



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN, DEGRADACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE POLI(URETANO UREA)S SEGMENTADOS BIODEGRADABLES A BASE DE AMINOÁCIDOS

Tesis que presenta LERMA HANAIY CHAN CHAN

En opción al título de DOCTOR EN CIENCIAS DE MATERIALES POLIMÉRICOS

> Directores de Tesis Juan Valerio Cauich Rodríguez



Centro de Invastigación Clentífica de Yucatén: A.C. Posquado en Materiales Poliméricos

SINTESIS, CARACTERIZACIÓN, DEGRADACIÓN Y EVALUACIÓN BIOI ÓGICA DE POLI(URETANO UREA)S SEGMENTADOS BIODEGRADABLES A BASE DE AMINOÁCIDOS

> Tesis que presenta L'ERMA HANAIY CHAN CHAN

En opción al título de JOCTOR EN CIENCIAS DE MATERIALES POLIMÈRICOS

> Directores de Teste Juran Valerio Caulch Rodrigue José Manuel Cervantes Uc



Mérida, Yucatán, México; a 25 de Julio de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Lerma⁴Hanaiy Chan Chan

Mérica, Yucalan, Maximor, a 25 de Julio de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección do Moterialna y Attecidos Experimentaires, los Resultados y Discusión de este documento provene da las reminitades de este entremación realizadas durmite el periodo que se me salorió pera terminitades de securitadas de Vuscian A.C. y que a racon da lo amarca y en nou rigación. Científica de Vuscian A.C. y que a racon da lo amarca y en información, en los servicios aducativos o de apoyo que me fueron brindados durba información, en terminos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Loy de la Propietado información, en terminos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Loy de la Propietado información, en terminos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Loy de la Propietado información, en terminos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Loy de la Propietado información de lo yo mandestado reconocolo que de lovalidador. Por otin información Científica A.C. y en el mismo terror, recunozo que si ormana al Centro de lo información Científica A.C. y en el mismo terror, recunozo que si ormana al Centro de la inteles tuales o deserminos ferminos terror de la pertenecen partimiente al Centro de la intelestuales intelectuales o deserrolício terrológicos en lo especial activar de lo entre la contenta en la facor do la copuesión nector terrológicos en lo especial actos se lagitan en trans caro norducos intelectuales o deserrolícios terrológicos en lo especial actos se lagitan en transition de la portecto de la copuesión en la prusente de la contenta de la entrad langetria en el terror do lo copuesión en la prusente de la Artur y la Ley de la entradición de la copuesión en la prusente de la deservición de la entrad langetria en el terror do lo copuesión en la prusente de actor.

Enole et.

Lerma^{*}Hanaiy Chan



RECONOCIMIENTO

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

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN, DEGRADACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE POLI(URETANO UREA)S SEGMENTADOS BIODEGRADABLES A BASE DE AMINOÁCIDOS

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

Atentamente,

Dr. Osear A. Moreno Valenzuela

Director Académico Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

RECONOCIMIENTO

Por modio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis Utulado

SÍNTESTE CARACTERIZACIÓN, DEGRADACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE POLI(URETANO UREA)S SEGMENTADOS BIOTEGRADABLES A BASE DE AMINOÁCIDOS

pertenecionte ai Programa de Doctorado en Clencias (Materiales Polimetricos) del Centro de Investigación Clentifica de Vucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales hajo la dirección del Dr. Juao Valerio Canich Rodríguez y del Dr. José Munuel Corvantes Uc.

Dr. Oscar & Moreno Valenzaela

Director Académico Centro de Juvestigación Científica do Vucatio. A

DEDICATORIAS

A mi Dios Jehová,

por darme las fuerzas para levantarme cada día.

A mis hijos David y Hania,

por impulsar mi vida y por comprender mi ausencia.

A mis padres Mª Reyes y Antonio,

por su gran apoyo y amor.

A mis hermanos Maribel y Daniel,

por sus consejos y por darme ánimos cuando lo necesitaba.

A mis sobrinos y amigos,

por alegrar mi vida.

Nes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado mediante la beca 14614 y los proyectos 79371 y 123913.

To the ministry of international relations of Quebec (Ministère des relations internationales du Québec) (JOOO.0463) for funding the exchange program between México and Quebec.

A mis directores de tesis, Dr. Juan Valerio Cauich Rodriguez y José Manuel Cervantes Uc, por su gran apoyo y sus valiosos consejos.

A mis tutores, Dr. Eduardo Báez y Dra. Liliana Alzate y a mi honorable comité revisor, Dr. Julio San Román, Dr. Raúl Solís, Dr. Manuel Aguilar, Dr. Fernando Hernández por sus valiosos comentarios.

To Dr. Maryam Tabrizian for her invaluable support and advices; moreover, to be in her team for a short time was a great experience for my career and my life.

To Dr. Cathy Tkaczyk for teaching me cell culture patiently, her advices to organize my work and her collaboration in cytotoxicity test and hemocompatibility.

To Dr. Yahyé Merhi from Montreal Heart Institute for the facilities to platelet adhesion studies and Dr. Frederick Morin from McGill NMR facility.

A Rossana F. Vargas Coronado por su apoyo técnico en los estudios de caracterización de los materiales y Wilberth Herrera, Hugo Carrillo, Maria Isabel Loría, Javier Cauich y Alejandro May por la asesoría y consejos en el uso de los equipos utilizados.

Al Dr. José Luis Santiago por su apoyo y asesoría en la determinación de masa molecular por GPC, a la Dra. Patricia Quintana y al Dr. Oscar Ceh, por su apoyo para la obtención de los espectros de DRX e imágenes de AFM.

A mis compañeros de laboratorio, Laura, Olga, Saidy, Adrian, Celín y Alejandra por enriquecer mi trabajo por medio su experiencia e ideas.

ÍNDICE

ÍNDICE		I
LISTADO	DE TABLAS	vii
LISTADO	DE FIGURAS	ix
GLOSAR	IO DE TÉRMINOS	xv
RESUME	Ν	1
ABSTRA	ст	3
INTRODU	JCCIÓN	5
HIPÓTES	NS	7
OBJETIV	OS	9
CAPÍTUL	O 1. ANTECEDENTES	11
1.1 En	fermedades Cardiovasculares	11
1.2 Inj	ertos vasculares	12
1.2.1	Injertos vasculares autólogos	12
1.2.2	Injertos vasculares sintéticos	13
1.2.3	Injertos vasculares biodegradables	16
1.2.4	Consideraciones en el diseño de materiales usados como inje	rtos
vascula	ires	17
1.3 He	mocompatibilidad	
1.3.1	Métodos para evitar o minimizar la adhesión plaquetaria	
1.3.1	.1 Disminución de la hidrofilicidad	
1.3.1	.2 Recubrimiento con materiales naturales	

i

	1.3.1.3	Inmovilización de moléculas que interfieren con la vía trombolítica	a.21
	1.3.1.4	Sistemas de liberación de óxido nítrico	22
	1.3.1.5	Estimulación para la formación de una monocapa endotelial	22
1.4	Poliu	iretanos para regeneración de vasos sanguíneos	24
1	.4.1 (Química de los poliuretanos segmentados	25
1	.4.2	Biodegradabilidad de los poliuretanos	27
	1.4.2.1	Segmento flexible biodegradable	28
	1.4.2	.1.1 Propiedades de la policaprolactona (PCL)	28
	1.4.2.2	Segmento rígido biodegradable	29
1	.4.3 (Células y moléculas de señalización	32
. 1	.4.4 F	Factores que promueven la adhesión celular	33
CA	PÍTULO Mate	2. PARTE EXPERIMENTAL	35
2.2	Sínte	esis de los poli (uretano ureas) segmentados (PUUS)	36
2.3	Cara	cterización fisicoquímica y superficial	38
2	2.3.1 E	Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	39
2	2.3.2	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	39
2	2.3.3 [Difracción de rayos X (DRX)	39
2	2.3.4	Ángulo de contacto	39
1	2.3.5 1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	39
2	2.3.6	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	40
1	2.3.7 (Caracterización térmica	40
	2.3.7.1	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	40
	2.3.7.2	Análisis Termogravimétrico (TGA)	40
	2.3.7.3	Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	41
2	2.3.8 (Caracterización mecánica	41

ii

2	.3.9	Determinación de los pesos moleculares	. 41
2.4	Estu	dios de Degradación	. 41
· 2	.4.1	Degradación en Buffer de fosfato salino	. 41
2	.4.2	Degradación acelerada	. 42
2.5	Prue	bas de hemocompatibilidad	. 43
2	.5.1	Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa	
(Método	de Lee-White)	. 43
2	.5.2	Adhesión de plaquetas radiomarcadas	. 43
	2.5.2.1	Radiomarcaje de plaquetas	. 43
	2.5.2.2	Cuantificación de plaquetas adheridas	. 44
	2.5.2.3	Morfología de las plaquetas adheridas	. 45
2.6	Cito	compatibilidad	. 45
2	.6.1	Cultivos Celulares	. 45
2	.6.2	Citotoxicidad de extractos	. 46
	2.6.2.1	Obtención de extractos a pH fisiológico	. 46
	2.6.2.2	Preparación de extractos con productos de degradación	. 46
	2.6.2.3	Ensayos de Citotoxicidad	. 47
	2.6.2.4	Determinación de viabilidad celular por la prueba MTT	. 47
2	.6.3	Citocompatibilidad en contacto directo	. 49
	2.6.3.1	Preparación de las superficies	. 50
	2.6.3.2	Pruebas de adhesión celular	. 50
	2.6.3.3	Pruebas de proliferación celular	. 51
	2.6.3.4	Cuantificación de la adhesión y proliferación celular	. 51
	2.6.3.5	Microscopía celular	. 52
2	.6.4	Análisis estadístico	. 52
CA	PÍTULO	3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	. 53

3.1 Sí	ntesis de los poli(uretano ureas) segmentados (PUUS)	53
3.2 Ca	aracterización química y superficial	56
3.2.1	Solubilidad	56
3.2.2	RMN	56
3.2.3	FTIR	58
3.2.4	MEB y EDX	63
3.2.5	AFM	65
3.2.6	Ángulo de Contacto	67
3.2.7	Difracción de rayos X (DRX)	68
3.3 Ca	aracterización térmica	69
3.3.1	DSC	69
3.3.2	DMA	71
3.3.3	TGA	71
3.4 Ca	aracterización mecánica	73
3.5 Pe	esos moleculares	76
3.6 De	egradación	77
3.6.1	Degradación en Buffer	77
3.6.1	1.1 Absorción de agua y pérdida de masa	77
3.6.1	1.2 Variación del peso molecular	79
3.6.2	Degradación acelerada	81
3.6.2	2.1 Pérdida de masa	82
3.6.2	2.2 Caracterización por FTIR de los residuos de degradación	83
3.7 En	nsayos de biocompatibilidad	86
3.7.1	Hemocompatibilidad	86
3.7.1	1.1 Tiempos de coagulación con sangre completa (Lee-White)	87
3.7.1	1.2 Adhesión de plaquetas radiomarcadas	88

3.7.2 0	Citocompatibilidad
3.7.2.1	Citotoxicidad de extractos
3.7.2.2	Citotoxicidad de los productos de degradación sobre HUVECs 93
3.7.2.3	Adhesión de HUVECs
3.7.2.4	Proliferación de HUVECs
CONCLUSI	ONES 103
PERSPECT	IVAS 105
BIBLIOGRA	FÍA 107
Apendice A	. Propiedades del Tecoflex [®] 127
Apendice B	. Publicaciones 129

<

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1-I. Reactividad de isocianatos ⁵⁷
Tabla 1-II. Propiedades de la PCL ^{71, 72}
Tabla 1-III. Diisocianatos comúnmente usados para la síntesis de poliuretanos ⁷⁸ .30
Tabla 2-I. Aminoácidos utilizados en la síntesis de los poli(urea uretanos) segmentados
Tabla 3-I. Propiedades térmicas de los PUUS 70
Tabla 3-II Propiedades mecánicas de los PUUS
Tabla 3-III Pesos moleculares y polidispersidad de los PUUS sintetizados
Tabla 3-IV Porcentaje (%) de pérdida de masa por la degradación de PUUS 82
Tabla 3-V. Resumen de las propiedades del Tecoflex [®] relevantes para su uso en
aplicaciones cardiovasculares 127

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Revascularización utilizando un injerto sintético de ePTFE (imagen
tomada de "general thoracic surgery ⁸ ") 11
Figura 1.2. Extracción y utilización de vena safena como injerto vascular ¹² 13
Figura 1.3. Injertos vasculares comerciales a base de A) Dacron y B) PTFE ¹⁶ . 14
Figura 1.4. Árbol metafórico que muestra la relación entre la ciencia de los
materiales con sus raíces (la ciencia y la tecnología) y sus ramas que representan
la medicina clínica. Tomado de '2011 panel on developing a biomaterials curriculum' ²⁹
Figura 1.5. Esquema simplificado de las interacciones sangre-material que se da
después de la adsorción de proteína ³¹
Figura 1.6. Plaquetas con diferentes grados de activación. Imágenes obtenidas
mediante microscopio electrónico de barrido por Fatisson <i>et. al.</i> ³⁴ 20
Figura 1.7. Micrografía de la agregación plaquetaria sobre el poliuretano comercial Pelletano [®] después de 1 hora en contacto con plasma rico en plaquetas obtenida por Hsu <i>et. al</i> ³⁷
Figura 1.8. Representación esquemática de los estados de las células sobre los materiales ⁵²
Figura 1.9. Funciones del endotelio ⁵³ 23
Figura 1.10. Componentes para la regeneración de tejido vascular
Figura 1.11. Esquema de los poliuretanos segmentados
Figura 1.12. Esquema de las reacciones principales en la síntesis de los poliuretanos segmentados para aplicaciones médicas ^{58, 60}
Figura 1.13. Reacciones secundarias durante la síntesis de poliuretanos
segmentados"

Figura 1.14.	Vía de degradación de materiales los poliméricos dependiendo de
su naturaleza	⁶³
Figura 1.15.	Estructura química de la PCL
Figura 1.16.	Extensores de cadena derivados de: A) Tirosina empleado por
Sarkar et. al.8	³⁰ y B) fenilalanina usado por Skarja y Woodhause ⁶⁶
Figura 2.1. b) HMDI, c hidroclorada,	Estructuras de los monómeros para la síntesis de PUUS, a) PCL diol,) Butanodiamina, d) L-arginina mono hidroclorada, e) Glicina y f) L-ácido aspártico
Figura 2.2.	Reacciones para la formación los PUUS
Figura 2.3.	Frascos de cultivo y células adheridas 45
Figura 2.4.	Contabilización de células. a) Hematocitómetro, b) Microscopio
invertido, c) c	uadricula del hematocitómetro magnificada47
Figura 2.5.	Reacción de reducción del reactivo MTT llevada a cabo en las
mitocondrias	de las células vivas
Figura 2.6.	Plato de cultivo previo a la medición de DO
Figura 3.1.	Enlaces urea (verde) y amida (azul) formados por la reacción entre
los extensore H ₁₂ MDI	es (butanodiamina:BDA, arginina:R, glicina:G y ácido aspártico:D) y
Figura 3.2.	Estructura lineal esperada de PUUS preparados con aminoácidos. 55
Figura 3.3. (Butanodiami	Espectros de A) 1H RMN y B)13C RMN de los poliuretanos. PUBDA na), PUR (Arginina), PUG (glicina), PUD (ácido aspártico)
Figura 3.4. y D) PUD	Espectros de FTIR de los poliuretanos. A) PUBDA, B) PUR, C) PUG
Figura 3.5. v carboxílicos	Tipos de enlace e interacciones por la reacción de hidroxilos, aminas con isocianatos

Listado de figuras

Figura 3.6. Ampliación de la región amida A en el espectro de infrarrojo de los poliuretanos
Figura 3.7. Ampliación de la región amida I en el espectro de infrarrojo de los poliuretanos
Figura 3.8. Compuestos modelo preparados a base de HMDI y extensor de cadena
Figura 3.9. Vista superficial de películas de PUBDA, PUR, PUG y PUD obtenidas mediante spin coating sobre un sustrato de vidrio
Figura 3.10. Vista superficial de películas de PUBDA, PUR, PUG y PUD obtenidas por evaporación de THF en un mólde de teflón
Figura 3.11. Topografía tridimensional y rugosidad (RSM) de la superficie de películas preparadas por 'spin coating' sobre un soporte de vidrio. A) PUBDA, B) PUR, C) PUG, D) PUD
Figura 3.12. Imágenes digitalizadas de una gota de agua y su respectivo ángulo de contacto en cada uno de los PUUS estudiados
Figura 3.13. Difractogramas de los poliuretanos sintetizados con PCL2000. PUBDA, PUR, PUG y PUD
Figura 3.14. Termogramas de DSC de los PUUS, primera y segunda corrida
Figura 3.15. Termogramas de DMA. a) Módulo de almacenamiento vs. Temperatura, b) Tangente delta vs temperatura
Figura 3.16. Termogramas de TGA, A) Masa residual, B) Derivada de la masa residual
Figura 3.17. Curvas esfuerzo vs. deformación representativas de los PUUS sintetizados con aminoácidos
Figura 3.18. Hidrólisis de los enlaces A) éster, B)uretano y c)urea ¹⁶¹

Figura 3.19.	Degradación en búfer de fosfato salino pH 7.4. A) Absorción de
agua, B)	Pérdida de masa
Figura 3.20.	Cromatogramas de GPC obtenidos de los residuos sólidos de la
degradación el	n buffer de fosfato salino, lavados y secados después de cada
intervalo de deg	gradación. A)PUBDA, B)PUR, C)PUG, D)PUD
Figura 3.21.	Masa molecular remanente, calculado a partir del peso molecular
de cada políme	ero sin degradar
Figura 3.22.	Espectros de FTIR de las muestras de PUUS degradados por
métodos aceler	ados. A)PUBDA, B)PUR, C)PUG y D)PUD
Figura 3.23.	Ampliación de la región 1700-800 cm ⁻¹ de los espectros de
infrarrojo de lo	os productos de la degradación oxidativa de los PUUS. A y B)
PUBDA, C y l	D) PUR, E y F) PUG, G y H) PIJD, de los cuales B, D, F y H
corresponden a	a los polímeros degradados
Figura 3.24.	Degradación oxidativa de enlaces éster
Figura 3.25.	Tiempos de coagulación con sangre completa. (*p<0.05 vs. PUUS
analizado por A	NOVA de una vía utilizando la prueba de Tukey)
Figura 3.26.	Cantidad de plaquetas radiomarcadas con ¹¹¹ In-oxina adheridas
sobre diferente	s PUUS
Figura 3.27. PRP	Micrografias por Feg-SEM de las superficies en contacto con
Figura 3.28. concentracione	Actividad de las células endoteliales en contacto con diferentes es de extractos de los PUUS
Figura 3.29.	Viabilidad relativa de HUVECs después de 24, 48 y 72 horas en
contacto con (productos de degradación a diferentes diluciones. a)1:0, b)1:10,
c)1:100, d)1:10	00

Listado de figuras

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ACR	Adhesión celular relativa
AFM	Microscopía de fuerza atómica por sus siglas en inglés
CE	Células endoteliales
Ст	Tiempo de coagulación
BDI	1,4-butanodiisocianato
DMA	Análisis dinámico mecánico
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
DO	Densidad óptica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés
ePTFE	Poli (tetrafluoroetileno) expandido por sus siglas en inglés
Feg-SEM	Microscópio electronico de barrido con cañón de emisión de campo
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GPC	Cromatógrafía de permeación en gel
HA	Hialuronan
HDI	Hexamentileno diisocianato
HMDI	4,4'-metilen bis(ciclohexilisocianato)
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano (por sus siglas en inglés)
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
LDI	Lisina diisocianato
LSGS	Suplemento de crecimiento bajo en suero
MDI	4,4'-metilendifenildiisocianato MEB Microscopía electrónica de
	barrido
MTT	3-(4,5-dimetiltiazo1-2-ilo)-2,5- difeniltetrazolio
Oct-sn	Octanoato de estaño ó Tin II etil hexanoato

PBS	Buffer de fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PDLys	Poli-D-Lisina
PEO	Poli(óxido de etileno)
PET	Poli (etilen) tereftalato
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRF	Libre de rojo fenol por sus siglas en inglés
PRP	Plasma rico en plaquetas
PUs	Poliuretanos
PUUS	Poli(uretano urea)s segmentados
rpm	revoluciones por minuto
RGD	secuencia polipeptídica arginina-glicina-ácido aspártico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSM	Valor cuadrático medio (por sus siglas en inglés)
SPUs	Poliuretanos segmentados
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
TDI	Tolueno diisocianato
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
VCR	Viabilidad celular relativa
Хс	Cristalinidad relativa
μCi	Micro curio, unidad de radiactividad

RESUMEN

Nuevos poli(uretano urea)s segmentados (PUUS) biodegradables fueron sintetizados utilizando un prepolímero a base de poli-ε-caprolactona diol (PCL) con 4,4'-metilen-bis-ciclohexildiisocianato (H₁₂MDI) y uno de los siguientes aminoácidos: L-arginina (de carácter básico), glicina (de carácter neutro) ó L-ácido aspártico (de carácter ácido) como extensor de cadena. La composición química fue confirmada por FTIR y RMN (¹H y ¹³C), mientras que la caracterización térmica y DRX mostraron la presencia de dominios cristalinos y una baja Tg; estas últimas características, contribuyeron a un típico comportamiento elastomérico, con deformaciones hasta de 1600% y resistencia máxima de hasta 37 MPa.

La degradación *in vitro* en buffer de fosfato salino bajo condiciones fisiológicas por 24 semanas fue lenta, aunque los PUUS con aminoácidos mostraron una degradación ligeramente más rápida. En contraste, los experimentos de degradación acelerada mostraron que los PUUS sintetizados son susceptibles a la degradación tanto hidrolítica como oxidativa.

Las pruebas con sangre completa y plaquetas radiomarcadas mostraron que los PUUS presentan una hemocompatibilidad aceptable. Además no se observó un efecto citotóxico de sus extractos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs, por sus siglas en inglés) para concentraciones clínicamente relevantes; adicionalmente, estas células tuvieron una buena adhesión a corto plazo sobre las superficies de estos polímeros, comparado con poli-D-lisina (PDLys). En conclusión el PUUS preparado con L-arginina mostró ser superior en términos biológicos ya que soportó altos niveles de adhesión, proliferación y viabilidad celular comparado con el Tecoflex[®], sugiriéndolo como candidato para ser utilizado en el diseño de injertos vasculares mediante ingeniería de tejidos.

RESUMEN

volves porquetare unals segmentados (PUUS) biodegredables haron menuados utilizando un orepolitmeno a base de poli-c-caproiadora dol (PCL) con el menuados utilizando un orepolitmeno a base de poli-c-caproiadora dol (PCL) con entre de carácter basco), giorna (de carácter neutro) à Lmenosodor. L'arginina (de carácter basco), giorna (de carácter neutro) à Lfeito aspartico (de carácter ácido) como extensor de carácter neutro) à Lquenico sus continuede por FTIR y RMN (¹H y ¹³C), mientria que la caracterización temica y ORX mostraron la presencia de dominios castatores y ma taja Tg. estas dilimas canacterísticas, contribuyeton a un úpico meterización temica y ORX mostraron la presencia de dominios castatores y materia taja Tg. estas dilimas canacterísticas, contribuyeton a un úpico

La degradación in vitro en tutter de fosfeto salino bajo condiciones falológi da por 24 sumanes fue tenta, aunque los PUUS con aminoácidos mostraren una degradación ligeramente más rápida. En contraste, los exprementos do duprosción ecelerada mostraron que los PUUS sintetizados son susceptibirs a la feurencion tanto hidratitica como exidativa.

Uni miséri con sangre complete y plaquetes radiomarcadas mostreron unit for "ULUE presentan una homocompatibilidad aceptable. Además no se observó un etello stotésico de suo extractor sobre células endotellales de corden umbilical la huma HUVECs, por sus siglas en inglés) para concentracional ofinicomunite remeutare adipantemente, estas células tuvieron una buena adi-estón n auto plaza atom las experiences de estos polimenos, comparado con pol-Ofisina (PULVa). En conclusión al PUCS preparado con L-erginica mostró ser subentor en inclus biológicos ya que sóportó altos niveles de adhesión, protención y equina de celular nomparado con el Tecofex", sugliciendolo como calendato plana en unizado en el diserio de intertos vasculares maciante ingeneras de telidos.

