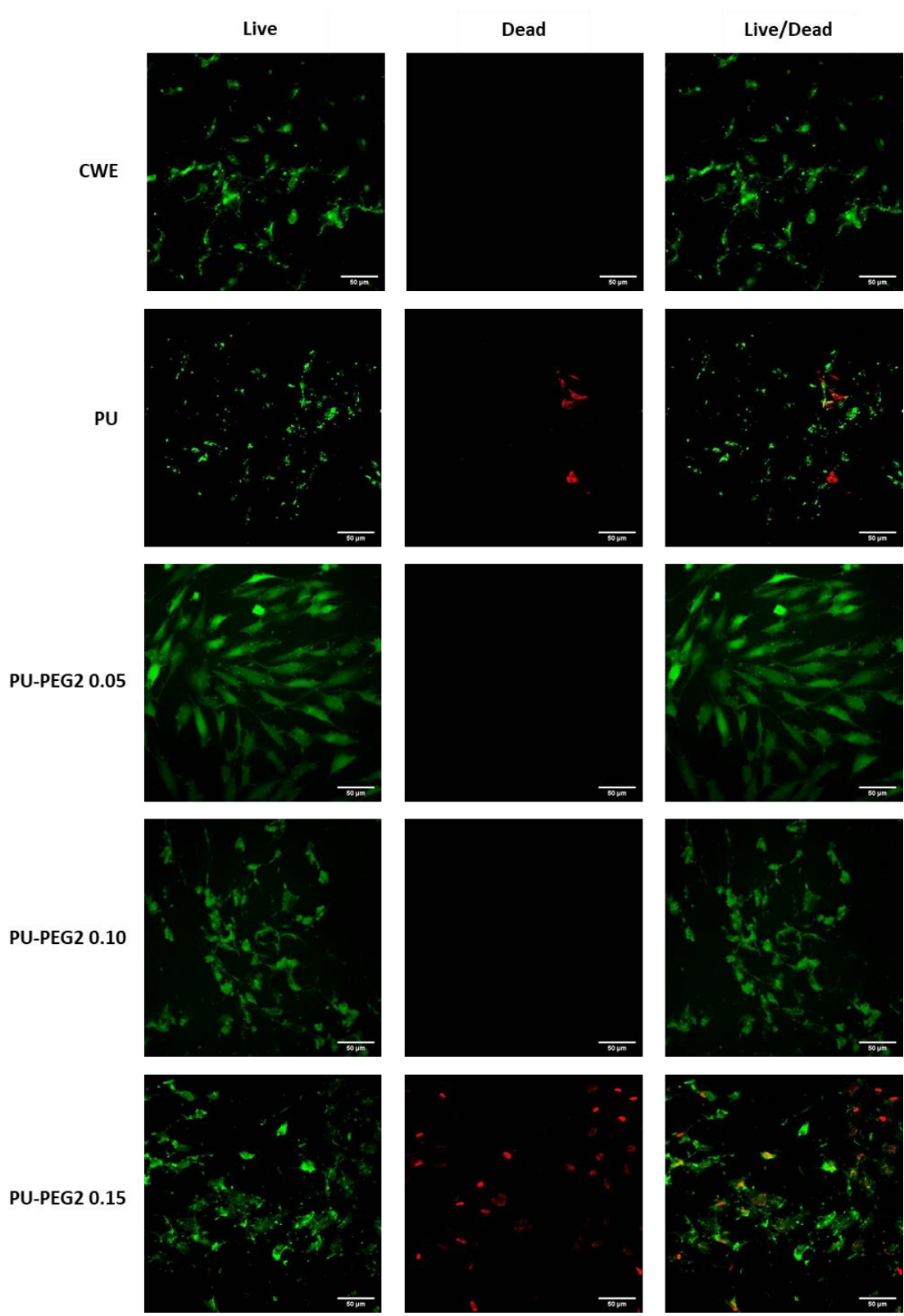
Este comportamiento de la morfología celular de los fibroblastos y osteoblastos puede atribuirse al incremento en el pH de los extractos que se discutió en la sección anterior. Este pH alcalino puede actuar como un estresor para las células, induciendo los comportamientos antes mencionados [110]. De forma similar a estos resultados, Lie *et al.* [111] reportaron un mayor crecimiento de fibroblastos cultivados en un pH de 7.8; sin embargo, la morfología de estas células fue afectada, mostrando la acumulación de cuerpos unidos a la membrana celular y de vacuolas autofágicas, características de procesos apoptóticos. Una posible explicación para estos efectos (viabilidad incrementada y morfología apoptótica), es que algunas enzimas y factores de crecimiento tienen una actividad óptima en un pH alcalino; a pesar de esto, un pH alcalino se ha relacionado con un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), debido a una mayor actividad de las proteínas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular [112–114]. El incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede aumentar la actividad de las mitocondrias, resultando en una mayor viabilidad y proliferación celular; sin embargo, altos niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mantenidos durante largos periodos de tiempo, así como sobrecargas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pueden activar mecanismos apoptóticos debido a un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de algunas caspasas relacionadas con la apoptosis celular [112,115–117]. Por lo tanto, aunque un pH alcalino puede inducir apoptosis en las células, su viabilidad no se vería reducida debido a una mayor actividad mitocondrial.