ABSTRACT

New biodegradable segmented poly(urethane urea)'s were synthesized using a prepolymer prepared with poli- ε -caprolactone diol and 4,4'-(methylen-bis-cyclohexyl)diisocyanate (H₁₂MDI) and different amino acids as chain extender such as L-arginine (alkaline), glycine (neutral) or L-aspartic acid (acidic). Their chemical composition were confirmed by FTIR and NMR (¹H y ¹³C), while thermal characterization and DRX showed crystalline domains and a low Tg, which contributes to their elastomeric behavior exhibiting deformations up to 1600% and a tensile strength of 37 MPa.

In vitro degradation on phosphate buffer saline (PBS) at physiological conditions during 24 weeks was slow although the presence of the amino acid in the PUUS slightly increased their degradation rate. In contrast, accelerated degradation tests showed that the PUUS synthesized were both hydrolitically and oxidative degradable.

Coagulation tests and platelet adhesion showed that the PUUS were hemocompatible. In addition, extracts of these PUUS were non cytotoxic on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at clinically rejevant concentrations. Further, HUVECs adhered well at the polymer surfaces after short times and this behavior was similar to poly-D-lysine (PDLys) controls.

In conclusion, L-arginine based PUUS was superior on biological terms since this polyurethane support higher levels of adhesion, spreading and cellular viability compared to Tecoflex[®]. This suggests that it can be used in the design of vascular grafts for tissue engineering.

ASSTRACT

Link piode radable segmented poly(institute unset)s were synthesized using a prepriyment propared with poli-a-caprolactone dial and 4,4-(methylenious and 4,4-(methylenious) and different amino acids as chain extender such as L-regime (alkaline) (phoine (neutral) or L-arphitic acid (coldic). Their dramical composition were confirmed by PTIR and NMR (¹H y ¹³C) while internal characteristication and DRX showed crystalline domains and a low Tg ration approximate to their elastomenic behavior exhibiting deformations up to 1000% and a tensor school of 37 MPa

In vitre degradation on phospitate buffer seline (PBS) at physiological conditions or any 24 weeks was slow although the presence of the amitto excluin the PUUG slightly incruised their degradation rate. In contrast, accelerated degradation tests showed that the PUUS synthesized were both hydrolitically and orderive usig to she

CoepitMont torus and platelet adhesion showed that me PUUS were herecompatible in addition, extracts of these PUUS were non cylistical on ruman units of very endothelial cells (HUVECs) at clinicely relevant concentrations. Further HUVECs adhered well at the polymer surfaces after short lines and this hereaver was similar to poly-2-tysine (PDLys) controls.

In unablasion, Largmine based PULS was superior on higlogical terms and high polyri rehate support higher reveils of adhesion, spreading and dedular viability compared to Tecoffee[®]. This suggests that it can be used in the design of varioular grafts for (issue angineering.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos biomateriales y la ingeniería de tejidos son dos enfoques que están siendo investigados para el desarrollo de injertos vasculares con propiedades adecuadas y un desempeño eficiente. Entre los materiales sintéticos, los poliuretanos segmentados constituyen una excelente opción en cuanto a propiedades mecánicas y características antitrombogénicas, además que por su inherente degradación puede ser considerado como candidato para ingeniería de tejidos¹. A pesar de que los poliuretanos tradicionales presentan pobres propiedades de fatiga, degradación no controlada y una pobre adhesión celular, la versatilidad en su síntesis permite mejorarlos y adecuarlos de acuerdo a las características deseadas².

Por lo tanto, el desarrollo de nuevos poliuretanos para la generación de injertos vasculares está encaminado a producir materiales bioactivos o biocooperativos que generen una capa de células endoteliales las cuales mimeticen al implante y restablezcan un medioambiente fisiológico aceptable, actuando como una barrera entre el biomaterial y la sangre hasta que el tejido sea restaurado por completo ³. Una estrategia que ha sido frecuentemente utilizada para mejorar la endotelización es el uso del polipéptido con la secuencia arginina-glicina-acido aspártico (RGD) ya que aún secuencias cortas pueden aumentar la adhesión y proliferación celular⁴.

Con base en lo anterior, este trabajo propone la síntesis de nuevos poliuretanos segmentados biodegradables por medio del uso de aminoácidos como la Larginina, glicina y el L-ácido aspártico), como extensores de cadena. Estos aminoácidos, al encontrarse naturalmente en el organismo, se espera que mejoren no solo su biocompatibilidad sino también su biodegradación al liberar productos no tóxicos para el cuerpo. Adicionalmente, los aminoácidos fueron elegidos con base a su habilidad para formar especies cargadas a diferentes pHs y que puedan promover la adhesión y proliferación de células endoteliales. Por lo tanto, los objetivos propuestos para esta tesis incluyeron la obtención de nuevos poli(uretano urea)s, su caracterización fisicoquímica y mecánica, estudios de degradación *in vitro* y su evaluación biológica de acuerdo a su potencial aplicación en la regeneración de injertos vasculares.

Esta tesis se encuentra estructurada con la presente introducción, hipótesis, objetivos y tres capítulos. El capítulo 1 contiene los antecedentes acerca de los beneficios y desventajas de los materiales usados actualmente como injertos vasculares, los requerimientos y el potencial de los poliuretanos para su uso en ingeniería de tejido vascular, así como las diferentes aproximaciones para el mejoramiento de éstos. El capítulo 2 comprende la metodología empleada en la síntesis y caracterización de los poli (uretano urea)s, las degradaciones llevadas a cabo y la evaluación biológica. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos y se discuten los factores involucrados en las propiedades elastoméricas obtenidas, el efecto de las propiedades fisicoquímicas y superficiales ante diferentes agentes degradantes y finalmente el desempeño biológico de cada PUUS sintetizado comparado con el Tecoflex[®] un poliuretano comercial y la poli-D-Lisina.

HIPÓTESIS

Los aminoácidos L-arginina, glicina y L-ácido aspártico pueden reaccionar con un prepolímero a base de H₁₂MDI y PCL diol, para producir poli(uretano urea)s segmentados con propiedades elastoméricas adecuadas, presentado una degradación controlada y buena biocompatibilidad (comparadas con el poliuretano comercial Tecoflex[®] y/o los vasos sanguíneos naturales) para su uso en aplicaciones biomédicas e ingeniería de tejidos.

HIPOTESIS

Los aminoscidos Liangininal glieina y Liécido aspártico pueden maccionar con en energilinareo a base de HigMDI y PCL dioL para producir poli(unitano unea)e ecomentatos con coopiedades elastoméricas adecuadas, presentado una degraté de constructada y buena biocompolibilidad (comparadas con el polis retario emercial Tecofica[®] yía (las vasos sanguineos naturales) para su uso en constructa comedicas e inceniería do tericos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener poli(uretano ureas) segmentados (PUUS) biodegradables con aminoácidos como extensores de cadena para su uso potencial en injertos vasculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar poli(uretano ureas) segmentados biodegradables a partir de poliε-caprolactona diol (PCL diol), 4,4-metilen-bis-ciclohexil diisocianato (HMDI) y un aminoácido como extensor de cadena (L-Arginina, Glicina ó L-Ácido aspártico) ó butanodiamina como control.
- 2) Caracterizar fisicoquímica y mecánicamente los polímeros obtenidos.
- Estudiar la degradación *in vitro* de los PUUS bajo condiciones fisiológicas simuladas usando búfer de fosfato salino (PBS) y bajo condiciones aceleradas usando agentes hidrolíticos y oxidativos.
- Evaluar la hemocompatibilidad de los poliuretanos obtenidos con sangre completa y plaquetas radiomarcadas.
- Evaluar la citotoxicidad de extractos de PUUS con células HUVECs y determinar la adhesión y proliferación de HUVECs en contacto directo con las superficies de los PUUS.

OBJETIVOS OBJETIVO GENERAL

Cotener poil(uretaino ureas) segmentados (PUOS) biodegradables con uminoscifica como extensores de cedena cera su uso potencial en mertos casoumes.

08JE T/VOS 55PEC/F1008

- 1 Sintelitzar pol(uretano ureas) segmentados biodegradables a partir da polis-seprotectoria diol (POL diol), 4,4-metilan-bia-ciclohexti dilsocianato (PMIDI) y un aminoánido como extensor de caderia (L-Arginina, Glicina ó L-Acido aspántico) ó bulanodiamina como control.
 - Consistentizar fisicoquímica y mecánicamente los polimeros obtanidos.
- II Estudiar la degradación in vitro de los PUUS bajo condiciones fisiclógicas elmutedas usando búter de fostato satino (PBS) y bajo condiciones scelemidas usando agentes hidrolíticos y cidativos.
- Evaluar la hemocompatibilidad de los polluretanos obtenidos con sangre completa y plaquetas molemarcadas.
- I Evaluar la citotoxicidad de extractos de PUUS con ositilas HUVECs y determinar la adhesión y proliferación de EUVECs en contacto directo con de superficies de los PUUS.
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en México y el mundo^{5, 6}. De éstas, las de tipo vascular tales como la arterosclerosis, pueden causar la oclusión de vasos conduciendo a la disminución del flujo sanguíneo y daño a órganos. Algunos ejemplos incluyen el infarto cardíaco que es causado por oclusión de la arteria coronaria, la claudicación por enfermedad de la arteria periférica y 'stroke' (derrame cerebral) por oclusión de la arteria carótida o arteria cerebral. Los aneurismas y daños traumáticos de vasos sanguíneos constituyen otros ejemplos de daño vascular⁷.

El reemplazo y la derivación (bypass) arterial son tratamientos comunes para la enfermedad vascular, con más de 1.4 millones de operaciones de 'bypass' realizadas cada año tan solo en E.U.A. Por otra parte, el reemplazo de conductos vasculares, como se representa en la Figura 1.1, no solo es necesario en el tratamiento de las enfermedades vasculares si no también en daños causados por traumas, trasplante de órganos y reconstrucción plástica⁷.



Figura 1.1. Revascularización utilizando un injerto sintético de ePTFE (imagen tomada de "general thoracic surgery⁸").

1.2 Injertos vasculares

Las prótesis vasculares, también llamadas injertos vasculares, pueden ser definidos como tubos o conductos autógenos, autólogos, biológicos o artificiales implantados en el sistema vascular para aumentar o mantener el flujo sanguíneo. Pueden ser clasificados de acuerdo a la fuente de donde se obtienen (autólogos, sintéticos, etc.), la vasculatura que reemplazarán, la construcción (recto, cónico, bifurcado, pared estándar, pared delgada, poroso, etc.) o de acuerdo al tamaño expresado en términos de su diámetro interno (diámetro grande, regular o pequeño)⁹.

Entre los injertos vasculares comúnmente usados pueden mencionarse los autólogos y los sintéticos, sin embargo, estos no siempre son adecuados, especialmente cuando se requieren vasos de pequeño calibre; los primeros, por falta de disponibilidad y, los segundos, por sus problemas asociados a falla mecánica o falla biológica. Por lo tanto, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar los injertos vasculares actuales y estos están dirigidos hacia 1) desarrollo de nuevos tipos de materiales prostéticos, 2) endotelialización de un material existente y 3) fabricación de un conducto vascular completo por medio de ingeniería de tejidos¹⁰. A continuación se presentan los diferentes tipos de injertos vasculares, así como sus ventajas y desventajas.

1.2.1 Injertos vasculares autólogos

Los injertos de vena autóloga normalmente representan el tratamiento típico para sustituciones vasculares ya que son compliantes e intrínsecamente no trombogénicos¹¹, siendo estas dos características determinantes para el desempeño de los injertos.

Los vasos autólogos, incluyendo la vena safena y arterias mamarias, constituyen el tratamiento estándar para el injerto coronario. En el caso de la vena safena, esta es una vena larga de la pierna (véase la Figura 1.2) que ha sido utilizada extensamente como injerto vascular debido a su longitud y diámetro, el cual es similar a los de las arterias coronarias y femoral o a la arteria poplítea.





Sin embargo, las técnicas de bypass de arteria coronaria usando vena safena presentan actualmente una tasa de oclusión de 30% a 40% después de 10 años de la cirugía. Además, no todos los pacientes tienen una vena safena adecuada debido a enfermedades vasculares preexistentes o por previo procedimiento de extracción o recolección de vena. Adicionalmente, existen otras complicaciones aunadas al costo quirúrgico asociado con la recolección de vena autóloga. Todos estos factores ponen de manifiesto la necesidad clínica, ampliamente reconocida, de injertos vasculares sintéticos de diámetro pequeño, que sean funcionales y realmente disponibles ^{7, 13, 14}.

1.2.2 Injertos vasculares sintéticos

El primer injerto sintético fue hecho de Vinyon-N. Fue introducido en 1952 reemplazando 17 aortas abdominales y un aneurisma poplíteo¹⁵ y su éxito se debió principalmente a su porosidad, lo cual permitió el ingreso de capilares y fibroblastos. Esta granulación de tejido sirvió como nido para la formación de una

Capitulo L. Antecedentes

Capítulo 1. Antecedentes

superficie interior organizada de células aplanadas. Más adelante, fueron propuestos muchos otros materiales, tales como el Poli(etilen)tereftalato (PET) también conocido como "Dacron" (figura 1.3A), el cual ha dominado las sustituciones vasculares de diámetro grande desde su introducción en 1957¹⁴.

El PET presenta varias ventajas en su forma de fibra estándar, siendo un material fuerte con una resistencia a la tensión en su forma orientada de 170-180 MPa y módulo de tensión cerca de 14 kPa. Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado el deterioro progresivo de sus propiedades físicas como consecuencia de sus grupos éster susceptibles a hidrólisis y a la oxidación inducida por fagocitos activados, requiriendo 30 años para una completa absorción en humanos ¹⁴.

El PTFE por su parte (figura 1.3B), es un miembro de la clase de polímeros fluorocarbonados, los cuales son materiales altamente cristalinos con una rigidez moderada (módulo de elasticidad de 0.5 GPa y resistencia a la tensión de 14 MPa). Las formas implantables de este material usado para prótesis, incluye las versiones expandida y textil. Su porosidad puede ser usada ventajosamente para promover el crecimiento de tejido y la formación y retención de una capa endotelial; sin embargo, esto también puede permitir la adherencia de otros componentes proteicos indeseables en la superficie¹⁴.



Figura 1.3. Injertos vasculares comerciales a base de A) Dacron y B) PTFE¹⁶.

Capítulo 1. Antecedentes

Aunque tanto el PET como el PTFE son injertos sintéticos ampliamente utilizados, han demostrado ser inferiores a los conductos autólogos, especialmente cuando los vasos son de diámetro menor a 6 mm; por ejemplo, la tasa de desempeño después de 2 años del injerto fémoro-poplíteo de PTFE fue de 69% y después de 5 años fue de 39%. Entre las desventajas de los injertos protésicos que causan este problema se pueden mencionar el riesgo de trombosis e hiperplasia íntima alrededor de la anastomosis (cerca de la unión entre la prótesis y la arteria natural), así como infección, duración limitada y falta de complianza de los injertos^{7, 11, 17}.

En cuanto a la complianza, esta es una medida de la capacidad de distensión de una estructura bajo presión sanguínea fisiológica y es una propiedad análoga a la elasticidad¹⁸. Se ha encontrado que la complianza es significativamente mayor en los conductos biológicos adyacentes en comparación con los materiales de injertos prostéticos los cuales normalmente son no compliantes (esto es 500 vs. 2 MPa de módulo elástico para ePTFE vs. vaso nativo). Este desajuste mecánico (diferencia en módulos entre el tejido nativo y el sintético) juega un importante papel en la falla del injerto, ya que mientras mayor sea el desajuste, la permeabilidad del injerto disminuye. Por lo tanto un factor clave en el desarrollo de una prótesis cardiovascular ideal es la viscoelasticidad, así como propiedades compliantes idénticas a las arterias nativas, ya que un excesivo o despreciable grado de complianza es perjudicial ^{11, 14, 19}.

En vista de todo esto, los poliuretanos (PUs) han sido de interés como material vascular para desarrollar injertos protésicos alternativos y han sido evaluados para este fin desde 1960²⁰, debido por un lado, a sus características antitrombogénicas, además que presentan una mayor complianza que ePTFE. De esta manera, sus parámetros mecánicos y de flujo son igualados a los de la vasculatura nativa⁷. Entre los PU comerciales utilizados para injertos vasculares se pueden mencionar al Mitrathane®, el cual es un poliuretano hidrofílico microporoso; al VascugraftTM,

un poli(ésteruretano) libre de aditivos²¹; mientras que Cardio Tech Int. Ltd. ha reportado el desarrollo de poli(carbonato uretanos) como el ChronoFlex, para la producción de vasos sanguíneos artificiales diseñados con características específicas de complianza similares a los de las arterias nativas¹⁴.

No obstante que los poliuretanos tradicionales presentan ciertos problemas, siguen siendo una excelente opción debido a que la versatilidad en su síntesis permite diseñarlo para presentar adecuadas propiedades mecánicas y antitrombogénicas; además de que por su inherente degradación puede ser considerado como candidato para ingeniería de tejidos^{2, 22, 23}.

1.2.3 Injertos vasculares biodegradables

Los injertos vasculares biodegradables están siendo actualmente ampliamente estudiados. Estos materiales están diseñados para proveer un soporte inicial en el cual pueda regenerarse el tejido y después degradarse y eliminarse de manera natural, mientras son reemplazados y remodelados por matriz extracelular secretada por las células²⁴. Estudios realizados por Lepidi *et. al.* sobre un sustrato biodegradable muestra que vasos sanguíneos de bajo calibre (2mm) podrían regenerarse en un lapso de 30 a 60 días²⁵.

Con el fin de desarrollar nuevos injertos vasculares biodegradables, se han probado materiales naturales para su fabricación. Entre estos materiales se encuentran el colágeno, hialuronano, matrigel, fibrina, fibroina de seda, péptidos y vasos descelularizados. Estos han mostrando excelente compatibilidad con las células, pero tienen un comportamiento mecánico limitado. En contraste, los materiales sintéticos tienen el comportamento opuesto, es decir, excelentes propiedades mecánicas y de procesamiento, pero pobre adhesión celular, por lo que frecuentemente requiere de modificación superficial para su uso en ingeniería de tejidos²⁶.

Entre los materiales sintéticos que han sido objeto de estudio para su uso en injertos vasculares se encuentran, la policaprolactona (PCL), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), los poliuretanos segmentados y diversos copolímeros^{26, 27, 28}.

1.2.4 Consideraciones en el diseño de materiales usados como injertos vasculares

Por su aplicación en el campo médico, todos los materiales usados en la fabricación de injertos vasculares, ya sean naturales ó sintéticos, bioestables o biodegradables, deben ser diseñados y evaluados de acuerdo a su aplicación final. Con esto en mente, diferentes disciplinas científicas se han conjugado para un fin común, tal y como es ilustrado por medio del 'árbol de la medicina', el cual es una metáfora presentada recientemente, en el marco de la reunión anual de la sociedad de biomateriales en 2011 (2011 'Annual Meeting of the Society for Biomaterials') en Orlando, Florida (Figura 1.4). En esta figura se puede observar que las raíces representan las ciencias básicas de la vida y la ingeniería, y las ramas representan las áreas de la medicina y cirugía que usarán los dispositivos o andamios, mientras que el conector vital, el tronco, representa la ciencia de los materiales²⁹.

Es por esto que, tanto los requerimientos específicos de los materiales como la evaluación de los mismos diferirán de acuerdo a la naturaleza del tejido a sustituir. Adicionalmente, cuando lo que se desea es la regeneración de vasos sanguíneos, el diseño de materiales deberá poseer una serie de propiedades físicas y químicas encaminadas a evitar la formación de trombos y promover la adhesión y proliferación celular, sin comprometer las propiedades mecánicas que permitan al soporte desempeñarse adecuadamente en lo que se regenera el nuevo tejido.

Capitalia (America and C

Capítulo 1. Antecedentes



Figura 1.4. Árbol metafórico que muestra la relación entre la ciencia de los materiales con sus raíces (la ciencia y la tecnología) y sus ramas que representan la medicina clínica. Tomado de '2011 panel on developing a biomaterials curriculum'²⁹

1.3 Hemocompatibilidad

A partir de los trabajos de Boretos y Lyman en la decada de los 60s y 70s respectivamente, los cuales destacaron la compatibilidad sanguínea de los SPUs, estos materiales elastoméricos se han empleado para aplicaciones cardiovasculares, tales como corazones artificiales, balones intra-aórticos, aislamiento de marcapasos, válvulas cardiacas y membranas para hemodiálisis. Poco tiempo después, su compatibilidad sanguínea fue relacionada con la estructura de microfase separada, compuesta por dominios de segmento duro (rígido) y suave (flexible)³. Sin embargo para aplicaciones en injertos vasculares la hemocompatibilidad aún debe ser mejorada ya que se ha encontrado formación de trombos en éstos, lo cual podría tener fatales consecuencias³⁰.

El entendimiento de los procesos que ocurren cuando un biomaterial entra en contacto con la sangre, ha sido fundamental para el desarrollo de materiales con

mejor hemocompatibilidad. La Figura 1.5 muestra, de una manera simplificada, los principales eventos que ocurren cuando un material entra en contacto con sangre. La adsorción de proteínas en la superficie del material se cree que es el primer evento que ocurre y de esto depende la secuencia de fenómenos que se desarrollarán a continuación³¹.





Estudios con proteínas han mostrado que superficies recubiertas de albúmina no parecen atrapar plaquetas, mientras que las recubiertas con γ -globulinas y fibrinógeno no causan solamente adhesión plaquetaria si no también agregación y liberación de constituyentes de las plaquetas³².

Las plaquetas por su parte pueden adherirse tanto a superficies artificiales como a vasos sanguíneos lesionados, pues estas células son extremadamente sensibles y pueden responder a una mínima estimulación. La activación causa que las plaquetas empiecen a adherirse y cambien su forma de esferas irregulares a pseudópodos espinosos, acompañados por una contracción interna y extrusión del

Capitulo I. Anweedemies

Capítulo 1. Antecedentes

contenido granular almacenado en el ambiente extracelular (Figura 1.6). Estos productos plaquetarios secretados (como el fosfato de adenosina) estimulan a otras plaquetas, causan agregación plaquetaria irreversible y conducen a la formación de trombos de plaquetas fusionadas³³ como puede observarse en la figura 1.7.





Figura 1.6. Plaquetas con diferentes grados de activación. Imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido por Fatisson et. al. ³⁴

1.3.1 Métodos para evitar o minimizar la adhesión plaquetaria

Se han empleado numerosas estrategias para mejorar la hemocompatibilidad, incluyendo mejoramiento en la separación de microfase de poliuretanos, control en la topografía o incorporación de diversas especies en la masa o superficialmente^{30, 35, 36}. A continuación se mencionan algunos de los métodos utilizados.

Capítulo 1. Antecedentes





1.3.1.1 Disminución de la hidrofilicidad

Los poliuretanos a base de polietilenglicol (PEG) (también conocido como polióxido de etileno (PEO)), así como sus copolímeros, han sido utilizados debido a su excelente resistencia a la adsorción no específica de proteínas por su naturaleza hidrofílica³⁸⁻⁴⁰. Por ejemplo, se ha reportado que poliuretanos amfifílicos conteniendo PEO presentan menor adsorción de fibrinógeno, el cual es un mediador de la adhesión plaquetaria en muchas superficies⁴¹.

1.3.1.2 Recubrimiento con materiales naturales

La albumina, una de las proteínas más abundantes de la sangre, es conocida por resistir la depositación plaquetaria por lo que ha sido utilizada para recubrir biomateriales⁴².

1.3.1.3 Inmovilización de moléculas que interfieren con la vía trombolítica

Se ha intentado mejorar la hemocompatibilidad de los poliuretanos por muchas vías, pero es de particular interés la adición de heparina al sistema usando

Capítulo 1. Antecedentes

interacciones no-covalentes o bien, covalentes usando un polímero químicamente modificado. Esta molécula es un glicosaminoglicano altamente sulfatado que actúa como anticoagulante natural en la sangre ^{1, 43}, ya que se ha demostrado que su efecto anticoagulante es dominado por sus grupos sulfonatos y carboxílicos. Debido a esto, diversos materiales han sido modificados superficialmente con estos grupos para mejorar la hemocompatibilidad^{44, 45}. El hialuronan (HA) y el dermatan sulfato también se han usado recientemente en poliuretanos por sus capacidades anti-trombolíticas^{46, 47}.

1.3.1.4 Sistemas de liberación de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) tiene una variedad de actividades vaso protectivas incluyendo ser un potente agente antiplaquetario, aunque la duración limitada de esta molécula hace que sea efectiva solo a corto plazo. Tomando en cuenta esta propiedades, se han estudiado sistemas de liberación de NO usando diazeniodiolatos como donadores exógenos, o los S-nitrosotioles como donadores endógenos que pueden liberar NO en la presencia de activadores. Pensando en esto Duan y Lewis modificaron la superficie de poliuretanos con cisteína, mientras que otros autores han sintetizado complejos PU-Cu(II) y los han inmovilizado sobre poliuretanos⁴⁸⁻⁵⁰.