### **3.2.3 Ensayo *Live/Dead***

Debido a que los extractos de los sustratos tuvieron un mayor efecto en los osteoblastos, se realizó un ensayo *Live/Dead* con ellos para obtener más información de los efectos analizados en las secciones anteriores. De igual manera, dado que las muestras preparadas con los extractos de los sustratos injertados con PEG6 y PEG10 no mostraron células adheridas a los cubreobjetos (probablemente debido a que el estrés inducido por una mayor alcalinización del medio de cultivo dañó a las células y se despegaron durante el lavado de las muestras), únicamente se presentan las muestras de CWE, PU y los sustratos modificados con PEG2 en la Figura 3.9. En los osteoblastos del CWE se observa una morfología extendida de los osteoblastos, lo que indica que están adheridos a los cubreobjetos. El comportamiento de los osteoblastos cultivados con los extractos de los sustratos puede correlacionarse con el efecto que tuvieron los extractos sobre los osteoblastos en el ensayo de tinción con cristal violeta; los extractos del PU sin tratamiento generaron una morfología irregular y contraída en los osteoblastos, además presentan



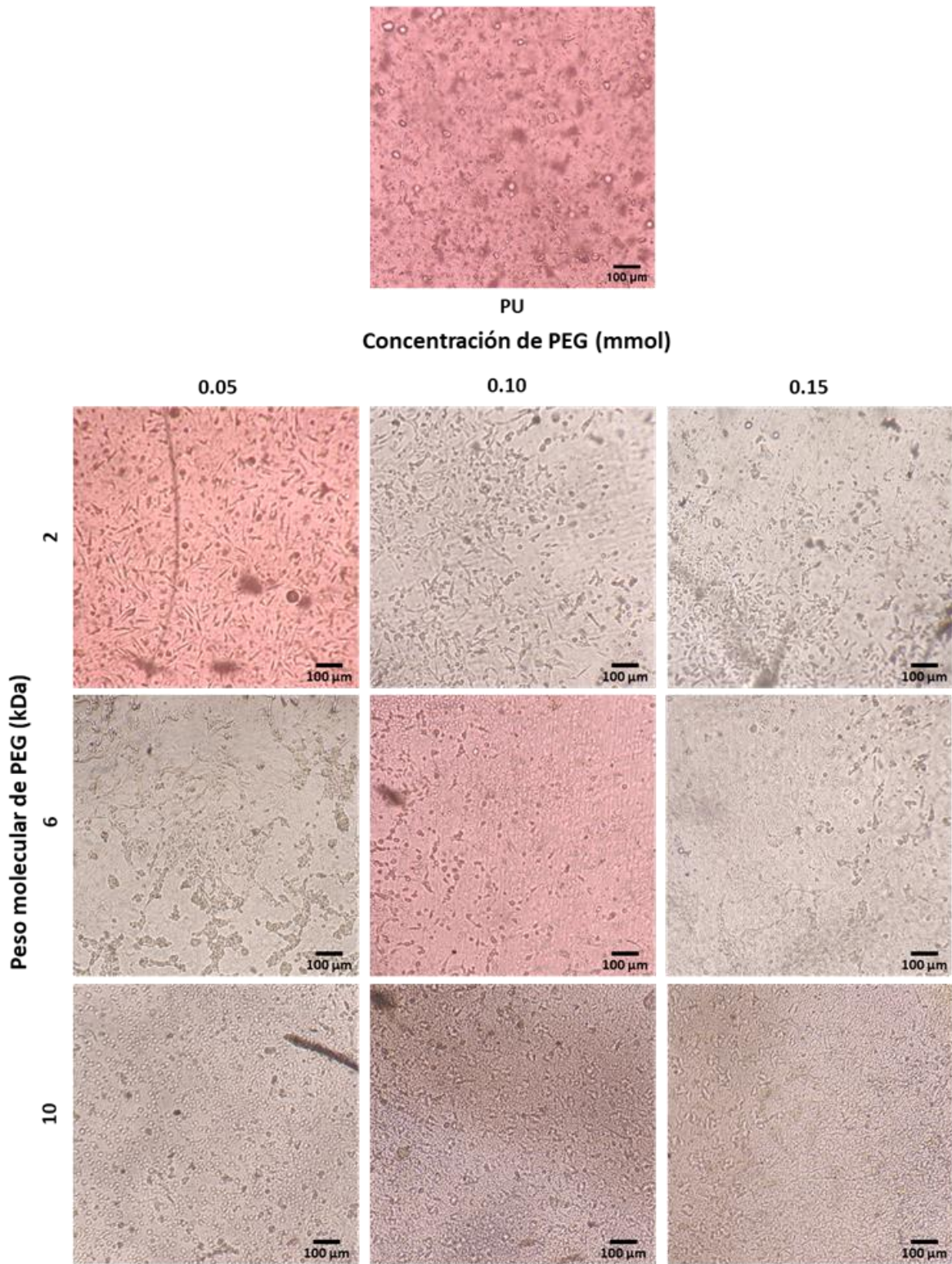
fluorescencia de EthD-1 (roja), indicando que algunas de estas células están muertas o moribundas. Por otro lado, los osteoblastos en contacto con los extractos de PU-PEG2 0.05 se ven sanos y con una morfología completamente extendida, además de una mayor fluorescencia de calceína (verde) en comparación con CWE. Sin embargo, al incrementar la concentración de PEG en los sustratos, la morfología de los osteoblastos se ve afectada, volviéndose irregular y contraída; incluso con la concentración más alta (PU-PEG2 0.15) se observan los núcleos de las células teñidos en rojo, indicando un daño en la membrana celular que permite el ingreso de EthD-1. Lo anterior puede deberse al efecto del pH sobre las proteínas de transporte de la membrana celular discutido antes, ya que al permanecer las células en un pH alcalino durante un periodo de tiempo prolongado puede atrofiarlas generando permeabilidad de la membrana celular [116]; esto puede llevar a la muerte de estas células debido a la pérdida de la función barrera de la membrana celular.