1.3.1.5 Estimulación para la formación de una monocapa endotelial

En el campo de los injertos vasculares, las técnicas de ingeniería de tejidos intentan mejorar diferentes tipos de conductos por medio de la colonización *in vitro* o *in vivo* con células endoteliales como se observa en la Figura 1.8 y de este modo, conseguir una prótesis "natural" que tenga la capacidad de participar en el proceso de reparación del tejido. En este sentido, se busca promover la endotelización, aunque que se ha observado que es difícil en sustratos artificiales, pero que sin embargo es esencial para proveer de una funcionalidad biológica a prótesis vasculares artificiales. La presencia de una capa confluente de células endoteliales mejorará la permeabilidad incluso de injertos de diámetro pequeño,

evitará la adhesión y agregación plaquetaria, reducirá la inflamación y promoverá la formación de una capa neoíntima^{51, 52}.



Figura 1.8. Representación esquemática de los estados de las células sobre los materiales⁵².

Se ha sugerido que una monocapa de células endoteliales es suficiente para que el óxido nítrico sea sintetizado por éstas células mediante las enzimas NO sintetasas (NOS) como se observa en el esquema de la figura 1.9. La reacción de esta enzima involucra la oxidación de uno de los grupos guanidino de la arginina para generar NO y citrulina⁵³.



1.4 Poliuretanos para regeneración de vasos sanguíneos

La ingeniería de tejidos ha tenido éxito en la generación de injertos para heridas crónicas y quemaduras, por lo que se piensa que podría ser particularmente valiosa en la producción de injertos vasculares⁷.

Hasta el momento, el término Ingeniería de tejidos se ha definido como "una disciplina científica dedicada a la generación de nuevos tejidos usando principios de ingeniería en combinación con un entendimiento y aplicación de ciencias biológicas", por la combinación de células, moléculas biológicamente activas (por ejemplo factores de crecimiento) y materiales de soporte (andamios)⁵⁴.

Los avances más significativos en la ingeniería de tejido vascular se han logrado a través de la mejora de alguno de los elementos de la ingeniería tisular; por ejemplo, diseño de los materiales, diseño del reactor o fuente de las células, pero sin apartarlo del enfoque general, es decir, tomando en cuenta la interrelación entre sus componentes⁵⁵. La Figura 1.10 muestra los elementos constitutivos de la ingeniería tisular y la interrelación entre ellos.



Figura 1.10. Componentes para la regeneración de tejido vascular.

En este contexto, los poliuretanos biodegradables elastoméricos han sido usados para ayudar a la reparación y reconstrucción de tejidos mecánicamente activos incluyendo vasos sanguíneos⁵⁶. A continuación se hace un breve resumen acerca de la composición y reacciones químicas de los poliuretanos, ya que esta información es útil para en diseño de materiales que sean adecuados para estas aplicaciones.

1.4.1 Química de los poliuretanos segmentados

Los poliuretanos segmentados se caracterizan por su enlace uretano (-NHCOO-) en la cadena principal, y aunque éste solo constituye un pequeño porcentaje de los grupos funcionales comprendidos en esta familia de polímeros, le confiere las propiedades mecánicas y antitrombogénicas que han conducido a su uso en aplicaciones cardiovasculares⁵⁷.

Las principales reacciones en la síntesis de poliuretanos segmentados se llevan a cabo entre sus tres componentes principales: Un poliol, un diisocianato y un extensor de cadena. El poliol constituye el segmento flexible o suave, mientras que el diisocianato y extensor forman el segmento rígido o duro, como se esquematiza en la figura 1.11.



Figura 1.11. Esquema de los poliuretanos segmentados

El poliol usado para la síntesis de poliuretanos es una macromolécula hidroxilo terminada que generalmente es un poliéter, poliéster, polímero hidrocarbonado o polidimetilsiloxano; con un peso molecular comprendido entre 400 y 3000 g/mol.

El diisocianato por su parte puede ser aromático o alifático y reacciona vigorosamente con compuestos que contienen hidrogenos activos, como el poliol el cual contiene grupos hidroxilo y el 'extensor' de cadena el cual es una molécula pequeña que puede contener grupos amino, hidroxilo y/o ácidos carboxílicos (véase la figura 1.12). La reactividad de cada uno de estos grupos funcionales varía significativamente como puede observarse en la tabla 1-I. Adicionalmente los grupos diisocianato pueden reaccionar con impurezas como el agua y con los grupos uretano, urea y amida formados, produciendo entrecruzamiento por la formación de acido carbámico, alofanatos, biuret y acilureas como puede observarse en la figura 1.13^{58, 59}.



Figura 1.12. Esquema de las reacciones principales en la síntesis de los poliuretanos segmentados para aplicaciones médicas^{58, 60}.

Tabla 1-I. Reactividad de isocianatos⁵⁷.

Grupo funcional con hidrogeno activo	Rapidez de reacción relativa
Amina primaria	100,000
Amina secundaria	20,000 - 50,000
Agua	100
Alcohol primario	100
Alcohol secundario	30
Ácido carboxílico	40





1.4.2 Biodegradabilidad de los poliuretanos

La naturaleza química del poliuretano es central para el entendimiento de porque algunos poliuretanos sufren una degradación más rápida que otros⁶¹; por ejemplo la figura 1.14, muestra el efecto de la hidrofilicidad en la degradación. Por otra parte, la degradación *in vivo* de los poliuretanos procede principalmente de la escisión hidrolítica de la cadena en grupos éster y uretano, mientras que las reacciones oxidativas siempre tienen lugar en los segmentos de poliéter. Además, la degradación puede ser acelerada por la acción de enzimas celulares, peróxidos, catálisis de iones metálicos y grupos carboxílicos formados, calcificación y acción de esfuerzos repetitivos sobre los implantes⁶², entre otros.

Capitula 1. Annecedences

Capítulo 1. Antecedentes



Figura 1.14. Vía de degradación de materiales los poliméricos dependiendo de su naturaleza⁶³.

1.4.2.1 Segmento flexible biodegradable

Los poliuretanos biodegradables o parcialmente biodegradables pueden ser producidos a través de la introducción de partes lábiles, susceptibles a la hidrólisis, por medio de diferentes vías. El método más común es la introducción de estos enlaces hidrolizables por medio del segmento flexible, usando polímeros tales como polilacturos, poli(ε -caprolactona) (PCL) o copolímeros entre ellos^{64, 65}. De esta manera, polímeros biodegradables conocidos pueden ser unidos por medio de enlaces uretano y posiblemente enlaces urea para formar un material elastomérico. Estos poliuretanos han sido sintetizados con estructura lineal o en red con variables propiedades físicas y de degradación⁶⁶.

1.4.2.1.1 Propiedades de la policaprolactona (PCL)

La PCL se encuentra entre los poliésteres biodegradables, más atractivos y comúnmente usados. Puede ser empleado para diferentes aplicaciones biomédicas tales como andamios en ingeniería de tejidos y para la liberación controlada de fármacos⁶⁷, La PCL también se utiliza comúnmente como segmento

Capítulo 1. Antecedentes

flexible en poliuretanos, ya que se reconoce como un polímero no tóxico, además que se degrada a una velocidad más lenta que otros poliésteres⁶⁸. La degradación de la PCL y de sus copolímeros procede principalmente por vía enzimática y depende de su peso molecular, composición y morfología^{69, 70}. La figura 1.15 muestra la unidad básica de la PCL, mientras que la tabla 1-II señala algunas de las principales propiedades de la PCL.



Figura 1.15. Estructura química de la PCL

•	Estado físico	Semicristalino
•	Transición vítrea	-60°C
•	Punto de fusión	60°C
•	Temperatura de descomposición térmica	350°C
•	Tiempo de resorción	2-5 años
•	Principales mecanismos de degradación	Hidrolítica y enzimática
•	Propiedades superficiales	Hidrofobico, con pobre adhesión y proliferación celular.

Tabla 1-II. Propiedades de la PCL^{71, 72}.

1.4.2.2 Segmento rígido biodegradable

Un problema de los poliuretanos tradicionales ha sido la toxicidad de los productos de degradación, particularmente los derivados del componente diisocianato. Por ejemplo, los productos de degradación de los poliuretanos con segmento rígido a base del 4,4'-metilendifenil diisocianato (MDI) y tolueno diisocianato (TDI) son tóxicos. Ya que originalmente estos PUs fueron diseñados para ser durables, y por lo tanto se degradaban muy lentamente, el riesgo del efecto tóxico de sus productos de degradación era correspondientemente bajo. Sin embargo, los PUs

diseñados para ser biodegradables tienen un riesgo mayor de liberar productos de degradación tóxicos, por lo que se prefieren los diisocianatos alifáticos para superar este problema^{68, 73}. Por consiguiente, es frecuente encontrar sistemas biodegradables a base de diisocianatos alifáticos (ver tabla 1-III), tales como como el 1,6-hexametileno diisocianato (HDI), el 1,4-butanodiisocianato (BDI) y el 4,4'-metilen bis ciclo hexil diisocianato (H₁₂MDI)^{64, 74-77}.

Тіро	Nombre y abreviatura	Estructura
Aromáticos	4,4'-metilen bis (fenil isocianato) (MDI)	OCN - CH2 - CH2 - NCO
	Tolueno diisocianato (TDI)	OCN NCO
	1,4-butano diisocianato (BDI)	OCNNCO
	1,6- hexano diisocianato (HDI)	OCNNCO
Alifáticos	4,4'-metilen bisi (ciclohexil isocianato) (H ₁₂ MDI)	OCN NCO
	Lisina etil ester diisocianato (LDI)	OCN OCN OCN OCN

Tabla 1-III. Diisocianatos comúnmente usados para la síntesis de poliuretanos⁷⁸.

Por otro lado, la introducción de aminoácidos en el segmento rígido ha sido sujeto de mucho interés, debido a que estos son compuestos naturales que pueden ser atacados por enzimas tales como las proteasas⁷⁹. El uso de aminoácidos en la cadena principal de poliuretanos tiene la ventaja de presentar mejores propiedades fisicomecánicas en comparación con los poliaminoácidos, los cuales

son usados para modificar superficialmente otros polímeros por su excelente biocompatibilidad⁸⁰.

Debido a esto, un diisocianato alifático que ha sido ampliamente estudiado para formar parte de poliuretanos biodegradables, es el diisocianato de lisina (LDI); este derivado de aminoácido (desarrollado por Kyowa Hakko Kogyo Co., Chiyoda-Ku, Tokio, Japón), aunque no se encuentra disponible comercialmente, puede ser preparado a partir del monohidrocloruro de L-lisina^{77, 81}.

En la literatura se ha reportado una gran cantidad de trabajos utilizando LDI ^{75, 82-} ⁸⁴, por ejemplo Zhang *et. al.* han sintetizado poliuretanos porosos a base de LDI, glucosa y polietilenglicol (PEG) los cuales soportaron adhesión, proliferación y diferenciación de células óseas, además que sus productos de degradación resultaron no tóxicos⁷⁴.

La biocompatibilidad de los diisocianatos de lisina se atribuye a que, al ser liberados por hidrólisis de los enlaces uretano, sus grupos funcionales podrían reaccionar con agua para regenerar la L-lisina etil éster, un producto esencialmente no tóxico⁸⁵⁻⁸⁸. Otros investigadores que han utilizado LDI para desarrollar poliuretanos elastoméricos lineales ó entrecruzados para aplicaciones biomédicas, no han descrito ninguna respuesta tóxica o tumurogénica significativa durante su implantación. Por el contrario, los poliuretanos a base de LDI y sus productos de degradación han sido reportados como no tóxicos y biocompatibles *in vitro e in vivo*^{89, 90}.

Adicionalmente al LDI, se han utilizado otros derivados de aminoácidos en el segmento rígido^{66, 91-95}. Estos proveen una ruta para sintetizar poliuretanos biodegradables, esperando de esta manera, que se generen solamente subproductos no-tóxicos. Por ejemplo Sarkar *et. al.* han sintetizado una familia de poliuretanos biodegradables a base de L-tirosina y sus derivados, como extensores de cadena⁹⁴; mientras que Skarja y Woodhouse han usado un

derivado de fenilalanina como extensor de cadena, para la síntesis de otra familia de poliuretanos, los cuales mostraron una mayor susceptibilidad al ataque enzimático en los enlaces adyacentes al aminoácido^{96, 97}, la figura 1.16 muestra la estructura de estos derivados de aminoácidos. Otros autores han propuesto el uso de otros dipéptidos o tripéptidos para proveer sitios activos para el ataque enzimático y adhesión de células endoteliales ^{98, 99}, en tanto que Taite *et. al.* emplearon una secuencia peptídica para inducir la adhesión especifica de células endoteliales y disminuir la adhesión plaquetaria¹⁰⁰.





1.4.3 Células y moléculas de señalización

Además de un soporte biodegradable, la sustitución de vasos sanguíneos mediante ingeniería de tejidos ha involucrado el sembrado de células endoteliales autólogas (CE) en el lumen de un injerto sintético, ya sea para formar un constructo *in vitro* o para evaluar su capacidad de regenerar el tejido vascular. Las fuentes de células autólogas son las siguientes: i) venas; ii) arterias; iii) grasa omental y iv) grasa subcutánea. Estudios recientes han evaluado la posibilidad de

usar células de placenta, miofibroblastos de cordón umbilical o células estromales medulares¹³.

La incorporación de factores de crecimiento angiogénico tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés) además de otros, han sido utilizados en la preparación de andamios para liberarse de manera controlada y promover angiogénesis local. Entre los métodos para incorporar estos factores de crecimiento se puede mencionar la absorción en el andamio, el mezclado de microesferas conteniendo el factor de crecimiento o mezclando directamente el factor de crecimiento durante el procesamiento¹⁰¹. Para este fín, Prasad *et. al.* incorporaron VEGF en poliuretano previamente modificado con gelatina¹⁰².

1.4.4 Factores que promueven la adhesión celular

La adhesión y proliferación de diferentes tipos de células en superficies poliméricas también dependen de las características de superficie tales como mojabilidad, carga de la superficie, energía libre superficial y topografía^{103, 104}. En este sentido ha sido reportado que la adhesión celular se ve favorecida por superficies moderadamente hidrofílicas, las cuales permiten la adsorción de proteínas de suero por medio de enlaces lábiles y reversibles. Un moderado grado de mojabilidad de los sustratos permite que las células depositen sus propias proteínas de adhesión, intercambiando con más rapidez suero de proteínas adsorbidas; este mecanismo se cree es muy lento en superficies muy hidrofóbicas o muy hidrofílicas, y es una probable razón que puede contribuir a que las células no se adhieran y no proliferen tan bien sobre ellas^{105, 106}.

Adicionalmente, existen otros factores que pueden afectar la adhesión celular, pues la hidrofilicidad no es ni indispensable ni suficiente para adhesión celular. Las

propiedades químicas tales como grupos carboxílicos o hidroxílicos pueden ser importantes dependiendo del tipo de célula¹⁰⁵.

Las técnicas de modificación superficial, ya sea químicamente o por plasma, han permitido la introducción de grupos amino libres en poliésteruretanos segmentados incrementando la energía libre superficial y proporcionando además una vía conveniente para inmovilizar especies bioactivas como gelatinas, colágeno y quitosano entre otras. Estas modificaciones tienen la ventaja de aumentar la interacción célula-material¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. La inmovilización de proteínas tales como la fibronectina y la vitronectina son bien conocidas como adhesivos celulares proteicos (cell-adhesive proteins) y han incrementado la adhesión, expansión y migración celular¹¹⁰.

Se ha identificado que un factor importante para el éxito de la endotelización de injertos vasculares es promover una buena adhesión inicial, ya que cuando los injertos protésicos sembrados con células endoteliales son sujetos a la acción de flujo pulsátil (simulando el flujo sanguíneo), las células pobremente adheridas empiezan a desprenderse de la superficie del biomaterial, resultando en hasta un 80-90% de pérdida de estas células¹³.

La adhesión celular que sigue a la adsorción de proteínas es mediada por moléculas de adhesión celular como las integrinas. Para controlar y dirigir la respuesta celular hacia el biomaterial se han utilizado secuencias de oligopéptidos presentes en proteínas de la matriz extracelular. Los más estudiados son los oligopéptidos que contienen la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ya que esta se encuentra en varias proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágeno y vitronectina¹¹¹. Muchos autores han empleado esta secuencia para modificar la superficie de diferentes poliuretanos, conduciendo al mejoramiento en la adhesión, extensión y proliferación celular sobre la superficie de estos materiales^{83, 112-120}.

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

Para la preparación de los poli (urea uretanos) segmentados (PUUS) biodegradables, se utilizó como segmento flexible la poli-ε-caprolactona diol (PCL diol) con un peso molecular de 2000 g/mol. El diisocianato empleado fue 4,4'metilen bis(ciclohexilisocianato) (HMDI) y como extensor de cadena se utilizó 1,4butanodiamina ó uno de los aminoácidos mostrados en la Tabla 2-I. La reacción fue catalizada con 2-etilhexanoato de estaño también conocido como octanoato de estaño. Todos los reactivos antes mencionados fueron de la marca Sigma-Aldrich. Como disolvente en la síntesis se utilizó dimetilformamida (DMF) marca Fluka y para la preparación de películas se empleó tetrahidrofurano (THF) marca J. T. Baker.

Extensor de cadena	Abreviatura utilizada*
1,4-butanodiamina	BDA
L-arginina hidroclorada	R
Glicina hidroclorada	G
L- ácido aspártico	D

Tabla 2-I. Aminoácidos utilizados en la síntesis de los poli(urea uretanos) segmentados.

*Código de acuerdo al actual sistema de una sola letra impuesto en genética molecular.

Los reactivos fueron manipulados bajo atmósfera de nitrógeno para evitar su contaminación con agua del ambiente o en su defecto secados a 60°C bajo presión reducida o tamiz molecular. Las estructuras de los monómeros utilizados son mostradas en la Figura 2.1.

2.2 Síntesis de los poli (uretano ureas) segmentados (PUUS)

La síntesis de los diferentes PUUS se realizó haciendo reaccionar los reactivos en una proporción molar de 1:2.05:1 de PCL diol, HMDI y el extensor de cadena, respectivamente; por medio de una poliadición en dos pasos a 60°C y atmósfera de nitrógeno:

- El primer paso consistió en la preparación de un prepolímero por medio de la reacción de la PCL diol con el disocianato (HMDI) y 0.3% de octanoato de estaño como catalizador en disolución de DMF durante 4 horas.
- El segundo paso consistió en hacer reaccionar el prepolímero obtenido en la etapa previa con cantidades equimolares del extensor de cadena por 2 horas. Para agregar los aminoácidos, éstos fueron disueltos en DMF (en algunos casos fue necesario acidular la solución con ácido clorhídrico concentrado para lograr que el aminoácido se disolviera).

Después del período de extensión, el producto fue precipitado en agua destilada para detener la reacción, se dejó en agua toda la noche, y posteriormente fue enjuagado exhaustivamente con agua destilada para eliminar los residuos de la reacción. Finalmente, el producto fue secado a presión reducida a 60°C por 24 horas.

La molécula de poliuretano obtenida puede ser representada como:

[(DPD)_nE]_m

Donde el poliol (P) es la PCL diol (figura 2.1a); el diisocianato (D) es el HMDI (Figura 2.1b), y el extensor (E) puede ser uno de las monómeros de la tabla 2-I o sus respectivos hidrocloruros, cuya estructura se presenta en las figuras 2.1c a 2.1f.



Figura 2.1. Estructuras de los monómeros para la síntesis de PUUS, a) PCL diol, b) HMDl, c) Butanodiamina, d) L-arginina mono hidroclorada, e) Glicina hidroclorada, y f) L-ácido aspártico.

El esquema de la reacción, así como los productos obtenidos, son esquematizados por medio de la figura 2.2. Los polímeros sintetizados fueron designados como PUx, donde x representa al extensor usado, de acuerdo al código presentado en la Tabla 2-I.

Capítulo 2: Parta experimentol

Capítulo 2. Parte experimental



Figura 2.2. Reacciones para la formación los PUUS.

2.3 Caracterización fisicoquímica y superficial

La solubilidad de los PUUS fue probada en THF, cloroformo, DMF y etanol. De acuerdo a los resultados de solubilidad, se obtuvieron películas de 0.1mm de espesor por evaporación de THF a temperatura ambiente (25°C), en un molde de teflón por un mínimo de dos días. Películas más delgadas fueron preparadas disolviendo los PUUS en cloroformo a una concentración de 10 mg/ml y depositando una gota de la solución sobre un cubre objetos de vidrio (12 mm de diámetro) por medio de un equipo spin coater modelo ws-4000B-6NPP/Lite, a una velocidad de 3000 rpm.

2.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La estructura y composición de los poliuretanos sintetizados se determinó con un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (Nicolet Protegé 460 Magna IR). Los espectros se obtuvieron en el intervalo espectral de 4000-400 cm⁻¹, promediando 100 barridos y con 4 cm⁻¹ de resolución.

2.3.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis por RMN se llevó a cabo mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN, en un espectrómetro Varian Unity de 500 MHz. Los poliuretanos fueron disueltos en cloroformo deuterado (10 mg/ml).

2.3.3 Difracción de rayos X (DRX)

Para analizar la cristalinidad de las muestras se utilizó difracción de rayos-X de ángulo amplio en un difractómetro Siemens D5000 con radiación CuK α (λ =1.5416Å) con un paso de 0.02° con un tiempo de de 3s en el intervalo 2 θ =5 – 60 grados.

2.3.4 Ángulo de contacto

La obtención del ángulo de contacto estático (θ) de los diferentes polímeros estudiados se llevó a cabo por medio de un equipo VCA Optima utilizando agua destilada.

2.3.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JEOL, JSM 6360LV) acoplado a un EDX (Oxford Instruments, INCA Energy 200), para analizar la morfología de la superficie de los poliuretanos y su composición elemental. Para visualizar la adhesión plaquetaria, se empleo un microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo (FEG-SEM, S4700, Hitachi).

2.3.6 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El análisis de la topografía y rugosidad se llevaron a cabo en un área de 90 µm x 90 µm, por medio de un equipo de microscopia de fuerza atómica (AFM, AMBIOS, UNIVERSAL) en modo wavemode con una velocidad de barrido de 1Hz.

2.3.7 Caracterización térmica

2.3.7.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los poliuretanos sintetizados fueron caracterizados mediante DSC utilizando un DSC-7 Perkin-Elmer. Para ello, muestras de 5 a 10 mg del polímero fueron encapsulados en charolas de aluminio y calentados de 0 a 170°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min., bajo una atmósfera de nitrógeno. Se registraron el primero y el segundo termograma para cada muestra.

El porcentaje de cristalinidad relativa (Xc) de la PCL en los PUUS fue determinada a partir de la entalpia de fusión usando la siguiente ecuación¹²¹:

$$\% Xc = \frac{\Delta H_f}{w_{ss} \times \Delta H^\circ_f} x100$$
 Ec.1

Donde ΔH_f es la entalpia de fusión de la PCL obtenida experimentalmente de los PUUS, w_{ss} es la fracción en masa del segmento flexible y ΔH°_{f} es la entalpia de PCL 100% cristalina tomada como 136 J/g ^{68, 121}.

2.3.7.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Las temperaturas de descomposición fueron determinadas mediante análisis termogravimétrico utilizando un equipo TGA-7 Perkin-Elmer. Los poliuretanos fueron calentados de 50°C a 650°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min., bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de descomposición se reporta como el pico después de obtener la derivada de la curva de masa residual vs. temperatura.

2.3.7.3 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

El análisis térmico dinámico mecánico se realizó con un equipo DMA-7 Perkin Elmer en modo de extensión. Las muestras fueron estudiadas en un intervalo de -100 a 100°C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min., aplicando una fuerza estática de 90 mN, una fuerza dinámica de 70 mN y 1 Hz de frecuencia. Para este análisis se emplearon probetas con dimensiones aproximadas de 15 mm de longitud por 3.5 mm de ancho y 0.1 mm de espesor.

2.3.8 Caracterización mecánica

Las pruebas de tensión se llevaron a cabo en una máquina de pruebas MINIMAT, con una celda de carga de 200 N y utilizando una velocidad de cabezal de 50 mm/min. Los especímenes fueron cortados con dimensiones de 15mm x 2mm x 0.11 mm dejando un espacio entre mordazas de 5 mm. Con estos ensayos se determinó el porcentaje de deformación (ϵ), la resistencia máxima (σ) y el módulo elástico al 100% de deformación de los PUUS (E₁₀₀).