**Figura 3.9** Imágenes de microscopía confocal del ensayo *Live/Dead* de osteoblastos en contacto con extractos de los sustratos de PU por 24 h con aumento de 40x.

### **3.2.4 Adhesión celular sobre los sustratos**

Debido a que la adhesión celular sobre los sustratos es vital para que la célula realice sus funciones, se estudió el efecto del injerto de PEG sobre la adhesión de osteoblastos utilizando los sustratos de PU injertados con PEG de los tres pesos moleculares (PEG2, PEG6 y PEG10); las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3.10. Como puede notarse, no se observan células en la superficie del PU sin tratamiento, lo cual se atribuye a la baja hidrofiliidad mostrada por estos sustratos. Por otra parte, el injerto de PEG promovió la adhesión celular sobre los sustratos; sin embargo, al incrementar el peso molecular del PEG, la adhesión celular parece disminuir. Los osteoblastos en la superficie de los sustratos injertados con PEG2 muestran una morfología extendida, lo cual es atribuido al incremento en el carácter hidrofílico de los sustratos mostrado por el incremento en la componente polar de su energía superficial. El PEG de peso molecular intermedio (PEG6) promovió una morfología redondeada de los osteoblastos presentes en su superficie, lo cual sugiere que no hay una adhesión adecuada de estas células en la superficie de los sustratos; más aún, al incrementar el peso molecular del PEG (PEG10) se observa una menor cantidad de células en la superficie de los sustratos, todas exhibiendo una morfología completamente circular. Aunque también puede observarse que el número de células en los sustratos disminuye al incrementar la concentración de PEG, su efecto parece ser menor comparado con los cambios mostrados entre los distintos pesos moleculares de PEG. Lo anterior puede atribuirse a un exceso en la hidrofiliidad de los sustratos, además de un mayor volumen excluido generado por el incremento del peso molecular de las cadenas de PEG, que como se ha mencionado reduce la adsorción de proteínas en la superficie de los sustratos y la consecuente adhesión celular.



**Figura 3.10** Osteoblastos cultivados sobre los sustratos de PU sin tratamiento e injertados con PEG.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron sustratos de PU injertados con PEG de tres pesos moleculares a tres diferentes concentraciones y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

La espectroscopia FTIR confirmó la presencia de PEG en los sustratos modificados y que la reacción de injerto se produjo en los enlaces de uretano del segmento duro del PU; esto también fue confirmado por los resultados de TGA. También, se encontró que el injerto generó una cubierta de PEG sobre los sustratos de PU, la cual modificó su topografía y aumentó su hidrofiliidad, así como su energía libre superficial, a medida que se incrementa el peso molecular y la concentración de PEG.

El injerto de PEG mejoró la biocompatibilidad del PU, lo cual se sustenta principalmente por la mayor viabilidad que exhiben los osteoblastos, la morfología más saludable que presentan tanto los fibroblastos como los osteoblastos cultivados con extractos de los materiales, así como una mejor adhesión de osteoblastos en la superficie de los sustratos. Los resultados también muestran que el pH del medio de cultivo aumenta debido, tanto al peso molecular como al grado de injerto de PEG, siendo esto la causa del aumento de la viabilidad celular; sin embargo, esto podría desencadenar potencialmente la apoptosis en las células.

Finalmente, se demostró que la energía libre de la superficie, la topografía y el comportamiento biológico de los sustratos de PU pueden modularse mediante el peso molecular y el grado de injerto del PEG sobre ellos.

## Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que los sustratos de PU injertados con PEG poseen características fisicoquímicas y biológicas adecuadas para su uso en aplicaciones biomédicas. No obstante, para futuras investigaciones se recomienda:

- Estudiar el efecto de injertar PEG de menor peso molecular sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustratos de PU, para reducir el efecto de pasivación generado por el PEG en la superficie de los sustratos.
- Realizar la caracterización mecánica de los andamios, principalmente ensayos de microindentación.
- Continuar con los estudios del efecto del PEG sobre el comportamiento celular con pruebas de generación de ROS y pH intracelulares.

## Referencias

- [1] Langer R. Editorial: Tissue Engineering: Perspectives, Challenges, and Future Directions. *Tissue Eng* 2007;13:1–2. <https://doi.org/10.1089/ten.2007.13.1>.
- [2] Colnot C. Cell Sources for Bone Tissue Engineering: Insights from Basic Science. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:449–57. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0243>.
- [3] Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G. Chapter 9 Artificial Scaffolds for Peripheral Nerve Reconstruction, 2009, p. 173–98. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87009-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87009-8).
- [4] Bach AD, Beier JP, Stern-Staeter J, Horch RE. Skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2004;8:413–22. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00466.x>.
- [5] Vacanti CA, Vacanti JP. THE SCIENCE OF TISSUE ENGINEERING. *Orthop Clin North Am* 2000;31:351–5. [https://doi.org/10.1016/S0030-5898\(05\)70155-3](https://doi.org/10.1016/S0030-5898(05)70155-3).
- [6] Jung J-H, Choi C-H, Chung S, Chung Y-M, Lee C-S. Microfluidic synthesis of a cell adhesive Janus polyurethane microfiber. *Lab Chip* 2009;9:2596. <https://doi.org/10.1039/b901308c>.
- [7] Lehle K, Stock M, Schmid T, Schopka S, Straub RH, Schmid C. Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2008;90B:312–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31287>.
- [8] Lin H-B, Sun W, Mosher DF, García-Echeverría C, Schaufelberger K, Lelkes PI, et al. Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides. *J Biomed Mater Res* 1994;28:329–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280307>.
- [9] Stachelek SJ, Alferiev I, Choi H, Kronsteiner A, Uttayarat P, Gooch KJ, et al. Cholesterol-derivatized polyurethane: Characterization and endothelial cell adhesion. *J Biomed Mater Res Part A* 2005;72A:200–12. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30224>.
- [10] Lee H, Lee KD, Pyo KB, Park SY, Lee H. Catechol-grafted poly(ethylene glycol) for PEGylation on versatile substrates. *Langmuir* 2010;26:3790–3. <https://doi.org/10.1021/la904909h>.

- [11] Wattendorf U, Merkle HP. PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles. *J Pharm Sci* 2008;97:4655–69. <https://doi.org/10.1002/jps.21350>.
- [12] Wattendorf U, Koch MC, Walter E, Vörös J, Textor M, Merkle HP. Phagocytosis of poly(L-lysine)-graft-poly (ethylene glycol) coated microspheres by antigen presenting cells: Impact of grafting ratio and poly (ethylene glycol) chain length on cellular recognition. *Biointerphases* 2006;1:123–33. <https://doi.org/10.1116/1.2409645>.
- [13] Sun M, Deng J, Tang Z, Wu J, Li D, Chen H, et al. A correlation study of protein adsorption and cell behaviors on substrates with different densities of PEG chains. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014;122:134–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.041>.
- [14] Zhou G, Ma C, Zhang G. Synthesis of polyurethane-g-poly(ethylene glycol) copolymers by macroiniferter and their protein resistance. *Polym Chem* 2011;2:1409. <https://doi.org/10.1039/c1py00016k>.
- [15] Ma Y, Zhang W, Wang Z, Wang Z, Xie Q, Niu H, et al. PEGylated poly(glycerol sebacate)-modified calcium phosphate scaffolds with desirable mechanical behavior and enhanced osteogenic capacity. *Acta Biomater* 2016;44:110–24. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.023>.
- [16] Alibeik S, Zhu S, Yau JW, Weitz JJ, Brash JL. Modification of Polyurethane with Polyethylene Glycol–Corn Trypsin Inhibitor for Inhibition of Factor XIIa in Blood Contact. *J Biomater Sci Polym Ed* 2012;23:1981–93. <https://doi.org/10.1163/092050611X603250>.
- [17] Dennes TJ, Schwartz J. Controlling cell adhesion on polyurethanes. *Soft Matter* 2008;4:86–9. <https://doi.org/10.1039/B714947F>.
- [18] Xu L-C, Siedlecki CA. Protein adsorption, platelet adhesion, and bacterial adhesion to polyethylene-glycol-textured polyurethane biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2017;105:668–78. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33592>.
- [19] Ma N, Cao J, Li H, Zhang Y, Wang H, Meng J. Surface grafting of zwitterionic and PEGylated cross-linked polymers toward PVDF membranes with ultralow protein