2.3.9 Determinación de los pesos moleculares

Los pesos moleculares fueron determinados por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC). El análisis se realizó empleando un cromatógrafo de permeación en gel (GPC Agilent 1100) equipado con dos columnas (Zorbax PSM 60S y Zorbax PSM 1000S) y un detector de índice de refracción. Como eluyente se utilizó dimetil formamida (DMF grado HPLC) con un flujo de 1 ml/min a 50°C. La curva de calibración se obtuvo con estándares de poliestireno (1 mg/ml en DMF) en el intervalo de 1050 a 420 600 g/mol.

2.4 Estudios de Degradación

2.4.1 Degradación en Buffer de fosfato salino

Películas de SPU de 1.5 x 3 cm, con una masa aproximada de 50 mg, se degradaron en viales con buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.4 con 5% de Tween

20 y se mantuvieron a 37°C¹²². La solución fue cambiada cada semana y se obtuvieron muestras a 7, 28, 56, 84, 112, 140 y 168 días de degradación. El agua superficial fue removida con papel filtro y se pesaron las muestras para calcular el porcentaje de absorción de agua utilizando la ecuación 2.

$$\%Absorción = \frac{m_f - m_i}{m_i} x100$$
 Ec.2

Donde m_f es la masa final de la muestra y m_i es la masa inicial de la muestra. Por su parte, la pérdida de masa fue calculada por medio de la ecuación 3.

$$\% MasaPerdida = \frac{m_i - m_f}{m_i} x100$$
 Ec.3

En este caso m_f representa la masa final de la muestra después de secar 24 h a 60°C y presión reducida; m_i es de nuevo, la masa inicial de la muestra.

El peso molecular de las películas degradadas en buffer de fosfato salino fue monitoreado por GPC de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.3.9.

2.4.2 Degradación acelerada

La degradación acelerada se llevó a cabo por reflujo a 100°C por 24 h en soluciones de HCl 2M, NaOH 5M, H_2O_2 al 30%, NaClO al 6% y agua destilada como control¹²³. Los residuos de la degradación fueron lavados y secados a 60°C y presión reducida. Se calculó el porcentaje de pérdida de masa con la ecuación 3.

La caracterización de los residuos sólidos de la degradación se realizó por medio de FTIR, como se describe en la sección 2.3.1, incorporando cada muestra a una pastilla de KBr.

2.5 Pruebas de hemocompatibilidad

2.5.1 Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa (Método de Lee-White)

El interior de tubos de ensayo de vidrio fue recubierto con los polímeros sintetizados por medio de evaporación de THF. Como control comercial fue empleado Tecoflex[®], mientras que tubos de vidrio sin recubrir se utilizaron como control positivo.

El tiempo de coagulación (C_T) se determinó utilizando sangre venosa completa sin anticoagulante y recién extraída de voluntarios sanos, libres de medicación. Aproximadamente 3 ml de sangre se extrajeron directamente en los tubos recubiertos (por medio de agujas y camisa vacutainer[®]) y se midió el tiempo de coagulación de manera visual. El tiempo se empezó a contabilizar al inicio de la extracción de la sangre y se tomó el tiempo al que se observó el primer coágulo.

2.5.2 Adhesión de plaquetas radiomarcadas

Las pruebas de hemocompatibilidad se llevaron a cabo usando plasma rico en plaquetas radiomarcadas con ¹¹¹In-oxina de acuerdo al protocolo seguido por Pousard *et.al.*²³ Este isótopo, se ha empleado extensamente para diagnóstico clínico ya que se adhiere a las células sanguíneas tanto *in vivo* como *ex vivo*¹²⁴⁻¹²⁶. Estas pruebas son recomendadas por la norma ISO10993-4 para la evaluación biológica de dispositivos médicos y selección de pruebas para dispositivos en contacto con sangre.

2.5.2.1 Radiomarcaje de plaquetas

Para el radiomarcaje, se recolectó sangre por venopuntura de tres voluntarios adultos sanos. 50 ml de sangre fueron recolectados por voluntario, agregados a 10 ml de citrato de dextrosa; esta muestra fue centrifugada a 1000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Un segundo periodo de

centrifugación de 10 minutos a 2300 rpm permitió aislar las plaquetas del plasma pobre en plaquetas (PPP).

Las plaquetas aisladas fueron resuspendidas en una solución salina balanceada de Hank (HBSS por sus siglas en ingles) a pH = 7.4 e incubado con 200 μ Ci (micro curio, unidad de radiactividad) de ¹¹¹In-oxina por 15 min a temperatura ambiente. La suspensión fue centrifugada a 2100 rpm por 8 minutos para remover la ¹¹¹In-oxina sin reaccionar. Las plaquetas radiomarcadas fueron resuspendidas en PPP hasta alcanzar una concentración de 250x10⁶ plaquetas/ml.

2.5.2.2 Cuantificación de plaquetas adheridas

Discos de 8 mm de diámetro de cada PUUS fueron cortados y sumergidos en un plato de cultivo de 24 pozos conteniendo 500 µl de la suspensión celular (250x10⁶ plaquetas/ml). Estas se mantuvieron en agitación por una hora a temperatura ambiente.

Después de una hora de incubación las muestras fueron removidas de la suspensión plaquetaria, enjuagadas cuidadosamente en solución de NaCl y fijadas en formalina. Las plaquetas marcadas fueron cuantificadas usando un Gamma Counter 1470 Wizard[™] (Wallac) ajustado a 360-480 KeV. La depositación plaquetaria fue calculada usando la ecuación 4.

$$DP = \frac{M_{cpm} x N}{P_{cpm} x S} x100$$
 Ec. 4

Donde *DP* es el número de plaquetas depositadas por centímetro cuadrado de superficie expuesta, M_{cpm} es la radiación emitida por las plaquetas radiomarcadas depositadas en la muestra después del experimento, *N* es el número de plaquetas en 1ml de plasma, P_{cpm} es la radiación emitida por las plaquetas radiomarcadas contenidas en 1 ml de plasma y finalmente *S* es la superficie expuesta medida en cm².

2.5.2.3 Morfología de las plaquetas adheridas

Para observar la morfología de las plaquetas, las muestras fueron deshidratadas por inmersión en diferentes mezclas de agua:etanol (30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100%) por 15 min a cada concentración, seguido de un secado a punto crítico con CO₂ líquido como fluido de transición. Después, las muestras fueron recubiertas con oro para su observación por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB) como se mencionó en la sección 2.3.5.

2.6 Citocompatibilidad

La citocompatibilidad fue evaluada por medio de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) ya que éstas forman parte de la pared celular en contacto con la sangre. El cultivo celular, la preparación de extractos, así como la determinación de viabilidad celular fueron llevados a cabo tomando en cuenta la norma ISO10993-5 que establece las condiciones para la evaluación biológica de biomateriales.

2.6.1 Cultivos Celulares

Las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC ATCC®) fueron cultivadas en frascos (Figura 2.3) conteniendo medio M200 libre de rojo fenol (M200 PRF, Invitrogen) suplementado con 1% v/v penicilina/estreptomicina (solución de penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Invitrogen) y 2% v/v de LSGS (Low serum growth supplement, Invitrogen).



Figura 2.3. Frascos de cultivo y células adheridas

Con la finalidad de subdividir las células, estas fueron despegadas del frasco de cultivo empleando tripsina-EDTA 0.05% hasta que las células alcanzaran una morfología redondeada. La tripsina fue inhibida con medio de cultivo suplementado con suero, a continuación la suspensión celular fue centrifugada a 180 x g por 7 minutos y posteriormente la concentración celular fue ajustada con medio de cultivo fresco a una concentración 2.5 x 10³ células/cm². Las células fueron sembradas y cultivadas hasta alcanzar 90% de confluencia.

2.6.2 Citotoxicidad de extractos

2.6.2.1 Obtención de extractos a pH fisiológico

Las películas de poli (urea uretanos) segmentados fueron lavados con buffer de fosfato salino pH 7.4 (PBS, por sus siglas en inglés) durante 1 hora y luego fueron esterilizados por medio de luz ultravioleta durante 30 minutos de cada lado. Las muestras fueron sumergidas en medio de cultivo completo suplementado con suero y antibióticos usando una relación PUUS/medio de 100 mg/ml. Las muestras fueron incubadas por 24 h a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la difusión de los lixiviados al medio de cultivo. Después de esta extracción, el medio de cultivo fue esterilizado pasándolo a través de un filtro con membrana de nylon y poro de 0.2 µm. Los extractos fueron diluidos con medio de cultivo estéril a 1:0, 1:10, 1:100 y 1:1000 (extracto:medio de cultivo).

2.6.2.2 Preparación de extractos con productos de degradación

Las películas de los PUUS fueron lavadas con buffer fosfato por 24 h y esterilizadas. Luego, con una proporción de 50 mg/ml fueron inmersas en medio de cultivo libre de suero y antibióticos a pH 4 previamente ajustado con HCl concentrado. Después de 15 días, las películas fueron rennovidas y el medio neutralizado con NaOH 1N. El medio fue filtrado y suplementado con suero y antibióticos. Los extractos resultantes fueron diluidos con una relación en volumen 1:0, 1:10, 1:100 y 1:1000, usando medio de cultivo estéril.
2.6.2.3 Ensayos de Citotoxicidad

Las células fueron cosechadas de los frascos de cultivo y una alícuota de la suspensión celular formada fue tomada para contabilizarlas utilizando un hematocitómetro y un microscopio invertido (Figura 2.4). El número de células fue ajustado a la concentración deseada (5 x 10³ células/ml).



Figura 2.4. Contabilización de células. a) Hematocitómetro, b) Microscopio invertido, c) cuadricula del hematocitómetro magnificada.

Las células fueron sembradas en platos para cultivo de 96 pozos usando 100 μ l de suspensión celular por pozo y fueron incubadas por 2 hora a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue removido de los pozos (cuidando no despegar las células adheridas al fondo del pozo) y después fueron adicionados los extractos (o los productos de degradación) y sus diluciones (tres pozos por dilución); se utilizó como control medio de cultivo fresco. Los platos fueron incubados 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂ (3 platos por tiempo). Después de cada tiempo de cultivo, la viabilidad fue ensayada por medio de la prueba de MTT.

2.6.2.4 Determinación de viabilidad celular por la prueba MTT

El reactivo MTT, también conocido como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazo1-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, es el más popular entre un conjunto de sales de tetrazolio, ya que puede ser usado en una amplia variedad de células. Este reactivo fue empleado por Mossman para establecer un sistema cuantitativo y automatizado, en el cual las células son ensayadas en un medio de cultivo, sin necesidad de lavarlas o darles otro tratamiento^{127, 128}.

La prueba de MTT fue llevada a cabo usando el kit Vybrant[®] MTT Cell Proliferation Assay (Invitrogen). Antes de iniciar la prueba, una solución 12 mM del reactivo MTT fue preparada. Una vez concluidos los diferentes tiempos de incubación establecidos en la sección 2.6.2.3, los extractos fueron removidos y reemplazados por 100 µl de medio de cultivo fresco y 10 µl de la solución de MTT 12 µM. El blanco fue preparado añadiendo 10 µl de solución de MTT a 100 µl de medio de cultivo fresco y sin células. Después de esto, los platos fueron incubados a 37°C por 4 horas.

Durante el período de incubación, el succinato deshidrogenasa mitocondrial y el citocromo c de las células vivas toman parte en la reducción del MTT (Figura 2.5).Como consecuencia de estos procesos metabólicos, aparecen cristales de formazan de color purpura oscuro en forma de aguja, rodeando las células¹²⁸. Entonces la cantidad de formazán producido puede correlacionarse con el número de células vivas¹²⁷. Para ello se procedió a solubilizar el formazán una vez concluidas las 4 horas de incubación.



Figura 2.5. Reacción de reducción del reactivo MTT llevada a cabo en las mitocondrias de las células vivas

La solubilización se llevó a cabo removiendo 85 µl de medio de cada pozo y el formazán insoluble fue disuelto adicionando 50 µl de DMSO y mezclando vigorosamente con la pipeta. Los platos fueron incubados a 37°C por 10 minutos y

Capítulo 2. Parte experimental

agitados nuevamente (Figura 2.6). Por último la densidad óptica (DO) fue medida a 540 nm por medio de un lector de platos (Microplate reader, µ Quant Biotek instruments Inc.). Para esta prueba se empleó medio de cultivo libre de rojo fenol, ya que este compuesto puede interferir en la cuantificación del formazán producido.



Figura 2.6. Plato de cultivo previo a la medición de DO.

El porcentaje de viabilidad celular relativa (%VCR) fue calculado con respecto al control, usando la siguiente ecuación:

$$\% VCR = \frac{DO_s - DO_B}{DO_c - DO_B} x100$$

Donde DO_s , DO_B y DO_C son las densidades ópticas de la muestra, el blanco (MTT en medio de cultivo sin células) y el control positivo, respectivamente.

2.6.3 Citocompatibilidad en contacto directo

La adhesión y proliferación celular fueron evaluadas mediante fluorescencia, ya que permite observar la morfología y distribución celular sobre la superficie de los materiales. La calceína AM y el homodímero de etidio son dos reactivos que pueden usarse independientemente o en conjunto para teñir células vivas y muertas de manera simultánea, ya que el primero es enzimáticamente hidrolizado a calceína en las células vivas, volviéndose verde fluorescente, mientras que el otro, solamente es capaz de entrar en células con una membrana dañada y teñir el ácido nucleico de las células muertas con un rojo fluorescente. Una vez teñidas las

49

Ec. 5

células, la cuantificación puede realizarse por espectrometría, mientras que la estructura y distribución celular pueden observarse por medio de un microscopio de fluorescencia o confocal¹²⁹.

2.6.3.1 Preparación de las superficies

Las muestras fueron depositadas sobre cubre objetos circulares (12 mm de diámetro) como se ha descrito previamente en la sección 2.3 y fueron secadas a 50°C para eliminar cloroformo residual. La esterilización se llevó a cabo por UV durante 30 minutos por cada lado, en una campana de flujo laminar y, posteriormente, fueron fijadas por medio de una gota de grasa de silicón estéril (Dow Corning[®] high-vacuum silicone grease) en platos de cultivo de poli(estireno) no tratado de 12 pozos. Las muestras fueron lavadas con buffer de fosfato 2 veces, tratadas 30 minutos adicionales en UV y guardadas hasta su uso. Cubre objetos recubiertos con poli-D-lisina (PDlys) y Tecoflex[®] fueron usados como control positivo y control comercial respectivamente.

2.6.3.2 Pruebas de adhesión celular

Para este experimento se tomó un frasco con células entre 80 y 90% de confluencia. Después de remover el medio de cultivo, las células fueron lavadas con buffer de fosfato salino para eliminar suero residual que pudiera reaccionar con la calceína y fueron teñidas con calceína AM. Para marcar las células se empleó calceína AM 1 µM usando el kit para adhesión celular (VibrantTM cell adhesion assay kit, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez teñidas, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo suplementado con suero y antibióticos y sembradas a una concentración de 5x10⁴ células/pozo. Después de 30 minutos y 1 hora de incubación, el medio de cultivo y las células no adheridas fueron removidos lavando con medio de cultivo libre de suero y eliminándolo por inversión del plato dos veces. Finalmente se agregó 500 µl de buffer de fosfato en cada pozo para su análisis.

2.6.3.3 Pruebas de proliferación celular

Células endoteliales no marcadas fueron sembradas sobre las muestras a una concentración de 2 x 10^4 células/pozo e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada segundo día con medio de cultivo suplementado.

Después de 1, 2 y 7 días, el medio de cultivo y las células no adheridas fueron removidos mediante una serie de lavados con buffer de fosfato. Se agregó a cada pozo 400 µl de una solución de calceína AM 2 µM y homodímero de etidio 2 µM (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity assay kit, Invitrogen). Las células fueron incubadas 40 minutos a temperatura ambiente (21°C) y oscuridad, después del cual fueron enjuagadas dos veces con buffer de fosfato y finalmente se le dejó acondicionar en 500 µl de buffer para su análisis.

2.6.3.4 Cuantificación de la adhesión y proliferación celular

La fluorescencia de las células marcadas fue cuantificada por medio de un lector de placas Microplate fluorescence reader FLX 800 (BIO-TEK instruments INC) usando una excitación de 494 nm y emisión de 517 nm. Los resultados fueron reportados como: Porcentaje de adhesión celular relativa (%ACR), porcentaje de viabilidad celular relativa (%VCR) y proliferación celular individual (PCI), empleando la siguiente ecuacione:

$$N_oACR = \frac{F_{muestra,t} - F_b}{F_{control,t} - F_b} x100$$
 Ec. 6

Donde $F_{muestra,t}$ representa la emisión de fluorescencia de las células vivas en las diferentes muestras a cada tiempo fijado; $F_{control,t}$ representa la emisión de fluorescencia de las células vivas en Poli-D-lisina con respecto al mismo tiempo y F_b es la fluorescencia del blanco (medio de cultivo sin células).Para calcular %VCR se utilizó la misma ecuación, sustituyendo $F_{control,t}$ con la fluorescencia de

Poli-D-lisina después de 24h de cultivo para todas las muestras. Por su parte, PCI fue calculado por medio de la ecuación 7.

$$PCI = \frac{F_{muestra,l} - F_b}{F_{muestra,24h} - F_b}$$
 Ec. 7

Donde $F_{muestra,t}$ es la fluorescencia de cada muestra a determinado tiempo de cultivo, $F_{muestra,24h}$ es la fluorescencia de la misma muestra pero a 24h y F_b es la fluorescencia del blanco (medio de cultivo sin células).

2.6.3.5 Microscopía celular

Las imágenes fueron obtenidas por medio de un microscopio de fluorescencia (Fluorescence inverted microscope, Nikon Eclipse TE200U) equipado con cámara (CDD Nikon digital camera DXM1200F) y filtros para calceína y etidio.

2.6.4 Análisis estadístico

Para las pruebas de citotoxicidad se analizaron cuatro formulaciones de poliuretanos (PUR, PUG, PUD y PUBDA), cuatro concentraciones de extracto (1:0, 1:10, 1:100 y 1:1000) y tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas). En cada experimento se utilizaron tres pozos por combinación; los experimentos se realizaron por triplicado (n=9). Para las pruebas de adhesión celular fueron realizados 3 experimentos por duplicado (n=6) a 30 minutos y 1 hora. Para las pruebas de proliferación celular fueron realizados 3 experimentos de incubación (1, 2 y 7dias).

Las pruebas de hemocompatibilidad se realizaron a cada formulación empleando sangre de tres voluntarios y por triplicado (n=9). Los promedios fueron analizados por medio de un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, usando la prueba de Tukey para la comparación de medias. Fueron ensayadas 9 muestras por formulación, tanto en las pruebas de citotoxicidad como en las pruebas de hemocompatibilidad. Un valor de P<0.05 fue aceptado como significativo.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de los poli(uretano ureas) segmentados (PUUS)

Los poliuretanos segmentados con prepolímero a base de H₁₂MDI y PCL diol, ya han sido sintetizados y caracterizados previamente por nuestro grupo de trabajo, utilizando extensores de cadena de tipo diol (butano diol y ditioeritritol); aunque estos poliuretanos mostraron buenas propiedades elastoméricas y de biocompatibilidad para su uso en aplicaciones cardiovasculares, la adhesión de células endoteliales debía ser mejorada para su uso en injertos vasculares^{130, 131}. Por lo tanto, durante esta tesis se propuso una nueva serie de poliuretanos segmentados utilizando el mismo prepolímero pero diferentes extensores de cadena a base de aminoácidos, ya que sus grupos amino y carboxílico pueden reaccionar con los isocianatos del prepolímero para formar enlaces urea y amida respectivamente⁶⁰ como se propone mediante la figura 3.1.



Figura 3.1. Enlaces urea (verde) y amida (azul) formados por la reacción entre los extensores (butanodiamina:BDA, arginina:R, glicina:G y ácido aspártico:D) y H₁₂MDI.

La PCL diol ha sido empleada principalmente por su capacidad de biodegradación de manera más lenta que otros poliésteres¹³², lo cual hace que los productos de degradación sean liberados de una manera gradual e inocua para el organismo, por otra parte se ha encontrado que los poliuretanos preparados con este macromonómero tienden a presentar propiedades elastoméricas. Por otra parte ha sido extensamente estudiado el efecto del peso molecular de la PCL diol usada en la síntesis de los poliuretanos, encontrándose diferencia significativa en las propiedades de los fisicoquímicas de los polímeros formados⁶⁹. Por lo tanto durante este trabajo se usó solamente la PCL2000. Por su parte el H₁₂MDI es un diisocianato alifático utilizado en formulaciones comerciales como el tecoflex[®] para sustituir los compuestos aromáticos ya que la amina formada como producto de su degradación es considerada no tóxica⁸⁶.

Parámetros como la temperatura, tiempo de reacción, solvente y catalizador; así como la composición del prepolímero y la proporción molar de los componentes, no fueron variadas, con el objetivo de aislar el efecto de los extensores en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los PUUS.

Por su parte los aminoácidos empleados como extensores de cadena fueron elegidos en base a su diferente pH y su habilidad para formar especies cargadas en condiciones fisiologicas, de esta manera se eligió un aminoácido básico (L-arginina), uno neutro (glicina) y uno ácido (ácido aspártico), ya que se ha encontrado que las superficies cargadas tienden a promover la adhesión celular¹³³, además que estos aminoácidos forman parte de la secuencia peptidica RGD que se encuentra presente en ciertas proteínas y se encarga de promover la adhesión celular⁴.

La BDA fue empleada como control de reacción por sus dos grupos amina; éste, al igual que la glicina son monómeros bifuncionales que forman PUUS lineales; aunque las reacciones secundarias, como la formación de acilureas, alofanatos o

biuret, pueden producir entrecruzamiento o ramificación en los poliuretanos, estas reacciones no son tan comunes a la temperatura y a las proporciones de diisocianato que fueron empleadas en esta reacción; por otra parte, una pequeña proporción de estas reacciones son deseables ya que pueden aumentar el peso molecular y proporcionar mayor resistencia a los polímeros¹³⁴.

La L-arginina y el L- ácido aspártico presentan una funcionalidad mayor de dos; no obstante, el entrecruzamiento químico se encuentra limitado por las diferentes reactividades de los grupos funcionales, la cantidad de diisocianato y los impedimentos estéricos en estas reacciones¹³⁵. La figura 3.2 muestra las estructuras lineales esperadas.



Figura 3.2. Estructura lineal esperada de PUUS preparados con aminoácidos.

Otro aspecto que puede influir en las reacciones para la formación de poliuretanos es la presencia de humedad, por lo que es necesario eliminarla tanto como sea posible (especialmente en la etapa del prepolímero) ya que el agua compite con los grupos hidroxilo del poliol para reaccionar con el diisocianato. Durante la reacción de extensión, aunque se agregó cierta cantidad de agua (entre 0.25 a 0.75 ml) al acidular la solución de DMF y aminoácido (para mejorar la miscibilidad y poder agregar los aminoácidos a la reacción) no se perdió la reactividad ya que los grupos isocianato pueden reaccionar más rápidamente con grupos amino que

con el agua (aproximadamente 1000 veces más rápido)¹³⁶ y, aunque la velocidad de los grupos amino disminuye con el HCl, la caracterización química que se presenta a continuación muestra indudablemente que los PUUS fueron obtenidos. Por otra parte la formación de los enlaces amida si puede verse afectada con la presencia de agua, ya que los grupos isocianato reaccionan 2.5 veces más rápido con agua que con los grupos carboxílico.

3.2 Caracterización química y superficial

3.2.1 Solubilidad

Los PUUS mostraron diferente grado de solubilidad en DMF, THF, cloroformo y etanol. En el caso del PUBDA y PUD resultaron totalmente solubles en estos disolventes excepto en etanol donde solo se hinchó considerablemente, mientras que el PUR y el PUG presentaron una pequeña proporción de material insoluble en el siguiente orden DMF>Cloroformo>THF, aunque estos polímeros también fueron insolubles en etanol. La dificultad para solubilizarse puede deberse tanto a los enlaces uretano como a su alto peso molecular, aunque también pudiera estar presente cierto grado de entrecruzamiento por reacciones secundarias. En todo caso, los poliuretanos fueron predominantemente solubles lo que facilitó la preparación de películas densas por evaporación de disolvente, útiles para la caracterización de estos materiales.

3.2.2 RMN ab holder not all mad as a concern all me hulles been not a set

Los PUUS fueron analizados por ¹H RMN y ¹³C RMN para la determinación de la estructura química. En la figura 3.3 se observa que el área de los picos de la PCL se presentan en mayor proporción que los picos correspondientes a los protones alifáticos del H₁₂MDI, los cuales se observan entre 1-2 ppm; esto era esperado de acuerdo a la relación molar utilizada en la preparación de estos poliuretanos.

a equienato pueder muccione más rápidamente con enz pe amine o

En cuanto a los grupos formados durante la reacción, el pico correspondiente al protón del grupo uretano no pudo ser observado por su baja proporción con respecto a los protones del segmento flexible. En tanto que los protones adyacentes a los grupos uretano y urea del extensor presentes a 3.19 ppm solo pudieron ser observados en PUBDA por la simetría del BDA, no así en el caso de los aminoácidos los cuales son asimétricos; sin embargo la reacción de extensión fue confirmada por el pico a 3.39 ppm correspondiente a los protones del carbono pertenecientes al H₁₂MDI y adyacente al los grupos uretano y urea.