- adsorption. *Polymer (Guildf)* 2019;167:1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.01.053>.
- [20] Wendels S, Avérous L. Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioact Mater* 2021;6:1083–106. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.10.002>.
- [21] Yu S, Shi J, Liu Y, Si J, Yuan Y, Liu C. A mechanically robust and flexible PEGylated poly(glycerol sebacate)/ $\beta$ -TCP nanoparticle composite membrane for guided bone regeneration. *J Mater Chem B* 2019;7:3279–90. <https://doi.org/10.1039/C9TB00417C>.
- [22] Wang Y, Wu H, Wang Z, Zhang J, Zhu J, Ma Y, et al. Optimized Synthesis of Biodegradable Elastomer PEGylated Poly(glycerol sebacate) and Their Biomedical Application. *Polymers (Basel)* 2019;11:965. <https://doi.org/10.3390/polym11060965>.
- [23] Charras G, Sahai E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:813–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3897>.
- [24] Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, et al. Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chem Rev* 2017;117:12764–850. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00094>.
- [25] Sundberg C, Rubin K. Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 1996;132:741–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.4.741>.
- [26] Nishida-Aoki N, Gujral TS. Emerging approaches to study cell-cell interactions in tumor microenvironment. *Oncotarget* 2019;10:785–97.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26585>.
- [27] Tan S, Tan HT, Chung MCM. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 2008;8:3924–32. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800597>.
- [28] Porter JC, Hogg N. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 1998;8:390–6. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01344-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01344-0).
- [29] Watt FM, Huck WTS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol 2013;14:467–73. <https://doi.org/10.1038/nrm3620>.
- [30] Sisakhtnezhad S, Alimoradi E, Akrami H. External factors influencing mesenchymal stem cell fate in vitro. *Eur J Cell Biol* 2017;96:13–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.11.003>.
- [31] Cataldi A. Cell Responses to Oxidative Stressors. *Curr Pharm Des* 2010;16:1387–95. <https://doi.org/10.2174/138161210791033969>.
- [32] Kinsella JE. Lipids, Membrane Receptors, and Enzymes: Effects of Dietary Fatty Acids. *J Parenter Enter Nutr* 1990;14:200S-217S. <https://doi.org/10.1177/014860719001400511>.
- [33] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* (80- ) 2002;295:1014–7. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [34] Guillame-Gentil O, Semenov O, Roca AS, Groth T, Zahn R, Vörös J, et al. Engineering the Extracellular Environment: Strategies for Building 2D and 3D Cellular Structures. *Adv Mater* 2010;22:5443–62. <https://doi.org/10.1002/adma.201001747>.
- [35] Aricescu AR, Jones EY. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:543–50. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.010>.
- [36] Luo B-H, Carman C V., Springer TA. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol* 2007;25:619–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>.
- [37] Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. *Tissue engineering*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2007.
- [38] Blitterswijk C Van, Boer J De. *Tissue Engineering*. vol. 2. 2nd ed. United States of America: Academic Press; 2014.
- [39] Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 2006;273:4377–89. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05437.x>.
- [40] SMITH C. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:S375–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.030>.

- [41] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL, Hill C. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors : The Role of Integrins , Cadherins , Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules , and Selectins. *Pharmacol Rev* 1998;50:197–264.
- [42] Schneider G, Burrige K. Formation of Focal Adhesions by Osteoblasts Adhering to Different Substrata 1994;264–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.1994.1257>.
- [43] Hoshiba T, Yoshihiro A, Tanaka M. Evaluation of initial cell adhesion on poly ( 2-methoxyethyl acrylate ) ( PMEA ) analogous polymers. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017;5063. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1312738>.
- [44] Felgueiras HP, Antunes JC, Martins MCL, Barbosa MA. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. Elsevier Ltd.; 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00001-2>.
- [45] Schakenraad JM, Busscher HJ, Wildevuur CRH, Arends J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J Biomed Mater Res* 1986;20:773–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.820200609>.
- [46] Hallab NJ, Bundy KJ, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *TISSUE Eng* 2001;7:55–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/107632700300003297>.
- [47] Horbett TA, Schway MB, Ratner BD. Hydrophilic-hydrophobic copolymers as cell substrates: Effect on 3T3 cell growth rates. *J Colloid Interface Sci* 1985;104:28–39. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(85\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(85)90006-2).
- [48] Khang G, Rhee JM, Lee JH, Lee I, Lee HB. Interaction of different types of cells on poly(L-lactide-co-glycolide) surface with wettability chemogradient. *Korea Polym J* 2000;8:276–84.
- [49] van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities.