El análisis por ¹³C RMN solo permitió observar los picos correspondientes a los carbonos del segmento flexible. Un análisis de polímeros conteniendo solo el

segmento rígido se pensó que serían útiles para observar los picos de este segmento, sin embargo los polímeros sintetizados solo con H₁₂MDI y extensor fueron insolubles, lo que dificultó el análisis por RMN, aunque fueron analizados por FTIR como se muestra más adelante.

3.2.3 FTIR

La figura 3.4 muestra los espectros de infrarrojo para los PUUS. Al igual que los espectros de RMN, los espectros de infrarrojo fueron muy similares entre sí debido a la alta proporción de PCL presente en las formulaciones (alrededor de 75%), por lo tanto no todos los grupos funcionales mostrados en la figura 3.2 pudieron identificarse por esta técnica. Sin embargo, fueron observadas algunas absorciones características de los PUUS tales como las correspondientes a los grupos uretano del segmento rígido a 1529 y 1228 cm⁻¹ (por vibraciones de estiramiento tipo amida II y amida III respectivamente) y los grupos N-H alrededor de 3323 cm⁻¹ (por vibraciones de estiramiento tipo amida A).

Los grupos carbonilo del segmento flexible se observaron por medio de una banda intensa alrededor de 1733 cm⁻¹ la cual enmascara las bandas del carbonilo del grupo uretano. Por su parte una banda menos intensa a 1636 cm⁻¹ confirmó la presencia de grupos urea formados durante la reacción de extensión. Los dos grupos amino altamente reactivos de la BDA conducen a la formación de estos enlaces cuando reaccionan con los isocianatos del prepolímero, por lo que se presenta una banda bien definida en la formulación conteniendo esta diamina; en contraste, en el PUR, en el PUG y en el PUD solo se observó un hombro a este numero de onda, resultado esperado debido a la variedad de grupos funcionales contenidos en los diferentes aminoácidos, produciendo diferentes proporciones de enlaces urea, amida así como carboxílicos residuales los cuales se traslapan unas con otras a esta frecuencia.



Figura 3.4. Espectros de FTIR de los poliuretanos. A) PUBDA, B) PUR, C) PUG y D) PUD.

Además de ayudar al esclarecimiento de la composición química de los productos de reacción, el FTIR es una herramienta común en el estudio de interacciones moleculares responsables de la separación de fases en los poliuretanos segmentados. Los enlaces tipo amida A, amida I y amida II son especialmente útiles para determinar la segregación de fase y los puentes de hidrógeno intermoleculares en los poliuretanos. La figura 3.5 muestra los diferentes enlaces así como las posibles interacciones que pueden estar presente en este tipo de polímeros ^{137, 138}.



Figura 3.5. Tipos de enlace e interacciones por la reacción de hidroxilos, aminas y carboxílicos con isocianatos.

Un análisis más detallado de las bandas en la región de amida A, presentes en los poliuretanos estudiados (figura 3.6), indica la formación de puentes de hidrógeno entre los segmentos rígidos por la presencia de la banda a 3360cm⁻¹ correspondiente a enlaces N-H enlazados por puente de hidrógeno mientras que el hombro a menor frecuencia (3520cm⁻¹), indica menor proporción de enlaces N-H libres. Por su parte, en la región de 1600 a 1760 cm⁻¹ presentada en la figura 3.7, muestra una serie de bandas traslapadas, correspondientes al estiramiento asimétrico de carbonilos de éster, uretano, urea, amida y carboxílicos^{139, 140}.

60



Figura 3.6. Ampliación de la región amida A en el espectro de infrarrojo de los poliuretanos.

En el caso del grupo urea, éste está compuesto de tres bandas: carbonilo libre, puente de hidrógeno monodentado (pobremente enlazado) y puente de hidrógeno bidentado (fuertemente enlazado). Este último corresponde a la banda presente a 1633 cm⁻¹, la cual se encuentra bien definida especialmente en PUBDA y PUR, el hombro a menor frecuencia (1660 cm⁻¹) puede asociarse tanto al enlace monodentado de la urea como al enlace amida por lo que éste es más intenso para PUG y PUD^{141, 142}. Por su parte, la banda intensa a 1733 cm⁻¹ del carbonilo de los grupos éster del segmento flexible, enmascara las señales de los carbonilos de urea libre, uretano enlazado, uretano libre y carboxílico ya que se encuentran en un intervalo cercano de frecuencia; sin embargo, la falta de simetría de esta banda indica la presencia de estos enlaces.

Con base en las observaciones anteriores, se sugiere una mayor separación de fase en el PUBDA en comparación con los poliuretanos con aminoácidos, aunque entre éstos PUR presenta una mayor proporción de enlaces urea enlazados, los

cuales se caracterizan por formar puentes de hidrógeno fuertes que contribuyen a la segregación de fases en los PUUS¹⁴².



Figura 3.7. Ampliación de la región amida I en el espectro de infrarrojo de los poliuretanos.

El análisis por FTIR de los poliuretanos modelo (ver figura 3.8), obtenidos a partir de H_{12} MDI y extensor de cadena en una proporción 1:1, permitieron confirmar que los aminoácidos reaccionan con el diisocianato tal como fue propuesto en la figura 3.1, los grupos amina reaccionan para formar enlaces urea, en tanto que los grupos carboxílico reaccionan para formar un grupo anhídrido inestable que deriva

en una amida y dióxido de carbono. La glicina, la cual es bifuncional, pierde tanto su grupo amina como su ácido carboxílico por reacción con los diisocianatos, en tanto que en el caso de arginina y acido aspártico, presentan bandas anchas entre 3000 y 3800 característicos de ácidos carboxílicos.





3.2.4 MEB y EDX

Las micrografías obtenidas por el MEB mostraron la formación de superficies más lisas cuando éstas fueron depositadas sobre un soporte de vidrio por medio de la técnica de 'spin coating', que cuando se prepararon por evaporación de disolvente en molde de teflón. La evaporación del disolvente rápida y fácil en la primera técnica, así como la incubación a 50°C para eliminar el disolvente residual contribuyeron a esta morfología en la superficie (figura 3.9). Por otro lado, al preparar las películas por evaporación de THF en molde de teflón se observó aglomerados en el caso de PUD y en el caso del PUR, PUG y PUBDA se observó la formación de poros en la superficie como se aprecia en la figura 3.10.

Esta susceptibilidad para formar poros depende del método de preparación de la película, en este caso la solución fue calentada para acelerar la disolución del

polímero mientras que las películas preparadas sin este calentamiento, como en el caso de las películas utilizadas para las pruebas de hemocompatibilidad no presentaron poros (como se muestra más adelante).



Figura 3.9. Vista superficial de películas de PUBDA, PUR, PUG y PUD obtenidas mediante spin coating sobre un sustrato de vidrio.

La presencia del ácido clorhídrico residual fue confirmada por el análisis elemental por EDX, donde se observó la presencia de cloro en los poliuretanos a base de

aminoácidos. El PUR presentó $0.153\% \pm 0.015$ de cloro, el PUG mostró $0.11\% \pm 0.00$ y el PUD $0.09\% \pm 0.026$.



Figura 3.10. Vista superficial de películas de PUBDA, PUR, PUG y PUD obtenidas por evaporación de THF en un mólde de teflón.

3.2.5 AFM

Las muestras preparadas por 'spin coating' fueron analizadas por AFM para la evaluación de su topografía, y aunque por MEB se aprecia una superficie lisa

producto de una estructura unitaria en el polímero, la observación por AFM mostró superficies considerablemente homogéneas pero significativamente rugosas como lo muestran los altos valores de rugosidad (RSM) con una gran cantidad de crestas y valles, como puede observarse en la figura 3.11.



Las imágenes obtenidas se deben a que los polímeros contienen una alta proporción de segmento flexible que además tiende a cristalizar; así las protuberancias pueden estar asociadas con la policaprolactona cristalina del segmento flexible presente en los polímeros como lo evidencia el análisis por DRX y DSC, y que contribuye a la separación de fases en estos PUUS.

En este sentido, el análisis por AFM al aire ha sido empleado para observar la separación de fase en los poliuretanos¹⁴³ ya que la presencia de un segmento rígido polar y un segmento flexible relativamente no polar puede producir una heterogeneidad en el polímero, siendo esto responsable de la formación de los microdominios así como de una separación de fases ^{144, 145}. Sin embargo en este caso aunque se pudo observar una separación de fases, no fue posible observar los microdominios por las limitantes del equipo ante la alta rugosidad que presentan las muestras. Por otra parte, la presencia de microdominios de segmento rígido o separación de microfases puede ser comprobada por otras técnicas como la caracterización térmica y las propiedades mecánicas las cuales están correlacionadas directamente con la tasa y grado de separación de fase¹⁴⁶.

3.2.6 Ángulo de Contacto

Una gota depositada sobre la superficie de un sólido, también llamada gota sésil, pone de manifiesto la mojabilidad de dicha superficie. El análisis de su forma permite determinar magnitudes como el ángulo de contacto¹⁴⁷.

La figura 3.12 muestra los valores de las imágenes de la gota de agua sobre la superficie de los materiales estudiados, así como los valores del ángulo de contacto obtenidos en este análisis. Las superficies muestran un comportamiento ligeramente hidrofóbico propio de los poliuretanos preparados con PCL diol debido a los cinco metilenos presentes en su unidad repetitiva, además de la alta proporción de PCL presente en los PUUS sintetizados. Aunque no se observó una diferencia significativa entre los ángulos de contacto del PUBDA y los poliuretanos

con arginina (PUR) y glicina (PUG), en el caso de PUD se observa un valor ligeramente menor lo que nos sugiere la presencia de grupos carboxílicos en la superficie. La mojabilidad es importante porque conduce a una mejor adhesión celular y desempeño biológico así como una mayor resistencia a la degradación de la superficie del material *in vitro*^{148, 149}.



Figura 3.12. Imágenes digitalizadas de una gota de agua y su respectivo ángulo de contacto en cada uno de los PUUS estudiados.

3.2.7 Difracción de rayos X (DRX)

El análisis por DRX se realizó en los PUUS como se observa en la figura 3.13, donde sobresalen los picos correspondientes a los ordenamientos cristalinos de la PCL (20= 21.5 y 23.6) tal y como ha sido reportado para la PCL pura⁶⁴. Este comportamiento es común en los poliuretanos sintetizados con PCL 2000 (PCL diol con Mn=2000g/mol) los cuales, tienden a ser semicristalinos, comparado con poliuretanos sintetizados con PCL de menor peso molecular, los cuales tienden a ser mas amorfos⁶⁹.

In the loss materials and values de las imágenes de la goin de eque e de la point de region e de la de la companie de la valore (el de materiales condicials), la companie de la companie de la polarente propie de la polarente polarente de la condición en condición en condición de la polarente de la polarente polarente propie de la polarente polarente de la regione de la polarente de la pola





3.3 Caracterización térmica

3.3.1 DSC

Los termogramas de DSC (figura 3.14) fueron consistentes con los resultados observados por DRX, ya que mostraron un pico de fusión alrededor de 53°C excepto el PUD que funde a 61°C. Esta fusión es atribuible al segmento flexible a base de PCL y es común en poliuretanos preparados con PCL 2000g/mol^{91, 93}. En este caso, las entalpias de fusión fueron determinadas y utilizadas para obtener los porcentajes de cristalinidad relativa(*Xc*) como se especificó en la metodología. La tabla 3-I muestra los porcentajes de segmento rígido y flexible esperados y las propiedades térmicas de los PUUS, puede notarse que no hay mucha diferencia entre los porcentajes de cada segmento con respecto a cada formulación; sin embargo los cálculos del porcentaje de cristalinidad mostraron una disminución en el siguiente orden PUD>PUG>PUR>PUBDA. La presencia de PCL cristalina es un

factor importante, pues está relacionado con otras propiedades del material, como el comportamiento mecánico y la rapidez de degradación ^{150, 151}.

En cuanto a la Tg del segmento rígido, este no pudo apreciarse en el intervalo de temperaturas utilizado (de 0°C hasta 160°C), ya que por encima de esta última empiezan a observarse picos de descomposición.



Figura 3.14. Termogramas de DSC de los PUUS, ____ primera y ----- segunda corrida.

PUUS	%SS	%SR	Tg*	Tm	%Xc	
PUBDA	76.16	23.84	43	54	16	
PUR	73.74	26.25	39	53	38	
PUG	76.54	23.45	34	53	46	
PUD	74.88	25.12	ND	61	52	

Tabla 3-I. Propiedades térmicas de los PUUS

*La Tg fue determinada con respecto a la Tα obtenida por DMA

3.3.2 DMA

DMA permite observar diferentes tipos de transiciones y relajaciones para que estas sean relacionadas con su morfología¹⁵². Los termogramas de los PUUS sintetizados fueron obtenidos de las películas preparadas por evaporación de disolvente, con excepción de PUD que resultó muy frágil para este análisis. Las gráficas de las figura 3.15A y 3.15B muestran el módulo de almacenamiento (E') y el factor de disipación (Tan δ) respectivamente. Se puede observar una menor rigidez en el PUBDA por su menor contenido de PCL cristalina, además que su mayor facilidad para formar puentes de hidrógeno por sus enlaces urea, contribuyen a su comportamiento elastomérico; en tanto que los materiales con aminoácidos muestran una mayor rigidez, además que ya que los residuos del aminoácido contiene grupos colgantes que pueden interferir en la formación de estos puentes de hidrógeno y propiciar una mayor miscibilidad en las cadenas.

Por otra parte, la variación de Tan δ con la temperatura muestra una transición α bien definida alrededor de -40°C para el PUBDA donde esta transición puede relacionarse con la Tg del material ¹⁵². Esta transición se desplaza en PUR y PUG indicando cierta miscibilidad del segmento flexible o entrecruzamiento de las cadenas; esta transición no fue bien definida debido a las interacciones relacionadas al extensor de cadena.

3.3.3 TGA

Los termogramas presentados en la figura 3.16A y 3.16B muestran una descomposición notable entre 300 y 400°C, con un máximo de descomposición alrededor de 350°C. Esto se debe a que tanto el segmento flexible como el rígido se descomponen en este intervalo de temperaturas. En el caso de la PCL pura, se ha reportado una T_d inicial a 260°C al 1% de pérdida de masa y una degradación térmica máxima alrededor de los 388°C^{153, 154}. Sin embargo, se puede apreciar una pequeña diferencia en las temperaturas de descomposición posiblemente por

efecto del extensor de cadena, que hace al PUD ligeramente más termoestable y al PUG ligeramente menos termoestable que los demás polímeros analizados.



Figura 3.15. Termogramas de DMA. a) Módulo de almacenamiento vs. Temperatura, b) Tangente delta vs temperatura.

roquena ofgrenda yn ias tempetolitras de descomposición ocubierne de por





3.4 Caracterización mecánica

Los materiales usados como injertos vasculares deben presentar adecuadas propiedades mecánicas no solo durante su manufactura, sino también para soportar la carga requerida durante su desempeño *in vivo*^{11, 155}. La evaluación de

la resistencia a la tensión y la deformación máxima son parámetros comúnmente evaluados en este tipo de materiales. Éstos son afectados por factores tales como el contenido de segmento flexible y rígido en la estructura del poliuretano, energía de cohesión, grado de empaquetamiento de las macromoléculas, separación de fase, grado de entrecruzamiento, cristalinidad, etc.¹⁵⁶

De acuerdo a la figura 3.17, los PUUS obtenidos con aminoácidos como extensores de cadena mostraron un comportamiento plástico inicial, aunque después del punto de cedencia tuvieron un comportamiento elastomérico, excepto en el caso del polímero con ácido aspártico (PUD). El PUR presentó una deformación máxima similar al poliuretano comercial Tecoflex[®] y una resistencia última equivalente al polímero comercial. Por su parte, el PUG presentó un comportamiento similar a PUR, aunque exhibió una menor resistencia última y menor deformación. Este aumento en la resistencia, puede atribuirse a la naturaleza segmentada de los polímeros y a los puentes de hidrógeno de los grupos uretano además de los puentes de hidrogeno formados por los enlaces urea¹⁵⁷.

La morfología de microfase separada, característico de los poli(urea uretanos) y poliuretanos segmentados, le confiere a estos materiales excelentes propiedades, tales como alta resistencia a la tensión y alta flexibilidad, ya que el segmento duro (diisocianato más extensor de cadena) actúa como refuerzo y el segmento suave (PCL diol) le confiere flexibilidad al polímero¹⁵⁸. Además el incremento en el modulo inicial y la resistencia a la tensión también puede ser asociada a la PCL cristalina, ya que los cristales pueden actuar como entrecruzamiento físico de una manera similar al descrito para el segmento rígido^{66, 68}. La tabla 3.II muestra, en resumen, las propiedades mecánicas de los PUUS, el modulo tangencial o modulo al 100% de deformación fue determinado con el fin de unificar los resultados, ya que no todos los PUUS muestran el comportamiento plástico inicial.

Las propiedades mecánicas del PUR y SPUG parecen atractivas para su uso en aplicaciones cardiovasculares por su comportamiento elastomérico combinado con su alta resistencia y flexibilidad, comportamiento similar al exhibido por el Tecoflex® y el PUBDA y aunque la rigidez inicial atribuida a la PCL cristalina pudiera ser indeseable, el aumento en la proporción de segmento rígido pudiera eliminar este problema.



Figura 3.17. Curvas esfuerzo vs. deformación representativas de los PUUS sintetizados con aminoácidos.

	E ₁₀₀ (MPa)	σ _{max} (MPa)	Emax		
PUBDA	2.09±0.2	22.45±3.52	982±103		
PUR	4.26±0.8	37.99±5.45	1586±167		
PUG	3.85±0.4	13.79±1.54	1216±87		
TECOFLEX ®	1.39±0.41	36.18±3.22	1478±112		

Tabla 3-II Propiedades mecánicas de los PUUS

3.5 Pesos moleculares

De acuerdo al análisis por cromatografía de exclusión de tamaños (tabla 3.III), los PUUS con arginina y glicina presentaron altos pesos moleculares, comparables con PUBDA y otros poliuretanos reportados preparados a base de aminoácidos y PCL⁹⁵. El peso molecular fue suficientemente alto para impartir una alta resistencia y distensibilidad a las películas preparadas por evaporación del disolvente. En el caso del PUD, éste presentó una distribución bimodal con una fracción oligomérica resultando en un material no elastomérico y muy frágil, lo cual impidió su caracterización mecánica. El éxito en la extensión de la cadena para el caso del PUR pese a la solución acuosa de ácido clorhídrico agregado en esta fase, se debe a que la reacción de los grupos amino con los grupos diisocianato es aproximadamente 1000 veces más rápida que la reacción entre el agua y diisocianato¹³⁶. Por otra parte, la forma protonada del grupo amino propició una velocidad adecuada para la formación del poliuretano.

La estrecha polidispersidad en PUBDA, PUG la cual no corresponde a polímeros sintetizados por poliadición, puede deberse a que el análisis se realizó solo a la parte soluble del polímero a diferencia de PUR que fue completamente soluble.

	Mn	Mw	
	g/mol	g/mol	D
PUBDA	128 020	177 590	1.38
PUR	189 320	420 280	2.21
PUG	124 580	190 310	1.52
PUD	40 257	55 458	1.37

3.6 Degradación

3.6.1 Degradación en Buffer

La degradación en buffer de fosfato salino a pH 7.4 y 37°C de temperatura, fue empleada para simular las condiciones normales de pH y temperatura en el cuerpo humano, no obstante que los fluidos corporales podría contener agentes oxidantes o hidrolíticos de manera localizada, estas condiciones son utilizadas comúnmente para evaluar los polímeros biodegradables^{159, 160}. Los grupos carbonilo del poliéster son especialmente susceptibles a la degradación hidrolítica, y aunque los enlaces urea y uretano también podrían hidrolizarse, estos son mucho más estables¹⁶⁰. Los mecanismos de degradación hidrolítica se presentan en la figura 3.18.





3.6.1.1 Absorción de agua y pérdida de masa

La absorción de agua se incrementó en diferente proporción dependiendo de cada uno de los materiales estudiados como se puede observar en la figura 3.19A. Por ejemplo, después de 7 días de degradación en el PUBDA se observó un porcentaje de alrededor del 5% de absorción de agua y este valor no varió

significativamente a los demás tiempos de degradación. Sin embargo, los polímeros conteniendo aminoácidos mostraron un incremento en la absorción de agua después de 112 días, especialmente notable en el caso del PUD debido a su carácter ligeramente más hidrofílico por sus grupos carboxílico.



Figura 3.19. Degradación en búfer de fosfato salino pH 7.4. A) Absorción de agua, B) Pérdida de masa.

La cantidad de agua absorbida es una medida indirecta de la hidrofilicidad de un material; además, es generalmente aceptado que una condición necesaria para la degradación hidrolítica de los materiales es la absorción de agua^{162, 163} y esta juega un importante papel en la determinación de la biocompatibilidad de materiales sintéticos. Se ha reportado que altos niveles de absorción de agua

78

disminuye la energía interfacial con la sangre y reduce la adsorción de proteínas en la superficie polimérica¹⁶⁴.

La pérdida de masa en el PUBDA mostró un valor constante hasta los seis meses de degradación como puede ser observado en la figura 3.19B. En contraste, PUD exhibió una pérdida de masa mayor alrededor del 12%, mientras que en PUR y PUG la masa perdida fue menor, esto es, 2 y 4% respectivamente, pero significativamente superior a PUBDA. La pequeña pérdida de masa puede asociarse al carácter hidrofóbico de la PCL, y a la cristalización del segmento flexible, lo que dificulta la hidrólisis de los grupos éster⁹³.

3.6.1.2 Variación del peso molecular

GPC ha sido usado para determinar los cambios en el peso molecular durante la degradación de polímeros, y por lo tanto, se determinaron los pesos moleculares después de determinados intervalos de degradación en buffer^{165, 166}. Aunque la pérdida de masa observada durante los experimentos de degradación en búfer fue pequeña en la mayoría de los poliuretanos, se pudo observar que estos se degradan considerablemente mediante la hidrólisis de las cadenas poliméricas, conduciendo a una notable disminución en los pesos moleculares, especialmente para PUR y PUD, tal y como puede observarse en las gráficas de las figuras 3.20 y 3.21. Esta disminución en la masa molecular, sin pérdida de masa, se ha atribuido a una fase de inducción de la degradación, en la cual los polímeros experimentan escisión aleatoria de sus cadenas sin pérdida de masa física significativa^{158, 167}.

Aunque en el PUD no se observó una considerable disminución de los pesos moleculares, se pudo observar la desaparición de la fracción oligomérica, conduciendo a un aumento de su porosidad donde se retuvo el agua. De esta manera la pérdida de peso inicial puede atribuirse a la pérdida de la fracción oligomérica, mientras que la estabilidad posterior se debe a su alta cristalinidad.



Figura 3.20. Cromatogramas de GPC obtenidos de los residuos sólidos de la degradación en buffer de fosfato salino, lavados y secados después de cada intervalo de degradación. A)PUBDA, B)PUR, C)PUG, D)PUD.



Figura 3.21. Masa molecular remanente, calculado a partir del peso molecular de cada polímero sin degradar.

La mayor degradación de los materiales con aminoácidos, pese a tener mayor PCL cristalina, puede relacionarse con un incremento en la hidrofilicidad. En estos

polímeros el contacto con aire orienta los segmentos hidrofóbicos hacia la superficie pero al entrar en contacto con el agua los grupos polares presentes en los aminoácidos pueden migrar a la superficie incrementando la hidrofilicidad del material permitiendo así el contacto con los grupos hidrolizables.

El control en la degradación es importante ya que una baja tasa de degradación podría incrementar el riesgo de una respuesta inflamatoria; sin embargo una ventaja de estos materiales es que pueden ser fabricados como estructuras microporosas para acelerar la degradación in vivo²⁸. Está estructura microporosa podría ser beneficiosa en otro sentido; por ejemplo Zhang *et. al.* encontraron que prótesis vasculares de poliuretano microporoso promueve un rápido crecimiento y formación de un revestimiento de células endoteliales *in vivo*¹⁶⁸.

3.6.2 Degradación acelerada

Aunque estas pruebas se llevaron a cabo bajo condiciones extremas de temperatura y pH, o bien en medio ambiente altamente oxidativo, fueron útiles para complementar los estudios en buffer de fosfato y para entender el mecanismo de degradación de los polímeros. Estos experimentos son sustentados por el hecho de que el organismo es un medio ambiente altamente agresivo compuesto no solo de agentes hidrolíticos sino también de agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, generado por los mecanismos de defensa. Por ejemplo, se ha encontrado un pH bajo por la presencia de fagocitos (neutrófilos y monocitos) que liberan ácido hipocloroso e hidrolasas lisosomales cuando reconocen un material o una superficie extraña en un proceso conocido como fagocitosis frustrada. Además, conforme la reacción al cuerpo extraño progresa, los monocitos de la sangre derivan en macrófagos (MDM), los cuales también producen iones superóxido (O2) y peróxido de hidrógeno (H2O2) liberándolos en el sitio de activación^{61, 169-173}. Algunos estudios realizados con neutrófilos y macrófagos derivados de monocitos han mostrado que estos son capaces de degradar poli(éster-urea)uretanos^{174, 175}. Por lo tanto, se esperaría que

las velocidades de degradación fueran más rápidas que las observadas por medio de la degradación en buffer a pH 7.4.

3.6.2.1 Pérdida de masa

Los estudios de degradación acelerada llevados a cabo en los PUUS, mostraron que los medios alcalinos y ácidos tienden a degradar más a estos materiales que los medios oxidativos, tal y como se aprecia en la tabla 3.IV. La elevada degradación hidrolítica era esperada por la alta proporción de PCL en los poli(uretano ureas) segmentados (alrededor del 75%); además que la temperatura (de 100°C) fue muy importante porque al fundirse los cristales, la hidrólisis fue más fácil. La mayor degradación por parte del NaClO comparado con H2O2 se debe a que además de ser un potente oxidante, la solución de NaCIO es bastante alcalina (pH 13)¹²³ por lo que puede también puede hidrolizar los enlaces éster conduciendo a una importante pérdida de masa. Diferente a esto, estudios previos en Tecoflex[®] muestra que este se degradada muy poco bajo las estás condiciones, debido a su segmento flexible de tipo poliéter el cual no es fácilmente hidrolizable¹³⁰. La mayor degradación observada en PUD puede ser atribuida al menor peso molecular de este polímero lo que facilita por una parte el acceso a los enlaces degradables y acelera la formación de moléculas de bajo peso molecular, por otra parte esto evidencia la ausencia de baja proporción de fases de segmento rígido las cuales han mostrado una mayor resistencia a la hidrólisis.

	Control (%)	Degradación Oxidativa (%)		Degradación Hidrolítica (%)	
	H ₂ O	H ₂ O ₂	NaClO	NaOH	HCI
PUR	0.68±0.05	4.44±2.55	45.8±4.65	81.78±1.34	75.24±3
PUG	2.65±1.77	4.38±1.25	32.04±8.2	84.97±0.91	74.94±4.16
PUD	1.96±1.6	26.39±6.0	12.26±0.66	99.04±0.23	84.47±1.64
PUBDA	0.51±0.38	1.8±1.25	43.0±15.55	87.22±0.53	74.36±1.9

Tabla 3-IV Porcentaj	e (%) de pérdida	de masa por la	degradación de PUU	JS.
----------------------	------------------	----------------	--------------------	-----
3.6.2.2 Caracterización por FTIR de los residuos de degradación

La degradación acelerada generalmente ha sido utilizada para determinar la estabilidad de poliuretanos¹²³, sin embargo también puede arrojar información acerca de su mecanismo de degradación. Por lo tanto los residuos sólidos de la degradación acelerada, tanto por medios hidrolíticos como oxidativos fueron analizados por FTIR como se muestra en la figura 3.22.

Por medio de los espectros de FTIR se puede apreciar que la degradación hidrolítica afecta principalmente los enlaces éster de la policaprolactona, ya que la banda de los carbonilos alrededor de 1733 cm⁻¹ disminuye considerablemente o incluso llega desaparecer completamente como en hidrólisis alcalina. Mientras que las bandas anchas entre 2500 y 3500 confirman la formación de grupos hidroxilo y carboxílico como producto de la escisión de los enlaces éster.

La similitud en los espectros de los productos de degradación y de los compuestos modelo a base de HMDI y extensor de cadena, confirman la resistencia del segmento rígido a la degradación hidrolítica. Sin embargo puede decirse que el segmento rígido es susceptible a degradarse por la vía hidrolítica, aunque en menor medida, pues la banda de los carbonilos del grupo uretano que se encuentran en el mismo número de onda que la de los grupos éster llega a desaparecer. Por su parte, los enlaces urea que se observan por medio de la banda de 1636 cm⁻¹, tienden a ser más resistentes a la hidrólisis, aunque no se descarta que una proporción de estos enlaces se degrade en conformidad con los altos porcentajes de pérdida de masa observadas en especial por la degradación alcalina (mayor al 75%, el cual es el porcentaje correspondiente a la PCL en los PUUS). Los estudios realizados por Pérez et. al., acerca de la degradación de enlaces urea formados con derivados de aminoácidos muestran que estos enlaces más prolongados que los que necesarios para hidrolizar los enlaces éster¹⁷⁶.



Capítulo 3. Resultados y discusión

84

La degradación oxidativa por su parte, ha estado generalmente relacionada con los poli(éter)uretanos, ya que se han hecho numerosos estudios que han determinado que éstos se degradan mediante la abstracción del hidrogeno alfa adyacente al grupo oxígeno de poliéteres o de policarbonatos^{177, 164}. En contraste, hay pocos trabajos en cuanto a la degradación oxidativa de poliésteres y, en especial, que indiquen el mecanismo de degradación oxidativa de los grupos urea. No obstante, algunos estudios recientes sobre degradación oxidativa en PCL y poli(ester-uretano-ureas) a base de PCL han mostrado que los grupos éster, uretano y urea son susceptibles a degradarse por la vía oxidativa ^{94, 132, 174, 178}.

Aunque los resultados de la degradación oxidativa con H₂O₂ al 30% no mostraron degradar los carbonilos de la PCL, si se observó la desaparición de la banda de los enlaces urea, la formación de un hombro a una frecuencia menor por la formación de aminas y la aparición de una banda a 930 cm⁻¹ por la presencia de ácido carboxílico como producto de la escisión de las cadenas, como puede observarse más detalladamente en la figura 3.23. Por otra parte, el cambio de intensidad entre los picos a 1143 y 1189 cm⁻¹ en estos espectros, se ha relacionado con la PCL amorfa y la PCL cristalina¹⁷⁹, al parecer la desaparición de la PCL en el residuo de la degradación. Por su parte el aumento de la intensidad de la banda a 1298 cm⁻¹ correspondiente a enlaces C-N pudiera asociarse a entrecruzamiento por la formación de radicales durante la degradación.

Por su parte, el NaClO produce la disminución en la intensidad de los grupos carbonilo, debido a su carácter básico. Las bandas de hidroxilo y ácido carboxílico confirman la hidrólisis oxidativa por medio de este agente oxidante. La reacción que se lleva a cabo entre el éster y este agente oxidante ha sido hipotetizado como se muestra en la figura 3.24.¹⁸⁰



Figura 3.23. Ampliación de la región 1700-800 cm⁻¹ de los espectros de infrarrojo de los productos de la degradación oxidativa de los PUUS. A y B) PUBDA, C y D) PUR, E y F) PUG,

G y H) PUD, de los cuales B, D, F y H corresponden a los polímeros degradados.



Figura 3.24. Degradación oxidativa de enlaces éster.

3.7 Ensayos de biocompatibilidad

3.7.1 Hemocompatibilidad

Las pruebas *in vitro* típicas para la evaluación de las interacciones sangrepolímero pueden dividirse en pruebas primarias y pruebas secundarias. Las primarias son técnicas estáticas con o sin formación de trombo. Dentro de estas pruebas se encuentra el ensayo Lee-White, el cual consiste en la determinación de la coagulación de sangre completa en tubos recubiertos con el material estudiado. La pruebas secundarias por su parte pueden ser estáticas o dinámicas, incluyéndose la adhesión de plaquetas, adhesión de eritrocitos o leucocitos, tamaño de coagulo, detección de proteínas etc.⁵⁸

3.7.1.1 Tiempos de coagulación con sangre completa (Lee-White)

Los tiempos de coagulación alcanzados en vidrio estuvieron dentro del intervalo considerado como normal para donadores sanos (4 a 10 minutos), como se observa en la figura 3.25. Una vez determinado el tiempo de coagulación de una persona sana, la prolongación en estos tiempos se ha empleado como un parámetro de la evolución del coágulo, ya que el vidrio, activa los mecanismos de coagulación y agregación plaquetaria por ser un material trombogénico, en tanto que los materiales hemocompatibles tienden a retardar este proceso en condiciones estáticas^{181, 182}. Los tiempos de coagulación obtenidos fueron comparados con los del Tecoflex[®] como control comercial, el cual es un poliuretano no degradable usado en dispositivos médicos en contacto con sangre por sus características no trombogénicas, siendo incluso considerado como el poliuretano con mejor trombo-resistencia en comparación con otros polímeros comerciales para aplicaciones biomédicas^{183, 184}.

Los tiempos de coagulación registrados para los tubos recubiertos con PUUS fueron significativamente mayores que el control en todos los casos (figura 3.25), mientras que no mostraron diferencia significativa con el Tecoflex[®], lo cual indica una buena hemocompatibilidad. Esta es una característica de los poliuretanos atribuida a su estructura de fase separada, de manera que pueden presentar un buen balance hidrofílico-hidrofóbico, lo cual, según algunos investigadores, favorece la adsorción de albúmina.

Se ha considerado que la adsorción de albúmina en altas cantidades puede inactivar la interfase sangre-material retardando el proceso de coagulación, mientras que la adsorción de altas cantidades de fibrinógeno, el cual tiene preferencia por superficies hidrofóbicas, podría favorecer la adherencia plaquetaria y la activación del sistema de coagulación^{185, 186}. Debido a que se ha observado

que las superficies trombogénicas presentan una mayor cantidad de fibrinógeno y adhesión de plaquetas, los materiales para aplicaciones con sangre con frecuencia han sido evaluados *in vitro* en este contexto ^{39, 186}.





3.7.1.2 Adhesión de plaquetas radiomarcadas

La prueba de hemocompatibilidad con plaquetas radiomarcadas permitió cuantificar la adhesión plaquetaria como se observa en la figura 3.26, ya que la radiación emitida por las superficies puestas previamente en contacto con plasma rico en plaquetas (PRP) tratado con ¹¹¹In-oxina, es directamente proporcional al número de plaquetas adheridas. Al igual que en las pruebas con sangre completa, las pruebas evaluadas fueron comparadas con Tecoflex[®] como control comercial. En primer lugar se encontró que la cantidad de plaquetas adheridas a Tecoflex[®] fue similar a la obtenida por otros autores que siguieron el mismo procedimiento descrito anteriormente^{187, 188}. Comparando este resultado con los PUUS sintetizados encontramos que la adhesión plaquetaria fue similar, ya que no fue detectada una diferencia estadística significativa por ANOVA (P<0.05). Esto demuestra que los PUUS sintetizados presentan una hemocompatibilidad aceptable.





Adicionalmente a la adhesión plaquetaria, se llevó a cabo la observación microscópica de las superficies para determinar la activación plaquetaria; en este sentido, algunos investigadores han sugerido que el grado de activación plaquetaria, marcado por sus cambios morfológicos, puede ser un parámetro más apropiado que el número de plaquetas adheridas para evaluar la hemocompatibilidad de un material¹⁸⁹. Estos estudios han categorizado la morfología de las plaquetas en redondeada o discoide < dendrítica o pseudopodica primaria < dendrítica-extendida o pseudopodica intermedia < extendida o pseudopodica tardía < completamente extendida^{186, 189}, teniendo la primera y la última, el menor y mayor grado de activación, respectivamente. En base a esta clasificación, el análisis de las micrografías presentadas en la figura 3.27 muestra la presencia de escasas plaquetas en estados primarios de activación (de discoides a dendríticas), excepto en el caso de PUD que presenta una considerable cantidad de plaquetas y algunas de ellas dendríticas extendidas. En todos los casos, los materiales no mostraron plaquetas en estados posteriores de activación, lo cual se considera un buen indicio de hemocompatibilidad¹⁹⁰.



Figura 3.27. Micrografias por Feg-SEM de las superficies en contacto con PRP.

Aunque la información encontrada es útil en la determinación del comportamiento de los materiales en contacto con sangre, estos estudios no son concluyentes. Tambien hay que considerar que las plaquetas pudieran no adherirse pero ser activadadas por la superficie y agregarse para formar un coágulo que viaje a traves del dispositivo y potencialmente ocluir vasos sanguíneos en piernas, cerebro, corazón y riñones; además, la superficie pudiera activar la vía intrínseca del sistema de coagulación, pero debido a los esfuerzos cortantes del flujo sanguineo los factores de coagulación podrían ser diluidos antes de alcanzar la concentracion necesaria para producir el coagulo¹⁹¹. En cualquier caso, las técnicas para evaluar la adhesión y la activación plaquetaria siguen siendo ampliamente utilizadas para determinar el comportamiento de superficies para aplicaciones en contacto con sangre ¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Adicional al buen comportamiento que mostró PUR, hay que considerar que un producto de la degradación de la arginina es el óxido nítrico (NO). Esta molécula es un potente inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria además de promover el crecimiento de células endoteliales¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Esto podría mejorar la biocompatibilidad *in vivo* del PUR una vez iniciado el proceso de degradación. Estudios realizados por Liu et. al. encontraron que superficies modificadas con L-arginina condujeron a la inhibición de la adhesión plaquetaria y prevención de formación de trombo¹⁹⁸, por lo tanto estudios de PUUS con una mayor proporción de L-arginina sería muy útiles para evaluar su efecto antitrombogénico.

3.7.2 Citocompatibilidad

3.7.2.1 Citotoxicidad de extractos

Los procesos de extracción/lixiviación son útiles para simular condiciones clínicas y evaluar la presencia y liberación de productos tóxicos lixiviables sin afectar las propiedades químicas y mecánicas^{199, 200}. Residuos de reacción tales como monómeros, catalizadores, disolventes o aditivos, pudieran estar presentes en cantidades suficientes como para afectar el metabolismo de las células.

Los cultivos celulares expuestos a los extractos obtenidos de las películas de los poliuretanos después de 24 horas, mostraron una alta viabilidad de HUVECs confirmando la ausencia de compuestos citotóxicos lixiviables como puede observarse en la figura 3.28.





Figura 3.28. Actividad de las células endoteliales en contacto con diferentes concentraciones de extractos de los PUUS.

La ausencia de toxicidad en los materiales analizados es consistente con los resultados reportados por Thomas *et. al.*, quienes encontraron una alta viabilidad de fibroblastos en presencia de Tecoflex[®] y otros poliuretanos preparados con H₁₂MDI^{201, 202}. Adicionalmente, no se observó diferencias significativa entre las diferentes diluciones, además de que las células tuvieron una buena proliferación hasta las 72 horas. Este efecto puede estar relacionado con el carácter hidrofóbico de la PCL lo cual no permite extraer lixiviados al medio acuoso, por lo que

experimentos con tiempos de extracción más prolongados y bajo condiciones de pH ácidas fueron pensadas para evaluar estos materiales.

3.7.2.2 Citotoxicidad de los productos de degradación sobre HUVECs

La citotoxicidad de los productos de degradación por medio de cultivos celulares es una práctica común especialmente en biomateriales biodegradables, ya que la liberación de sustancias tóxicas como productos de la degradación puede inhibir la proliferación celular. Por ejemplo, algunos sistemas biodegradables a base de PLA liberan productos ácidos que han mostrado ser citotóxicos, mientras que otros materiales estudiados no han mostrado liberar productos tóxicos^{77, 83, 84, 89, 120, 203}.

Tomando en cuenta que los fagolisosomas en los macrófagos pueden tener una acidez de hasta pH 4¹⁶⁹, los materiales fueron sometidos a 15 días bajo estas condiciones de acidez, para determinar si los productos de degradación que se desprenden de ellos tienen un efecto citotóxico sobre las células endoteliales.

Los productos de degradación resultaron ser moderadamente tóxicos sobre las HUVECs solo a la concentración más alta de producto de degradación, como puede observarse en la figura 3.29. En este caso se incluyó al Tecoflex[®] como control comercial, el cual ha sido empleado sin mostrar efecto adversos al organismo. Por el efecto citotóxico observado a altas concentraciones puede estar relacionado con disolvente residual o residuos del catalizador utilizado durante la reacción. En el caso de este último, se han encontrado concentraciones entre 20 a 50 ppm de estaño en polímeros de uso médico y se ha recomendado no exceder esta cantidad^{204, 205}.

A second seco







3.7.2.3 Adhesión de HUVECs

El criterio más importante a considerar en los materiales que serán implantados en el sistema cardiovascular es la apropiada interacción biológica con el tejido huésped¹⁰². Por lo tanto, la adhesión de células endoteliales es el paso inicial para esta interacción, por lo que la adhesión de HUVECs sobre las superficies de PUUS fue evaluada en este trabajo.

La adhesión celular fue determinada por medio del marcado previo de células endoteliales con calceína AM y posterior sembrado sobre las superficies poliméricas estudiadas. Los porcentaje de adhesión celular que se muestran en la figura 3.30, fueron determinados con respecto a un control de poli-D-lisina ya que este polipéptido es bien conocido por promover una buena adhesión y

proliferación celular. El análisis estadístico de estos resultados no mostró una diferencia significativa entre los porcentajes de adhesión de cada uno de los sustratos con respecto al control, a excepción de PUR a 30 minutos que mostró ser superior. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre la adhesión a 30 minutos y 1 hora en todos los casos incluyendo el control. Ya que las células fueron sembradas sobre los sustratos después de ser marcadas con calceína AM y suspendidas en medio de cultivo suplementado con suero, se cree que esta excelente adhesión celular, así como la rápida estabilización de las células sobre las superficies puede estar relacionada con la rápida adsorción de proteínas. Esta puede darse en cuestión de minutos de tal manera que la célula termina haciendo contacto directo con la proteína adsorbida, sintiendo un ambiente compatible¹⁴⁵. Otros factores que contribuyen a crear un medio ambiente agradable para las células endoteliales son: ausencia de compuestos tóxicos en la superficie y una adecuada rugosidad, entre otros.



Figura 3.30. Porcentaje de adhesión celular obtenido a partir de la cuantificación de fluorescencia de las células marcadas con Calceina AM y comparadas con la fluorescencia de las células adheridas en poly-D-Lisina como control (* p>0.05 vs. Control analizado por ANOVA de una vía con prueba de Tukey).



Figura 3.31. Micrografias de celulas endoteliales marcadas con calceina AM sobre PUUS observadas mediante microscopio de fluorescencia.

La importancia del suero en el medio de cultivo fue demostrada en los estudios de adhesión de HUVEC's reportados por Lin *et. al.* donde se obtuvo un incremento en el número de células adheridas de 2000 células/cm² a 10,000 células/cm² después de 240 min cuando la secuencia RGD fue injertada a un poliuretano; estos valores se incrementaron cuando fue adicionado suero al medio de cultivo alcanzándose la estabilización del número de células adheridas a 40 minutos en todas las formulaciones¹¹².

Otros autores también han reportado una buena adhesión a 4 horas sobre poliuretanos y sus copolímeros ²⁰⁶. Por otra parte no se observa un aumento significativo del número de células entre 30 minutos y 1 hora, como también puede observarse la figura 3.31. Estos resultados indican una buena compatibilidad con las células endoteliales a cortos periodos de contacto.

3.7.2.4 Proliferación de HUVECs

Las pruebas de proliferación celular se llevaron a cabo para valorar si estos materiales pueden ser utilizados en ingeniería de tejidos ya que un endotelio funcional es crítico para la homeostasia, angiogénesis y funciones complejas que no pueden llevarse a cabo en superficies artificiales²⁰⁷. Por lo tanto la endotelización es esencial para proveer una función vital a las prótesis vasculares artificiales, ya que puede mejorar la permeabilidad a largo plazo de injertos vasculares de diámetro pequeño así como el desempeño de muchos dispositivos cardiovasculares⁵¹.





97

En este estudio, las células endoteliales de cordón umbilical (HUVECs) aunque mostraron una buena adhesión celular como se ha descrito anteriormente muestran resultados no muy alentadores cuando son cultivados por periodos prolongados. La figura 3.32 muestra una disminución considerable en la viabilidad celular comparado con el control Poli-D-lisina. Esta alta adhesión celular seguida de una pobre retención (después de 1 día de cultivo) es consistente con los resultados obtenidos por Bélanger et. al. quien evaluó Tecoflex® y otros poliuretanos comerciales ⁸⁶. El mismo comportamiento ha sido observado en otros poliuretanos y el efecto ha sido atribuido a un cambio de la conformación de las proteínas adsorbidas y a enlazamientos intermoleculares no específicos en vez de las fuertes interacciones receptor-ligando, así como a propiedades intrínsecas de los PU que no favorecen el crecimiento y extensión celular^{193, 208}.



Figura 3.33. Tasa de proliferación celular con respecto al número de células viables después del primer día de cultivo sobre el mismo sustrato (* p>0.05 vs. Otros PUUS, analizado por ANOVA de una vía con prueba de Tukey).



Figura 3.34. Micrografias obtenidas por microscopio de fluorescencia de células cultivadas 1, 2 y 7 días sobre A) Tecoflex®, B) PUBDA, C) PUR, D) PUG, E) PUD, F) Poli-D-

lisina .

99

Capítulo 3. Resultados y discusión

Sin embargo, es muy interesante notar que el PUR mostró una estabilización seguida de una buena proliferación de células endoteliales (ver figura 3.33), en donde se representa el incremento en la cantidad de células con respecto a la cantidad presentada después del primer día de cultivo; la figura 3.34 también ilustra este aumento en la cantidad de células. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos por Wang et. al. sobre poliuretanos modificados superficialmente con aminoácidos básicos (arginina y lisina) comparado con TCPS como control positivo. Sin embargo, con superficies modificadas con una mezcla de aminoácidos individuales (arginina, glicina y acido aspártico) no observaron una promoción en la proliferación¹¹⁶. Por lo tanto, en nuestro estudio se demuestra que, aún formando parte de la cadena polimérica, la arginina promueve la proliferación celular. Algunos estudios sugieren que grupos funcionales sobre la superficie aumentan considerablemente la adhesión y extensión de fibroblastos mientras que otras investigaciones muestran que la mojabilidad es un factor muy importante para la adhesión celular. En este último caso, se observó que superficies hidrofílicas cargadas positivamente tuvieron un aumento en la biocompatibilidad comparado con las superficies hidrofílicas cargadas negativamente^{133, 209}.

También se esperaba que los PUUS sintetizados con ácido aspártico tuvieran grupos funcionales cargados a pH fisiológico y con ello también se esperaba que tuvieran una mayor biocompatibilidad con células endoteliales²¹⁰. Sin embargo, aunque el PUD fue el más hidrofílico no mostró mejor biocompatibilidad, sugiriendo que las cargas positivas de arginina son más favorables para este comportamiento.

Al parecer el PUR presentó segmentos rígidos más polares debido a los grupos carboxílicos y amino residuales; aunque su ángulo de contacto no reflejó esta suposición. Es un hecho conocido que el segmento flexible que es mas hidrofóbico tiende a migrar a la superficie cuando el material está en contacto con aire, sin

100

embargo al encontrarse en medio ambiente fisiológico los grupos polares pueden migrar a la superficie debido a la movilidad de las cadenas poliméricas. Esto reduce la tensión superficial del polímero y mejora la adsorción de proteínas así como la compatibilidad con las células²¹¹.

Muchos estudios se han enfocado en la modificación superficial con péptidos que contengan la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) sobre diferentes sustratos poliméricos, ya que esta secuencia se ha encontrado como responsable de la adhesión celular²¹². Sin embargo en nuestro estudio se ha demostrado que una buena interacción HUVECs-PUUS se logró usando solo la L-arginina.

Ť.

CONCLUSIONES

La síntesis de poli(urea uretanos) segmentados con aminoácidos (L- arginina monohidroclorada, glicina hidroclorada y L- ácido aspártico) como extensores de cadena, y prepolímero a base de poli-ε-caprolactona diol y 4,4'-metilen bis ciclohexil diisocianato, fue demostrada mediante FTIR y RMN.

La presencia de grupos NH y C=O enlazados con puentes de hidrógeno observados por FTIR, la Tα observada por DMA correspondiente a la PCL amorfa, la presencia de PCL cristalina y el comportamiento elastomérico de los PUUS evidenciaron la separación en una fase de segmentos flexibles y una fase de segmentos rigidos.