- Biomaterials 1985;6:403–8. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(85\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(85)90101-2).
- [50] van Wachem PB, Hogt AH, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, et al. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials* 1987;8:323–8. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(87\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(87)90001-9).
- [51] 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* 2007;28:3074–82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.013>.
- [52] Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004;25:5947–54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.062>.
- [53] Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res Part A* 2003;66A:247–59. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10537>.
- [54] Tidwell CD, Ertel SI, Ratner BD, Tarasevich BJ, Atre S, Allara DL. Endothelial Cell Growth and Protein Adsorption on Terminally Functionalized, Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *Langmuir* 1997;13:3404–13. <https://doi.org/10.1021/la9604341>.
- [55] Mcclary KB, Ugarova T, Grainger DW. Modulating fibroblast adhesion , spreading , and proliferation using self-assembled monolayer films of alkylthiolates on gold. *J Biomed Mater Res An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater* 2000;50:428–39. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000605\)50:3<428::AID-JBM18>3.0.CO;2-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<428::AID-JBM18>3.0.CO;2-H).
- [56] Scotchford CA, Cooper E, Leggett GJ, Downes S. Growth of human osteoblast-like cells on alkanethiol on gold self-assembled monolayers : The effect of surface chemistry. *John Wiley Sons* 1998;41:431–42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980905\)41:3<431::AID-JBM13>3.0.CO;2-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<431::AID-JBM13>3.0.CO;2-L).
- [57] Faucheux N, Schwiess R, Lützow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with

- different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 2004;25:2721–30. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.069>.
- [58] Li D, Zheng Q, Wang Y, Chen H. Combining surface topography with Polymer Chemistry: exploring new interfacial biological phenomena. *Polym Chem* 2013;5:14–24. <https://doi.org/10.1039/c3py00739a>.
- [59] Nguyen AT, Sathe SR, Yim EKF. From nano to micro: Topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J Phys Condens Matter* 2016;28. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/18/183001>.
- [60] Harrison RG. The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study. *Anat Rec* 1912;6:181–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.1090060404>.
- [61] Hoch HC, Staples RC, Whitehead B, Comeau J, Wolf ED. Signaling for Growth Orientation and Cell Differentiation by Surface Topography in *Uromyces*. *Science* (80- ) 1987;235:1659–62. <https://doi.org/10.1126/science.235.4796.1659>.
- [62] Ponsonnet L, Comte V, Othmane A, Lagneau C, Charbonnier M. Effect of surface topography and chemistry on adhesion , orientation and growth of fibroblasts on nickel – titanium substrates. *Mater Sci Eng C* 2002;21:157–65. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00097-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00097-8).
- [63] Chen L, Xie Z, Gan T, Wang Y, Zhang G, Mirkin CA, et al. Biomimicking Nano-Micro Binary Polymer Brushes for Smart Cell Orientation and Adhesion Control. *Small* 2016;12:3400–6. <https://doi.org/10.1002/smll.201600634>.
- [64] Abagnale G, Steger M, Hoa V, Hersch N, Sechi A, Joussem S, et al. Biomaterials Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials* 2015;61:316–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.030>.
- [65] Odian G, others. *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons; 2004.
- [66] Skarja GA, Woodhouse KA. Structure-Property Relationships of Degradable Polyurethane Elastomers Containing an Amino. *J Appl Polym Sci* 2000;75:1522–34. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(20000321\)75:12<1522::AID-](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(20000321)75:12<1522::AID-)

APP11>3.0.CO;2-A.

- [67] Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical Applications of Polyurethanes: A Review of Past Promises, Present Realities, and a Vibrant Future. *J Biomater Appl* 1999;14:67–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/088532829901400104>.
- [68] Hasirci N, Hasirci V. *BIOMATERIALS From Molecules to Engineered Tissues*. Springer Science & Business Media; 2010.
- [69] Barrioni BR, Carvalho SM De, Lambert R, Aline A, Oliveira R De, Pereira MDM. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 2015;52:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>.
- [70] Chung T, Liu D, Wang S, Wang S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials* 2003;24:4655–61. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00361-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00361-2).
- [71] Bergmeister H, Seyidova N, Schreiber C, Strobl M, Grasl C, Walter I, et al. Biodegradable , thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *ACTA Biomater* 2015;11:104–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.003>.
- [72] Adipurnama I, Yang M, Butruk-raszeja B. Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review. *Biomater Sci* 2017;5:22–37. <https://doi.org/10.1039/c6bm00618c>.
- [73] Pinto PAS, Kaiser PFJ. Improving cell adhesion : development of a biosensor for cell behaviour monitoring by surface grafting of sulfonic groups onto a thermoplastic polyurethane. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25:2017–26. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5233-1>.
- [74] Freij-Larsson C, Wesslén B. Grafting of polyurethane surfaces with poly(ethylene glycol). *J Appl Polym Sci* 1993;50:345–52. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070500215>.
- [75] Noorisafa F, Razmjou A, Emami N, Low Z, Korayem H, Kajani AA. Surface modification of polyurethane via creating a biocompatible superhydrophilic nanostructured layer : role of surface chemistry and structure. *J Exp Nanosci* 2016;11:1087–109.

<https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1188223>.

- [76] Park KD, Suzuki K, Kyu Lee W, Eun Lee J, Ha Y, Sakurai Y, et al. Platelet Adhesion and Activation of Polyethylene Glycol Modified Polyurethane Surfaces. *ASAIO J (American Soc Artif Intern Organs)* 1992;42:M876-81.
- [77] Wang W, Wang C. Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments. *Des. Manuf. Med. Devices, Elsevier*; 2012, p. 115–51.  
<https://doi.org/10.1533/9781908818188.115>.
- [78] Zhou X, Zhang T, Guo D, Gu N. A facile preparation of poly(ethylene oxide)-modified medical polyurethane to improve hemocompatibility. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2014;441:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.070>.
- [79] Zhou X, Zhang T, Jiang X, Gu N. The surface modification of medical polyurethane to improve the hydrophilicity and lubricity: The effect of pretreatment. *J Appl Polym Sci* 2009:NA-NA. <https://doi.org/10.1002/app.31499>.
- [80] Shih T-Y, Yang J-D, Chen Y-H, Hong C-W, Yang M-J, Chen J-H. DEVELOPMENT OF PEG-CONTAINING BRUSH COPOLYMER: THEIR EFFECT ON RESISTANCE TO PROTEIN ADSORPTION BEHAVIORS. *Biomed Eng Appl Basis Commun* 2013;25:1340008. <https://doi.org/10.4015/S1016237213400085>.
- [81] Røn T, Javakhishvili I, Jeong S, Jankova K, Lee S. Low friction thermoplastic polyurethane coatings imparted by surface segregation of amphiphilic block copolymers. *Colloid Interface Sci Commun* 2021;44:100477.  
<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100477>.
- [82] Chen K, Zhou S, Wu L. Self-repairing nonfouling polyurethane coatings via 3D-grafting of PEG-b-PHEMA-b-PMPC copolymer. *RSC Adv* 2015;5:104907–14.  
<https://doi.org/10.1039/C5RA22596E>.
- [83] Jung IK, Bae JW, Choi WS, Choi JH, Park KD. Surface Graft Polymerization of Poly(ethylene glycol) Methacrylate onto Polyurethane via Thiol–Ene Reaction: Preparation and Characterizations. *J Biomater Sci Polym Ed* 2009;20:1473–82.  
<https://doi.org/10.1163/092050609X12457419024109>.

- [84] Jiang Z, Feng X, Zou H, Xu W, Zhuang X. Poly(l-glutamic acid)-cisplatin nanoformulations with detachable PEGylation for prolonged circulation half-life and enhanced cell internalization. *Bioact Mater* 2021;6:2688–97. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.034>.
- [85] Tang GP, Zeng JM, Gao SJ, Ma YX, Shi L, Li Y, et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. *Biomaterials* 2003;24:2351–62. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00029-2).
- [86] Cai L, Wang K, Wang S. Poly(ethylene glycol)-grafted poly(propylene fumarate) networks and parabolic dependence of MC3T3 cell behavior on the network composition. *Biomaterials* 2010;31:4457–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.020>.
- [87] MAO S, SHUAI X, UNGER F, WITTMAR M, XIE X, KISSEL T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials* 2005;26:6343–56. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.036>.
- [88] Kasáľková N, Makajová Z, Pařízek M, Slepíčka P, Kolářová K, Bačáková L, et al. Cell Adhesion and Proliferation on Plasma-Treated and Poly(ethylene glycol)-Grafted Polyethylene. *J Adhes Sci Technol* 2010;24:743–54. <https://doi.org/10.1163/016942409X12579497420762>.
- [89] McCafferty E, Wightman JP. Determination of the acid-base properties of metal oxide films and of polymers by contact angle measurements. *J Adhes Sci Technol* 1999;13:1415–36. <https://doi.org/10.1163/156856199X00569>.
- [90] Gudipati CS, Finlay JA, Callow JA, Callow ME, Wooley KL. The antifouling and fouling-release performance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly(ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga *Ulva*. *Langmuir* 2005;21:3044–53. <https://doi.org/10.1021/la048015o>.
- [91] Mattia J, Painter P. A Comparison of Hydrogen Bonding and Order in a Polyurethane and Poly(urethane-urea) and Their Blends with Poly(ethylene glycol). *Macromolecules* 2007;40:1546–54. <https://doi.org/10.1021/ma0626362>.



- [92] Zimmerer C, Nagel J, Steiner G, Heinrich G. Nondestructive Molecular Characterization of Polycarbonate–Polyvinylamine Composites after Thermally Induced Aminolysis. *Macromol Mater Eng* 2016;301:648–52. <https://doi.org/10.1002/mame.201500419>.
- [93] Guignot C, Betz N, Legendre B, Le Moel A, Yagoubi N. Degradation of segmented poly(etherurethane) Tecoflex® induced by electron beam irradiation: Characterization and evaluation. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms* 2001;185:100–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)00850-3](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(01)00850-3).
- [94] Shufen L, Zhi J, Kaijun Y, Shuqin Y, Chow WK. Studies on the thermal behavior of polyurethanes. *Polym - Plast Technol Eng* 2006;45:95–108. <https://doi.org/10.1080/03602550500373634>.
- [95] Chao YC, Su SK, Lin YW, Hsu WT, Huang KS. Interfacial properties of polyethylene glycol/vinyltriethoxysilane (PEG/VTES) copolymers and their application to stain resistance. *J Surfactants Deterg* 2012;15:299–305. <https://doi.org/10.1007/s11743-011-1311-2>.
- [96] Gudipati CS, Finlay JA, Callow JA, Callow ME, Wooley KL. The antifouling and fouling-release performance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly(ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga *Ulva*. *Langmuir* 2005;21:3044–53. <https://doi.org/10.1021/la048015o>.
- [97] Good RJ, van Oss CJ. The Modern Theory of Contact Angles and the Hydrogen Bond Components of Surface Energies. *Mod Approaches to Wettability* 1992:1–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1176-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1176-6_1).
- [98] Chu C, Deng J, Hou Y, Xiang L, Wu Y, Qu Y, et al. Application of PEG and EGCG modified collagen-base membrane to promote osteoblasts proliferation. *Mater Sci Eng C* 2017;76:31–6. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.157>.
- [99] Mîndroiu M, Pîrvu C, Cîmpean A, Demetrescu I. Corrosion and biocompatibility of PPy/PEG coating electrodeposited on Ti6Al7Nb alloy. *Mater Corros* 2013;64:926–31. <https://doi.org/10.1002/maco.201106480>.
- [100] Yu G, Ji J, Shen J. Synthesis and characterization of cholesterol-poly(ethylene glycol)-