Entre los PUUS el PUR (PU con arginina) mostró un comportamiento mecánico similar al tecoflex en términos de resistencia última (38 vs. 36MPa) y deformación máxima (1586 vs. 1478). En cuanto al módulo al 100% fue superior en PUR (4.26MPa). Mientras que el Tecoflex® el cual presenta un modulo similar a los vasos sanguíneos, tuvo un modulo al 100% de 1.39MPa. PUD (PU con ácido aspártico) mostro ser demasiado frágil. En tanto que PUG (PU con glicina) y PUBDA (PU con butanodiamina) mostraron un comportamiento elastomérico similar al PUR pero con menor resistencia última (14MPa y 22.45) y menor deformación máxima (1216 y 982); con un modulo al 100% de 3.85 y 2.09 respectivamente. Estas propiedades mostraron estar fuertemente relacionadas con su cristalinidad, masa molecular así como la separación de fase.

La presencia de aminoácidos en los PUUS aceleró la degradación en condiciones fisiológicas, con una pérdida de masa después de 24 semanas de 16% para PUD y alrededor de 3% para PUR y PUG, adicionalmente la determinación de la masa molecular de las muestras degradadas indican que la degradación se lleva a cabo gradualmente por escisión de la cadena.

La pérdida de masa en los PUUS sometidos a degradación en condiciones aceleradas siguió el siguiente orden NaOH>HCl>NaClO>H₂O₂> H₂O, indicando que las condiciones hidroliticas afectan el segmento flexible mientras que las condiciones oxidativas afectan el segmento rígido.

Las pruebas de hemocompatibilidad con sangre completa mostraron tiempos de coagulación más prolongados para el PUR y el PUD, incluso ligeramente mayores que el PUBDA. Sin embargo, el PUD mostró una mayor adhesión de plaquetas activadas mientras que los demás polímeros mostraron un comportamiento no-trombogénico similar al Tecoflex[®].

Las pruebas de citotoxicidad de los lixiviados y productos de degradación mostraron una buena viabilidad y proliferación de células endoteliales para las concentraciones clínicamente relevantes.

Por su parte aunque todas las formulaciones mostraron una buena adhesión de células endoteliales a tiempos cortos de cultivo, solamente el PUR promovió significativamente la proliferación de estas células con un aumento de alrededor de 10 veces el número de células del primer día al séptimo día de cultivo. Esta característica junto con sus propiedades mecánicas, adecuado tiempo de degradación, baja citotoxicidad de lixiviados y productos de degradación no tóxicos, hacen del PUR un buen candidato para su uso en aplicaciones cardiovasculares e ingeniería de tejidos.

Bibliografía

- 65. K. R. Milner; A. J. Snyder; C. A. Siedlecki, Sub-micron texturing for reducing platelet adhesion to polyurethane biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 76A*, 561-570, 2006.
- 66. G. A. Skarja; K. A. Woodhouse, Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Applied Polymer Science*. 75, 1522-1534, 2000.
- 67. Y. Wang; M. A. Rodriguez-Perez; R. L. Reis; J. F. Mano, Thermal and thermomechanical behaviour of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends for biomedical applications. *Macromolecular Materials and Engineering.* 290, 792-801, 2005.
- 68. R. G. J. C. Heijkants; R. V. v. Calck; T. G. van Tienen; J. H. de Groot; P. Buma; A. J. Pennings; R. P. H. Veth; A. J. Schouten, Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(*e*-caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials*. 26, 4219-4228, 2005.
- B. Bogdanov; V. Toncheva; E. Schacht; L. Finelli; B. Sarti; M. Scandola, Physical properties of poly(ester-urethanes) prepared from different molar mass polycaprolactone-diols. *Polymer.* 40, 3171-3182, 1999.
- C. Eldsäter; B. Erlandsson; R. Renstad; A. C. Albertsson; S. Karlsson, The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (εcaprolactone). *Polymer.* 41, 1297-1304, 2000.
- 71. M. Suzuki; Y. Ikada, Biodegradable polymers in medicine. *Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine.* 1, 2005.
- 72. A. Coombes; S. Rizzi; M. Williamson; J. Barralet; S. Downes; W. Wallace, Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*. 25, 315-325, 2004.
- B. V. Minnen; M. B. M. V. Leeuwen; G. Kors; J. Zuidema; T. G. v. Kooten; R. R. M. Bos, *In vivo* resorption of a biodegradable polyurethane foam, based on 1,4-butanediisocyanate: A three-year subcutaneous implantation study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 85A*, 972-982, 2008.
- 74. J. Y. Zhang; E. J. Beckman; N. P. Piesco; S. Agarwal, A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials.* 21, 1247-1258, 2000.
- 75. M. K. Hassan; K. A. Mauritz; R. F. Storey; J. S. Wiggins, Biodegradable aliphatic thermoplastic polyurethane based on poly(ε-caprolactone) and Llysine diisocyanate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 44, 2990-3000, 2006.

Bibliografia

R

4

- R. Y. Kannan; H. J. Salacinski; P. E. Butler; A. M. Seifalian, Polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites: the next generation material for biomedical applications. *Accounts of chemical research.* 38, 879-884, 2005.
- 53. M. Kibbe; T. Billiar; E. Tzeng, Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovascular Research.* 43, 650-657, 1999.
- S. C. G. Leeuwenburgh; J. A. Jansen; J. Malda; W. A. Dhert; J. Rouwkema; C. A. van Blitterswijk; C. J. Kirkpatrick; D. F. Williams, Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. *Biomaterials.* 29, 3047-3052, 2008.
- 55. E. Lavik; R. Langer, Tissue engineering: current state and perspectives. Applied microbiology and biotechnology. 65, 1-8, 2004.
- 56. Y. Hong; J. Guan; K. L. Fujimoto; R. Hashizume; A. L. Pelinescu; W. R. Wagner, Tailoring the degradation kinetics of poly(ester carbonate urethane)urea thermoplastic elastomers for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 31, 4249-4258, 2010.
- 57. T. Thompson, Ed., *Polyurethanes as Specialty Chemicals, Principles and Applications*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2005, 16-29.
- 58. S. Gogolewski, Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid & amp; Polymer Science.* 267, 757-785, 1989.
- 59. P. Król, Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in materials science*. *52*, 915-1015, 2007.
- 60. S. Ozaki, Recent advances in isocyanate chemistry. *Chemical Reviews.* 72, 457-496, 1972.
- 61. J. P. Santerre; K. Woodhouse; G. Laroche; R. S. Labow, Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*. *26*, 7457-7470, 2005.
- 62. Y. Feng; C. Li, Study on oxidative degradation behaviors of polyesterurethane network. *Polymer Degradation and Stability.* 91, 1711-1716, 2006.
- 63. D. F. Williams, Biodegradation of surgical polymers. *Journal of Materials Science*. 17, 1233-1246, 1982.
- 64. G. A. Abraham; A. Marcos-Fernández; J. S. Román, Bioresorbable poly(ester-ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 76A, 729-736, 2006.

- 39. J. Zheng; W. Song; H. Huang; H. Chen, Protein adsorption and cell adhesion on polyurethane/Pluronic® surface with lotus leaf-like topography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 77, 234-239, 2010.
- 40. J. H. Park; K. D. Park; Y. H. Bae, PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis, characterization and platelet adhesion study. *Biomaterials.* 20, 943-954, 1999.
- 41. C. Freij-Larsson; P. Jannasch; B. Wesslén, Polyurethane surfaces modified by amphiphilic polymers: effects on protein adsorption. *Biomaterials.* 21, 307-315, 2000.
- 42. R. Lith; G. A. Ameer, Biohybrid Strategies for Vascular Grafts. *Tissue Engineering*. 279-316, 2011.
- 43. I. Francolini; F. Crisante; A. Martinelli; L. D'Ilario; A. Piozzi, Synthesis of biomimetic segmented polyurethanes as antifouling biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2011.
- 44. Q. Lv; C. Cao; H. Zhu, Blood compatibility of polyurethane immobilized with acrylic acid and plasma grafting sulfonic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 15, 607-611, 2004.
- 45. Y. H. Kim; D. K. Han; K. D. Park; S. H. Kim, Enhanced blood compatibility of polymers grafted by sulfonated PEO via a negative cilia concept. *Biomaterials.* 24, 2213-2223, 2003.
- 46. F. Gong; Y. Lu; H. Guo; S. Cheng; Y. Gao, Hyaluronan Immobilized Polyurethane as a Blood Contacting Material. *International Journal of Polymer Science. 2010*, 2010.
- 47. F. Xu; C. E. Flanagan; A. Ruiz; W. C. Crone; K. S. Masters, Polyurethane/Dermatan Sulfate Copolymers as Hemocompatible, Non-Biofouling Materials. *Macromolecular Bioscience*. 11, 257-266, 2011.
- 48. X. Duan; R. S. Lewis, Improved haemocompatibility of cysteine-modified polymers via endogenous nitric oxide. *Biomaterials*. 23, 1197-1203, 2002.
- 49. S. Hwang; M. E. Meyerhoff, Polyurethane with tethered copper (II)-cyclen complex: Preparation, characterization and catalytic generation of nitric oxide from S-nitrosothiols. *Biomaterials.* 29, 2443-2452, 2008.
- S. C. Puiu; Z. Zhou; C. C. White; L. J. Neubauer; Z. Zhang; L. E. Lange; J. A. Mansfield; M. E. Meyerhoff; M. M. Reynolds, Metal ion-mediated nitric oxide generation from polyurethanes via covalently linked copper(II)-cyclen moieties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 91B, 203-212, 2009.
- 51. H.-S. Hung; C.-C. Wu; S. Chien; S.-h. Hsu, The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways. *Biomaterials.* 30, 1502-1511, 2009.

an immunodeficient mouse model: preliminary findings. Archives of Surgery. 143, 488, 2008.

- 28. L. Zhang; J. Zhou; Q. Lu; Y. Wei; S. Hu, A novel small-diameter vascular graft: In vivo behavior of biodegradable three-layered tubular scaffolds. *Biotechnology and bioengineering.* 99, 1007-1015, 2008.
- 29. W. M. Reichert; T. R. Harris; J. Lemons; A. G. Mikos; D. A. Puleo; F. J. Schoen; J. S. Temenoff, 2011 panel on developing a biomaterials curriculum. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 100A*, 802-816, 2012.
- K. Y. Chen; J. F. Kuo; C. Y. Chen, Synthesis, characterization and platelet adhesion studies of novel ion-containing aliphatic polyurethanes. *Biomaterials.* 21, 161-171, 2000.
- 31. V. G. Gavalas; M. J. Berrocal; L. G. Bachas, Enhancing the blood compatibility of ion-selective electrodes. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 384, 65-72, 2006.
- 32. C. P. Sharma, Blood-compatible materials: A perspective. Journal of Biomaterials Applications. 15, 359-381, 2001.
- J. E. Puskas; Y. Chen, Biomedical Application of Commercial Polymers and Novel Polyisobutylene-Based Thermoplastic Elastomers for Soft Tissue Replacement. *Biomacromolecules*. 5, 1141, 2004.
- 34. J. Fatisson; S. Mansouri; D. Yacoub; Y. Merhi; M. Tabrizian, Determination of surface-induced platelet activation by applying time-dependency dissipation factor versus frequency using quartz crystal microbalance with dissipation. *Journal of The Royal Society Interface.* 8, 988-997, 2011.
- L. C. Xu; C. A. Siedlecki, Microphase separation structure influences protein interactions with poly (urethane urea) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 92*, 126-136, 2010.
- 36. G. A. Abraham; A. A. A. de Queiroz; J. S. Román, Immobilization of a nonsteroidal antiinflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials*. 23, 1625-1638, 2002.
- S.-h. Hsu; Y.-C. Kao, Biocompatibility of Poly(carbonate urethane)s with Various Degrees of Nanophase Separation. *Macromolecular Bioscience*. 5, 246-253, 2005.
- C. Ma; G. Zhou; G. Zhang, Protein resistance of polyurethane with hydrophilic and hydrophobic soft segments. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics.* 48, 1987-1993, 2010.

- H. J. Salacinski; S. Goldner; A. Giudiceandrea; G. Hamilton; A. M. Seifalian;
 A. Edwards; R. J. Carson, The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *Journal of Biomaterials Applications*. 15, 241, 2001.
- 15. A. H. Blakemore; A. B. Voorhees Jr, The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects—experimental and clinical. *Annals of Surgery.* 140, 324, 1954.
- 16. DHM (2008). Injertos vasculares, Revisado 5 de abril de 2012. http://dhmwebsite.com/dhm/contenido/19.aspx
- 17. T. How; R. Clarke, The elastic properties of a polyurethane arterial prosthesis. *Journal of biomechanics*. 17, 597-599, 601-608, 1984.
- 18. F. Khoffi; F. Dieval; N. Chakfé; B. Durand, A development of a technique for measuring the compliance of the textile vascular prostheses. *Physics Procedia.* 21, 234-239, 2011.
- 19. D. Tremblay; T. Zigras; R. Cartier; L. Leduc; J. Butany; R. Mongrain; R. L. Leask, A comparison of mechanical properties of materials used in aortic arch reconstruction. *The Annals of thoracic surgery*. *88*, 1484-1491, 2009.
- A. Eberhart; Z. Zhang; R. Guidoin; G. Laroche; L. Guay; D. De La Faye; M. Batt; M. W. King, A new generation of polyurethane vascular prostheses: rara avis or ignis fatuus? *Journal of biomedical materials research.* 48, 546-558, 1999.
- 21. B. Huang; Y. Marois; R. Roy; M. Julien; R. Guidoin, Cellular reaction to the Vascugraft® polyesterurethane vascular prosthesis: in vivo studies in rats. *Biomaterials.* 13, 209-216, 1992.
- I. Alferiev; N. Vyavahare; C. Song; J. Connolly; J. Travis Hinson; Z. Lu; S. Tallapragada; R. Bianco; R. Levy, Bisphosphonate derivatized polyurethanes resist calcification. *Biomaterials.* 22, 2683-2693, 2001.
- L. Poussard; F. Burel; J. P. Couvercelle; Y. Merhi; M. Tabrizian; C. Bunel, Hemocompatibility of new ionic polyurethanes: influence of carboxylic group insertion modes. *Biomaterials.* 25, 3473-3483, 2004.
- S. Ravi; Z. Qu; E. L. Chaikof, Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes. *Vascular*. 17, S45-S54, 2009.
- S. Lepidi; G. Abatangelo; V. Vindigni; G. P. Deriu; B. Zavan; C. Tonello; R. Cortivo, In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. *The FASEB Journal.* 20, 103-105, 2006.
- 26. O. F. Khan; M. V. Sefton, Endothelialized biomaterials for tissue engineering applications in vivo. *Trends in biotechnology*. 2011.
- G. N. Nelson; T. Mirensky; M. P. Brennan; J. D. Roh; T. Yi; Y. Wang; C. K. Breuer, Functional small-diameter human tissue-engineered arterial grafts in

108

BIBLIOGRAFÍA

- 1. F. J. Davis; G. R. Mitchell, en *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*, P. Bártolo; B. Bidanda, Eds. Springer, New York, 2008, 27-48.
- M. C. Frost; M. E. Meyerhoff, Synthesis, characterization, and controlled nitric oxide release from S-nitrosothiol-derivatized fumed silica polymer filler particles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 72A, 409-419, 2005.
- Y. Marois; R. Guidoin, en *Biomedical Applications of Polyurethanes*, P. Vermette; H. J. Griesser; G. Laroche; R. Guidoin, Eds. Landes Bioscience, Texas, 2001, 77-96.
- 4. E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins. Annual review of cell and developmental biology. 12, 697-715, 1996.
- INEGI (2010). Estadísticas de Mortalidad, Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad. Revisado el 5 de abril de 2012. <u>http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&</u> c=23587
- Organización Mundial de la Salud (2012). El día mundial del corazón, Revisado el 3 de abril de 2012. <u>http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world heart day/es/index.ht</u> ml
- X. Wang; P. Lin; Q. Yao; C. Chen, Development of Small-Diameter Vascular Grafts. World Journal of Surgery. 31, 682-689, 2007.
- T. W. Shields; J. LoCicero; R. B. Ponn, *General thoracic surgery*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005, vol. 2.
- 9. R. J. Zdrahala, Small caliber vascular grafts. Part II: Polyurethanes revisited. Journal of Biomaterials Applications. 11, 37-61, 1996.
- S. Rashid; B. Fuller; G. Hamilton; A. Seifalian, Tissue engineering of a hybrid bypass graft for coronary and lower limb bypass surgery. *The FASEB Journal*. 22, 2084-2089, 2008.
- 11. T.-W. Chuang; K. S. Masters, Regulation of polyurethane hemocompatibility and endothelialization by tethered hyaluronic acid oligosaccharides. *Biomaterials.* 30, 5341-5351, 2009.
- 12. R. A. Cowles (2008). Cirugía de derivación cardíaca, Revisado el 25 de Junio de 2012. http://www.umm.edu/esp presentations/100190 3.htm
- 13. D. Ribatti; B. Nico; E. Weber, en New Frontiers in Angiogenesis, R. Forough, Ed. Springer Netherlands, 2006,pp.111-124.

PERSPECTIVAS

en vela de las buentas propredadas del políti acuar don Larginina, se recombeda la preparación de diferencias formatizaciónes da PUR variando la proporción de La arte infol y invaluar el adacto de la conferminación de sela amensicada en trapropriedadas mechanicas y biológicas de enclames preparados con jastos políticatares con entractoria tanto lise entre escense.

Estudier la degradación in vitro de entos accentiva a faco da Carginine, en condicionos (ad críptes, cardativas y entinitéticas: minutando tas condiciones fejológices y a reactivido los productos da degradación

Preparar tubro a produce ing diversiona romulaciones y estudier sos processades medentas, attronovia degradación y récentronicional (n. evo de los tabus par majores processidas mechanicas y birobicas (n. etc.

PERSPECTIVAS

En vista de las buenas propiedades del poliuretano con L-arginina, se recomienda la preparación de diferentes formulaciones de PUR variando la proporción de Larginina; y evaluar el efecto de la concentración de este aminoácido en las propiedades mecánicas y biológicas de andamios preparados con estos poliuretanos con estructura tanto lisa como porosa.

Estudiar la degradación *in vitro* de estos andamios a base de L-arginina, en condiciones hidrolíticas, oxidativas y enzimáticas; simulando las condiciones fisiológicas y analizando los productos de degradación.

Preparar tubos a partir de las diferentes formulaciones y estudiar sus propiedades mecánicas, así como la degradación y biocompatibilidad *in vivo* de los tubos con mejores propiedades mecánicas y biológicas *in vitro*.

6

- 76. T. Ohkita; S. H. Lee, Effect of aliphatic isocyanates (HDI and LDI) as coupling agents on the properties of eco-composites from biodegradable polymers and corn starch. *Journal of adhesion science and technology.* 18, 905-924, 2004.
- 77. P. A. Gunatillake; R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European cells & materials.* 5, 1-16, 2003.
- R. Shi; D. Chen; Q. Liu; Y. Wu; X. Xu; L. Zhang; W. Tian, Recent advances in synthetic bioelastomers. *International journal of molecular sciences*. 10, 4223-4256, 2009.
- 79. S. Mallakpour; M. Khani; F. Rafiemanzelat, Synthesis and characterization of new optically active segmented poly(amide imide urethane)s based on different diacids via an isocyanate route. *Journal of Applied Polymer Science*. 108, 2975-2982, 2008.
- 80. D. Sarkar; J.-C. Yang; A. S. Gupta; S. T. Lopina, Synthesis and characterization of L-tyrosine based polyurethanes for biomaterial applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 90A*, 263-271, 2009.
- 81. J. S. Nowick; N. A. Powell; T. M. Nguyen; G. Noronha, An improved method for the synthesis of enantiomerically pure amino acid ester isocyanates. *The Journal of Organic Chemistry.* 57, 7364-7366, 1992.
- J. Han; B. Chen; L. Ye; A. Zhang; J. Zhang; Z. Feng, Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane based on poly (εcaprolactone) and L-lysine ethyl ester diisocyanate. *Frontiers of Materials Science in China.* 3, 25-32, 2009.
- 83. J. Guan; M. S. Sacks; E. J. Beckman; W. R. Wagner, Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *Journal of biomedical materials research.* 61, 493-503, 2002.
- L. Zhou; L. Yu; M. Ding; J. Li; H. Tan; Z. Wang; Q. Fu, Synthesis and Characterization of pH-Sensitive Biodegradable Polyurethane for Potential Drug Delivery Applications. *Macromolecules*. 2011.
- R. Adhikari; P. A. Gunatillake; I. Griffiths; L. Tatai; M. Wickramaratna; S. Houshyar; T. Moore; R. T. M. Mayadunne; J. Field; M. McGee; T. Carbone, Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications. *Biomaterials.* 29, 3762-3770, 2008.
- M.-C. Bélanger; Y. Marois; R. Roy; Y. Mehri; E. Wagner; Z. Zhang; M. W. King; M. Yang; C. Hahn; R. Guidoin, Selection of a Polyurethane Membrane for the Manufacture of Ventricles for a Totally Implantable Artificial Heart:

Blood Compatibility and Biocompatibility Studies. Artificial Organs. 24, 879-888, 2000.

- 87. W. N. Sivak; I. F. Pollack; S. Petoud; W. C. Zamboni; J. Zhang; E. J. Beckman, Catalyst-dependent drug loading of LDI-glycerol polyurethane foams leads to differing controlled release profiles. *Acta Biomaterialia. 4*, 1263-1274, 2008.
- 88. N. Yamamoto; A. Nakayama; M. Oshima; N. Kawasaki; S.-i. Aiba, Enzymatic hydrolysis of lysine diisocyanate based polyurethanes and segmented polyurethane ureas by various proteases. *Reactive and Functional Polymers.* 67, 1338-1345, 2007.
- 89. S. A. Guelcher; A. Srinivasan; J. E. Dumas; J. E. Didier; S. McBride; J. O. Hollinger, Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials.* 29, 1762-1775, 2008.
- L. Zhou; D. Liang; X. He; J. Li; H. Tan; J. Li; Q. Fu; Q. Gu, The degradation and biocompatibility of pH-sensitive biodegradable polyurethanes for intracellular multifunctional antitumor drug delivery. *Biomaterials*. 33, 2734-2745, 2012.
- 91. J. E. Báez; Á. Marcos-Fernández; R. Lebrón-Aguilar; A. Martínez-Richa, A novel route to α,ω-telechelic poly(ε-caprolactone) diols, precursors of biodegradable polyurethanes, using catalysis by decamolybdate anion. *Polymer.* 47, 8420-8429, 2006.
- 92. T. Kartvelishvili; G. Tsitlanadze; L. Edilashvili; N. Japaridze; R. Katsarava, Amino acid based bioanalogous polymers. Novel regular poly (ester urethane)s and poly (ester urea)s based on bis (L-phenylalanine) α, ωalkylene diesters. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 198, 1921-1932, 1997.
- 93. A. Marcos-Fernández; G. A. Abraham; J. L. Valentín; J. S. Román, Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(esterurethane-urea)s based on poly(ε-caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer.* 47, 785-798, 2006.
- 94. D. Sarkar; S. T. Lopina, Oxidative and enzymatic degradations of L-tyrosine based polyurethanes. *Polymer Degradation and Stability.* 92, 1994-2004, 2007.
- 95. G. Skarja; K. Woodhouse, In vitro degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 12, 851-873, 2001.

- 96. G. Skarja; K. Woodhouse, Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 9, 271-295, 1998.
- 97. S. Elliott; J. Fromstein; J. PSanterre; K. Woodhouse, Identification of biodegradation products formed by L-phenylalanine based segmented polyurethaneureas. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 13, 691-711, 2002.
- I. Parrag; K. Woodhouse, Development of Biodegradable Polyurethane Scaffolds Using Amino Acid and Dipeptide-Based Chain Extenders for Soft Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 21, 843-862, 2010.
- 99. J. Guan; W. R. Wagner, Synthesis, characterization and cytocompatibility of polyurethaneurea elastomers with designed elastase sensitivity. *Biomacromolecules.* 6, 2833-2842, 2005.
- 100. L. J. Taite; P. Yang; H.-W. Jun; J. L. West, Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 84B, 108-116, 2008.
- 101. J. Guan; J. J. Stankus; W. R. Wagner, Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *Journal of controlled release*. *120*, 70-78, 2007.
- 102. C. K. Prasad; C. Muraleedharan; L. K. Krishnan, Bio-mimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 80*, 644-654, 2007.
- 103. T. W. Chung; D. Z. Liu; S. Y. Wang; S. S. Wang, Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials.* 24, 4655-4661, 2003.
- 104. S. Hsu; Y. C. Kao, Cell attachment and proliferation on poly (carbonate urethanes) with various degrees of nanophase separation. *Macromolecular Bioscience*. 4, 891-900, 2004.
- A. P. Marques; R. L. Reis; J. A. Hunt, The biocompatibility of novel starchbased polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials.* 23, 1471-1478, 2002.
- 106. H. R. Lim; H. S. Baek; M. H. Lee; Y. I. Woo; D. W. Han; M. H. Han; H. K. Baik; W. S. Choi; K. D. Park; K. H. Chung, Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films by microwave-induced argon plasma. *Surface and Coatings Technology.* 202, 5768-5772, 2008.