- poly(D,L-lactic acid) copolymers for promoting osteoblast attachment and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:899–909. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0188-5>.
- [101] Piotrowski P, Klimek K, Ginalska G, Kaim A. Beneficial Influence of Water-Soluble PEG-Functionalized C60 Fullerene on Human Osteoblast Growth In Vitro. *Materials (Basel)* 2021;14:1566. <https://doi.org/10.3390/ma14061566>.
- [102] Galow A-M, Rebl A, Koczan D, Bonk SM, Baumann W, Gimsa J. Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. *Biochem Biophys Reports* 2017;10:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.001>.
- [103] Kaysinger KK, Ramp WK. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem* 1998;68:83–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19980101\)68:1<83::AID-JCB8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980101)68:1<83::AID-JCB8>3.0.CO;2-S).
- [104] Sadeghpour M, Yusoff R, Aroua MK, Tabandeh M. Modification of polyethylene glycol with choline chloride and evaluation of the CO<sub>2</sub> absorption capacity of their aqueous solutions. *Greenh Gases Sci Technol* 2018;8:324–34. <https://doi.org/10.1002/ghg.1741>.
- [105] Yang L, Tian Z, Zhang X, Wu X, Wu Y, Wang Y, et al. Enhanced CO<sub>2</sub> selectivities by incorporating CO<sub>2</sub>-philic PEG-POSS into polymers of intrinsic microporosity membrane. *J Memb Sci* 2017;543:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.08.050>.
- [106] Lee B-S. Effect of specific interaction of CO<sub>2</sub> with poly(ethylene glycol) on phase behavior. *J CO<sub>2</sub> Util* 2018;28:228–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.002>.
- [107] Aschenbrenner O, Styring P. Comparative study of solvent properties for carbon dioxide absorption. *Energy Environ Sci* 2010;3:1106. <https://doi.org/10.1039/c002915g>.
- [108] Bumke MA, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by extracellular pH variations in human fibroblasts: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* 2003;3:675–88. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300395>.
- [109] Jones EM, Cochrane CA, Percival SL. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Adv Wound Care* 2015;4:431–9. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0538>.
- [110] Cutaia M, Black AD, Cohen I, Cassai ND, Sidhu GS. Alkaline stress-induced apoptosis in

human pulmonary artery endothelial cells. *Apoptosis* 2005;10:1457–67.  
<https://doi.org/10.1007/s10495-005-1402-5>.

- [111] Lie SO, Schofield BH, Taylor HA, Doty SB. Structure and Function of the Lysosomes of Human Fibroblasts in Culture: Dependence on Medium pH. *Pediatr Res* 1973;7:13–9.  
<https://doi.org/10.1203/00006450-197301000-00003>.
- [112] Schreiber R. Ca<sup>2+</sup> Signaling, Intracellular pH and Cell Volume in Cell Proliferation. *J Membr Biol* 2005;205:129. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0778-z>.
- [113] Nitschke R, Riedel A, Ricken S, Leipziger J, Benning N, Fischer K-G, et al. The effect of intracellular pH on cytosolic Ca<sup>2+</sup> in HT 29 cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1996;433:98–108. <https://doi.org/10.1007/s004240050254>.
- [114] Naffah de Souza C, Breda LCD, Khan MA, Almeida SR de, Câmara NOS, Swezey N, et al. Alkaline pH Promotes NADPH Oxidase-Independent Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Matter of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Citrullination and Cleavage of Histone. *Front Immunol* 2018;8.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>.
- [115] Santo-Domingo J, Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2010;1797:907–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.005>.
- [116] Matsuyama S, Reed JC. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ* 2000;7:1155–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400779>.
- [117] Zhao T, Wu W, Sui L, Huang Q, Nan Y, Liu J, et al. Reactive oxygen species-based nanomaterials for the treatment of myocardial ischemia reperfusion injuries. *Bioact Mater* 2022;7:47–72. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.006>.