Margolfdill.

- 107. S. Sarkar; A. Chourasia; S. Maji; S. Sadhukhan; S. Kumar; B. Adhikari, Synthesis and characterization of gelatin based polyester urethane scaffold. *Bulletin of Materials Science.* 29, 475-484, 2006.
- 108. B. J. Park; H. J. Seo; J. Kim; H. L. Kim; J. K. Kim; J. B. Choi; I. Han; S. O. Hyun; K. H. Chung; J. C. Park, Cellular responses of vascular endothelial cells on surface modified polyurethane films grafted electrospun PLGA fiber with microwave-induced plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*. 205, S222-S226, 2010.
- S. Hsu; S. C. Chuang; C. H. Chen; D. C. Chen, Endothelial cell attachment to the gamma irradiated small diameter polyurethane vascular grafts. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 16, 397-404, 2006.
- H. B. Lee; G. Khang; J. H. Lee, en *Biomaterials: Principles and Applications*, J. B. Park; J. D. Bronzino, Eds. CRC Press LLC, Florida, 2002, 55.
- D. C. Grimaldo; J. E. A. Orjuela; O. C. A. C. de Martínez; C. A. C. Torrado;
 Á. P. Covarrubias, Hacia una nueva generación de biomateriales. Primera parte. *Revista colombiana de ortopedia y traumatología.* 24, 168-177, 2010.
- H.-B. Lin; C. García-Echeverría; S. Asakura; W. Sun; D. F. Mosher; S. L. Cooper, Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides. *Biomaterials*. 13, 905-914, 1992.
- M. Sanchez; A. Deffieux; L. Bordenave; C. Baquey; M. Fontanille, Synthesis of hemocompatible materials. Part 1: Surface modification of polyurethanes based on Poly (chloroalkylvinylether) s by RGD fragments. *Clinical materials.* 15, 253-258, 1994.
- 114. D. Wang; J. Ji; Y. Sun; J. Shen; L. Feng; J. H. Elisseeff, In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly (ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules. 3*, 1286-1295, 2002.
- 115. S. Hsu; S. Sun; D. C. Chen, Improved Retention of Endothelial Cells Seeded on Polyurethane Small diameter Vascular Grafts Modified by a Recombinant RGD containing Protein. *Artificial Organs.* 27, 1068-1078, 2003.
- 116. D.-a. Wang; L.-x. Feng; J. Ji; Y.-h. Sun; X.-x. Zheng; J. H. Elisseeff, Novel human endothelial cell-engineered polyurethane biomaterials for cardiovascular biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 65A*, 498-510, 2003.
- W. S. Choi; J. W. Bae; H. R. Lim; Y. K. Joung; J. C. Park; I. K. Kwon; K. D. Park, RGD peptide-immobilized electrospun matrix of polyurethane for enhanced endothelial cell affinity. *Biomedical Materials*. 3, 044104, 2008.

- 118. J. Li; M. Ding; Q. Fu; H. Tan; X. Xie; Y. Zhong, A Novel Strategy to Graft RGD Peptide on Biomaterials Surfaces for Endothelization of Small-Diameter Vascular Graft and Tissue Engineering Blood Vessel Journal Material Science: Materials Medicine. 19, 2595, 2008.
- W. S. Choi; J. W. Bae; Y. K. Joung; K. D. Park; M. H. Lee; J. C. Park; I. K. Kwon, Fabrication of endothelial cell-specific polyurethane surfaces coimmobilized with GRGDS and YIGSR peptides. *Macromolecular Research*. 17, 458-463, 2009.
- 120. J. Guan; M. S. Sacks; E. J. Beckman; W. R. Wagner, Biodegradable poly (ether ester urethane) urea elastomers based on poly (ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials.* 25, 85-96, 2004.
- 121. Y. Meng; H. Li; H. Huo; S. Jiang; L. An, Crystallization behavior of poly(εcaprolactone) in poly(ε-caprolactone) and poly(vinyl methyl ether) mixtures. *Journal of Applied Polymer Science*. 105, 615-622, 2007.
- 122. P. T. Knight; K. M. Lee; H. Qin; P. T. Mather, Biodegradable Thermoplastic Polyurethanes Incorporating Polyhedral Oligosilsesquioxane. *Biomacromolecules.* 9, 2458-2467, 2008.
- 123. P. A. Gunatillake; G. F. Meijs; E. Rizzardo; R. C. Chatelier; S. J. McCarthy; A. Brandwood; K. Schindhelm, Polyurethane elastomers based on novel polyether macrodiols and MDI: Synthesis, mechanical properties, and resistance to hydrolysis and oxidation. *Journal of Applied Polymer Science*. 46, 319-328, 1992.
- D. A. Goodwin; J. T. Bushberg; P. W. Doherty; M. J. Lipton; F. K. Conley; C. I. Diamanti; C. F. Meares, Indium-111-Labeled Autologous Platelets for Location of Vascular Thrombi in Humans. *The Journal of Nuclear Medicine, Radiochemestry and Radiopharmaceuticals.* 19, 1978.
- 125. M. L. Thakur; L. Walsh; H. L. Malech; A. Gottschalk, Indium-111-Labeled Human Platelets: Improved Method, Efficacy, and Evaluation. *Journal of Nuclear Medicine*. 22, 1981.
- 126. S. R. Hanson; H. F. Kotze; B. Savage; L. A. Harker, Platelet interactions with Dacron vascular grafts. A model of acute thrombosis in baboons. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 5, 595-603, 1985.
- 127. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63, 1983.
- 128. L. Kupcsik, Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 740, 13, 2011.

- 129. B. Gantenbein-Ritter; C. M. Sprecher; S. Chan; S. Illien-Jünger; S. Grad, en *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols,* M. J. Stoddart, Ed. Humana Press, New York, 2011, vol. 740, 127-140.
- L. H. Chan-Chan; R. Solis-Correa; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; J. V. Cauich-Rodríguez; P. Quintana; P. Bartolo-Pérez, Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia*. 6, 2035-2044, 2010.
- 131. L. H. Chan-Chan; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; J. V. Cauich-Rodríguez; R. Rath; E. A. Phelps; A. J. García; J. San Román del Barrio; J. Parra; M. Tabrizian; Y. Merhi, Platelet adhesion and HUVEC cytocompatibility of biodegradable segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and butanediol or dithioerythritol as chain extenders *Journal of Biomaterials Applications. in press*, 2012.
- 132. M. A. Sabino, Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters. *Polymer Degradation and Stability. 92*, 986-996, 2007.
- 133. K. Webb; V. Hlady; P. A. Tresco, Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *Journal of biomedical materials research. 41*, 422-430, 1998.
- 134. A. Lapprand; F. Méchin; J.-P. Pascault, Synthesis and properties of selfcrosslinkable thermoplastic polyurethanes. *Journal of Applied Polymer Science*. 105, 99-113, 2007.
- J. Tuominen; J. Kylmä; J. Seppälä, Chain extending of lactic acid oligomers.
 Increase of molecular weight with 1,6-hexamethylene diisocyanate and 2,2'-bis(2-oxazoline). *Polymer.* 43, 3-10, 2002.
- 136. H.-T. Lee; C.-C. Wang, Synthesis and Properties of Aqueous Polyurethane/Polytert-butylacrylate Hybrid Dispersions. *Journal of Polymer Research.* 12, 271-277, 2005.
- 137. M. van der Schuur; B. Noordover; R. J. Gaymans, Polyurethane elastomers with amide chain extenders of uniform length. *Polymer.* 47, 1091-1100, 2006.
- 138. G. G. Suchkova; L. I. Maklakov, Amide bands in the IR spectra of urethanes. *Vibrational Spectroscopy.* 51, 333-339, 2009.
- 139. J. Vega-Baudrit; M. Sibaja-Ballestero; M. E. Hernández-Hernández; P. Alvarado-Aguilar, Síntesis y caracterizacion de redes elastomericas de poliuretano (EPU) utilizado en la elaboración de calzado II. Utilización de modelos matemáticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 7, 3, 2006.
- 140. X. Jiang; J. Li; M. Ding; H. Tan; Q. Ling; Y. Zhong; Q. Fu, Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly(ε-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as soft segment. *European Polymer Journal.* 43, 1838-1846, 2007.
- M. A. Hood; B. Wang; J. M. Sands; J. J. La Scala; F. L. Beyer; C. Y. Li, Morphology control of segmented polyurethanes by crystallization of hard and soft segments. *Polymer.* 51, 2191-2198, 2010.
- V. Ubale; A. Sagar; N. Maldar; M. Birajdar, Synthesis and characterization of aromatic–aliphatic polyamides. *Journal of Applied Polymer Science*. 79, 566-571, 2001.
- 143. K. Ken; U. Yusuke; Y. Yasunori; M. Suguru; F. Mutsuhisa, Chain and mirophase-separated structures of ultrathin polyurethane films. *Journal of Physics: Conference Series.* 184, 012028, 2009.
- 144. E. C. Buruiana; V. Melinte; T. Buruiana; B. C. Simionescu; T. Lippert; L. Urech, Synthesis and photochemical investigations of novel bistriazene polyurethanes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 186, 270-277, 2007.
- 145. M. Yaseen; X. Zhao; A. Freund; A. M. Seifalian; J. R. Lu, Surface structural conformations of fibrinogen polypeptides for improved biocompatibility. *Biomaterials.* 31, 3781-3792, 2010.
- D. G. Thompson; J. C. Osborn; E. M. Kober; J. R. Schoonover, Effects of hydrolysis-induced molecular weight changes on the phase separation of a polyester polyurethane. *Polymer Degradation and Stability*. 91, 3360-3370, 2006.
- 147. P. M. Gea-Jódar, Mojado en condiciones de no-equilibrio sobre superficies reales, Thesis Doctoral, Universidad de Granada, 2006.
- 148. N. Özkucur; E. Richter; C. Wetzel; R. H. W. Funk; T. K. Monsees, Biological relevance of ion energy in performance of human endothelial cells on ionimplanted flexible polyurethane surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 93A, 258-268, 2010.
- 149. Y. Arima; H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials.* 28, 3074-3082, 2007.
- 150. S. S. Umare; A. S. Chandure, Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly(ester urethane)s. *Chemical Engineering Journal.* 142, 65-77, 2008.
- 151. J. H. Hong; H. J. Jeon; J. H. Yoo; W.-R. Yu; J. H. Youk, Synthesis and characterization of biodegradable poly(ε-caprolactone-co-β-butyrolactone)-

based polyurethane. *Polymer Degradation and Stability.* 92, 1186-1192, 2007.

- 152. M. Barikani; H. Honarkar; M. Barikani, Synthesis and characterization of polyurethane elastomers based on chitosan and poly(ε-caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science*. 112, 3157-3165, 2009.
- 153. K. C. Ang; K. F. Leong; C. K. Chua; M. Chandrasekaran, Compressive properties and degradability of poly(ε-caprolatone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 80A*, 655-660, 2007.
- 154. P. Prabu; N. Dharmaraj; S. Aryal; B. M. Lee; V. Ramesh; H. Y. Kim, Preparation and drug release activity of scaffolds containing collagen and poly(caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 79A, 153-158, 2006.
- 155. S. Ravi; E. L. Chaikof, Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regenerative medicine.* 5, 107-120, 2010.
- 156. S. Oprea, Effect of composition and hard-segment content on thermomechanical properties of cross-linked polyurethane copolymers. *High Performance Polymers.* 21, 353-370, 2009.
- 157. X. M. Qin; J. W. Xiong; X. H. Yang; X. L. Wang; Z. Zheng, Preparation, morphology, and properties of polyurethane–urea elastomers derived from sulphone-containing aromatic diamine. *Journal of Applied Polymer Science*. *104*, 3554-3561, 2007.
- 158. E. Ayres; R. L. Oréfice; M. I. Yoshida, Phase morphology of hydrolysable polyurethanes derived from aqueous dispersions. *European Polymer Journal.* 43, 3510-3521, 2007.
- 159. Z. Wang; L. Yu; M. Ding; H. Tan; J. Li; Q. Fu, Preparation and rapid degradation of nontoxic biodegradable polyurethanes based on poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) and L-lysine diisocyanate. *Polymer Chemistry.* 2, 601-607, 2011.
- 160. H. Liu; L. Zhang; Y. Zuo; L. Wang; D. Huang; J. Shen; P. Shi; Y. Li, Preparation and characterization of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite composite scaffold. *Journal of Applied Polymer Science*. *112*, 2968-2975, 2009.
- 161. L. Tatai; T. G. Moore; R. Adhikari; F. Malherbe; R. Jayasekara; I. Griffiths; P. A. Gunatillake, Thermoplastic biodegradable polyurethanes: The effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. *Biomaterials.* 28, 5407-5417, 2007.
- 162. K. Gorna; S. Gogolewski, Biodegradable polyurethanes for implants. II. *In vitro* degradation and calcification of materials from poly(ε–caprolactone)-

poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. Journal of biomedical materials research. 60, 592-606, 2002.

- 163. W. Wang; Y. Guo; J. U. Otaigbe, Synthesis and characterization of novel biodegradable and biocompatible poly(ester-urethane) thin films prepared by homogeneous solution polymerization. *Polymer.* 49, 4393-4398, 2008.
- 164. Y.-X. Wang; J. L. Robertson; W. B. Spillman; R. O. Claus, Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. *Pharmaceutical Research.* 21, 1362-1373, 2004.
- 165. V. Rek; H. J. Mencer; M. Bravar, GPC and structural analysis of polyurethane degradation. *Polymer Photochemistry*. 7, 273-283, 1986.
- 166. X. J. Loh; S. H. Goh; J. Li, Hydrolytic degradation and protein release studies of thermogelling polyurethane copolymers consisting of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol). *Biomaterials.* 28, 4113-4123, 2007.
- 167. X. J. Loh; K. K. Tan; X. Li; J. Li, The in vitro hydrolysis of poly (ester urethane) s consisting of poly [*R*-3-hydroxybutyrate] and poly (ethylene glycol). *Biomaterials.* 27, 1841-1850, 2006.
- Z. Zhang; Z. Wang; S. Liu; M. Kodama, Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. *Biomaterials*. 25, 177-187, 2004.
- 169. J. M. Anderson; A. Rodriguez; D. T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials. Seminars in immunology. 20, 86-100, 2008.
- R. S. Labow; D. J. Erfle; J. P. Santerre, Elastase-induced hydrolysis of synthetic solid substrates: poly (ester-urea-urethane) and poly (ether-ureaurethane). *Biomaterials*. 17, 2381-2388, 1996.
- 171. J. E. McBane; J. P. Santerre; R. S. Labow, The interaction between hydrolytic and oxidative pathways in macrophage-mediated polyurethane degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 82A, 984-994, 2007.
- 172. J. McBane; J. Santerre; R. Labow, Winner of the Student Research Award in the Master's Degree Candidate Category. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 74A*, 1-11, 2005.
- R. S. Labow; E. Meek; J. P. Santerre, Synthesis of cholesterol esterase by monocyte-derived macrophages: a potential role in the biodegradation of poly (urethane) s. *Journal of Biomaterials Applications*. 13, 187-205, 1999.
- 174. A. E. Hafeman; K. J. Zienkiewicz; A. L. Zachman; H. J. Sung; L. B. Nanney; J. M. Davidson; S. A. Guelcher, Characterization of the degradation mechanisms of lysine-derived aliphatic poly (ester urethane) scaffolds. *Biomaterials.* 32, 419-429, 2011.

- 175. D. L. M. Dinnes; J. P. Santerre; R. S. Labow, Influence of biodegradable and non-biodegradable material surfaces on the differentiation of human monocyte-derived macrophages. *Differentiation*. 76, 232-244, 2008.
- 176. P. Pérez; C. Simó; C. Neusüss; M. Pelzing; J. San Román; A. Cifuentes; A. Gallardo, New Pseudopeptidic Cross-Linker Containing Urea Bonds: Study of Its Degradation Routes in Aqueous Media Using Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Biomacromolecules.* 7, 720-727, 2006.
- 177. E. M. Christenson; M. Dadsetan; M. Wiggins; J. M. Anderson; A. Hiltner, Poly (carbonate urethane) and poly (ether urethane) biodegradation: In vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 69, 407-416, 2004.
- 178. X. Xie; R. Wang; J. Li; L. Luo; D. Wen; Y. Zhong; C. Zhao, Fluorocarbon chain end-capped poly(carbonate urethane)s as biomaterials: Blood compatibility and chemical stability assessments. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 89B, 223-241, 2009.
- S. Meng; W. Zhong; L. L. Chou; Q. Wang; Z. Liu; Q. Du, Phosphorylcholine end-capped poly-ε-caprolactone: A novel biodegradable material with improved antiadsorption property. *Journal of Applied Polymer Science*. 103, 989-997, 2007.
- 180. K. Sutherland; J. Mahoney, Degradation of biomaterials by phagocytederived oxidants. *Journal of Clinical Investigation*. 92, 2360, 1993.
- 181. Z. Chen; S. Cheng; Z. Li; K. Xu; G. Q. Chen, Synthesis, characterization and cell compatibility of novel poly (ester urethane)s based on poly (3hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyhexanoate) prepared by melting polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 20*, 1451-1471, 2009.
- 182. Z. Li; S. Cheng; S. Li; Q. Liu; K. Xu; G. Q. Chen, Novel amphiphilic poly (ester-urethane) s based on poly [(R)-3-hydroxyalkanoate]: synthesis, biocompatibility and aggregation in aqueous solution. *Polymer International*. 57, 887-894, 2008.
- 183. R. Eloy; J. Belleville; M. C. Rissoan; a. J. Baguet, Heparinization of Medical Grade Polyurethanes *Journal of Biomaterials Applications.* 2, 1987.
- N. Detta; C. Errico; D. Dinucci; D. Puppi; D. A. Clarke; G. C. Reilly; F. Chiellini, Novel electrospun polyurethane/gelatin composite meshes for vascular grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 21, 1761-1769, 2010.
- 185. I. Topala; N. Dumitrascu; V. Pohoata, Influence of Plasma Treatments on the Hemocompatibility of PET and PET + TiO2 Films. *Plasma Chemistry and Plasma Processing.* 27, 95-112, 2007.

- S. N. Rodrigues; I. C. Gonçalves; M. C. L. Martins; M. A. Barbosa; B. D. Ratner, Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 27, 5357-5367, 2006.
- L. Poussard; F. Burel; J. Couvercelle; O. Lesouhaitier; Y. Merhi; M. Tabrizian; C. Bunel, In vitro thrombogenicity investigation of new waterdispersible polyurethane anionomers bearing carboxylate groups. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 16, 335-351, 2005.
- 188. F. Burel; L. Poussard; M. Tabrizian; Y. Merhi; C. Bunel, The influence of isocyanurate content on the bioperformance of hydrocarbon-based polyurethanes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 19, 525-540, 2008.
- T. Massa; M. Yang; J. Ho; J. Brash; J. Santerre, Fibrinogen surface distribution correlates to platelet adhesion pattern on fluorinated surfacemodified polyetherurethane. *Biomaterials.* 26, 7367-7376, 2005.
- 190. H. Yeganeh; F. Orang; A. Solouk; M. Rafienia, Synthesis, characterization and preliminary investigation of blood compatibility of novel epoxy-modified polyurethane networks. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 23, 276-300, 2008.
- 191. B. D. Ratner, The catastrophe revisited: Blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials.* 28, 5144-5147, 2007.
- 192. B. Sivaraman; R. A. Latour, The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials.* 31, 832-839, 2010.
- 193. P. H. Blit; W. G. McClung; J. L. Brash; K. A. Woodhouse; J. P. Santerre, Platelet inhibition and endothelial cell adhesion on elastin-like polypeptide surface modified materials. *Biomaterials.* 32, 5790-5800, 2011.
- 194. D. Tan; X. Zhang; J. Li; H. Tan; Q. Fu, Modification of poly(ether urethane) with fluorinated phosphorylcholine polyurethane for improvement of the blood compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. 100A*, 380-387, 2012.
- 195. Z. Tang; M. Zhao; C. Li; Y. Wang; S. Peng, Polyaspartoyl·I-arginine inhibits platelet aggregation through stimulation of NO release from endothelial cells. *European Journal of Pharmacology.* 588, 41-46, 2008.
- 196. D. Tsikas, A critical review and discussion of analytical methods in the larginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Analytical Biochemistry*. 379, 139-163, 2008.

INETHORING RI

- H. Zhao; M. C. Serrano; D. A. Popowich; M. R. Kibbe; G. A. Ameer, Biodegradable nitric oxide-releasing poly(diol citrate) elastomers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 93A, 356-363, 2010.
- 198. Y. Liu; J. Chen; Y. Yang; F. Wu, Improved blood compatibility of poly (ethylene terephthalate) films modified with L-arginine. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 19, 497-507, 2008.
- 199. M. Ding; J. Li; X. Fu; J. Zhou; H. Tan; Q. Gu; Q. Fu, Synthesis, degradation, and cytotoxicity of multiblock poly (ε-caprolactone urethane) s containing gemini quaternary ammonium cationic groups. *Biomacromolecules*. 10, 2857-2865, 2009.
- M. Ding; X. He; Z. Wang; J. Li; H. Tan; H. Deng; Q. Fu; Q. Gu, Cellular uptake of polyurethane nanocarriers mediated by gemini quaternary ammonium. *Biomaterials.* 32, 9515-9524, 2011.
- V. Thomas; T. V. Kumari; M. Jayabalan, In Vitro Studies on the Effect of Physical Cross-Linking on the Biological Performance of Aliphatic Poly(urethane urea) for Blood Contact Applications. *Biomacromolecules.* 2, 588-596, 2001.
- 202. V. Thomas; M. Jayabalan, A new generation of high flex life polyurethane urea for polymer heart valve—Studies on in vivo biocompatibility and biodurability. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 89A, 192-205, 2009.
- G. R. Da Silva, Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 491-499, 2010.
- 204. M. Tanzi; P. Verderio; M. Lampugnani; M. Resnati; E. Dejana; E. Sturani, Cytotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 5, 393-396, 1994.
- 205. A. Stjerndahl; A. Finne-Wistrand; A. C. Albertsson; C. M. Bäckesjö; U. Lindgren, Minimization of residual tin in the controlled Sn (II) octoate-catalyzed polymerization of ε-caprolactone. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 87, 1086-1091, 2008.
- 206. F. Xu; J. C. Nacker; W. C. Crone; K. S. Masters, The haemocompatibility of polyurethane-hyaluronic acid copolymers. *Biomaterials.* 29, 150-160, 2008.
- M. R. Kibbe; J. Martinez; D. A. Popowich; M. R. Kapadia; S. S. Ahanchi; O. O. Aalami; Q. Jiang; A. R. Webb; J. Yang; T. Carroll; G. A. Ameer, Citric acid-based elastomers provide a biocompatible interface for vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 93A, 314-324, 2010.

- 208. Y. Zhu; C. Gao; T. He; J. Shen, Endothelium regeneration on iuminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. *Biomaterials.* 25, 423-430, 2004.
- 209. C. Zhang; X. Wen; N. R. Vyavahare; T. Boland, Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique. *Biomaterials.* 29, 3781-3791, 2008.
- 210. L. Malachowski; J. A. Holcombe, Comparison of immobilized poly-L-aspartic acid and poly-I-glutamic acid for chelation of metal cations. *Analytica chimica acta.* 517, 187-193, 2004.
- M. Castonguay; J. T. Koberstein; Z. Zhang; G. Laroche, en *Biomedical* Applications of Polyurethanes, P. Vermette; H. J. Griesser; G. Laroche; R. Guidoin, Eds. Landes Bioscience, Texas, 2001, 1-22.
- 212. U. Hersel; C. Dahmen; H. Kessler, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 24, 4385-4415, 2003.

Apendice A. Propiedades del Tecoflex®

Tabla 3-V. Resumen de las propiedades del Tecoflex[®] relevantes para su uso en aplicaciones cardiovasculares.

Clasificación de acuerdo a su composición química	Polieteruretano
Segmento flexible	PTMEG(Politetrametileneterglicol)
Diisocianato	H ₁₂ MDI (4,4-metilen bis ciclo hexil diisocianato)
Extensor de cadena	BDO (Butanodiol)
Características superficiales	Hidrofóbico
Comportamiento a tensión	Elastomérico
Degradación	Ligeramente degradable bajo condiciones oxidativas. No degradable por hidrólisis
Hemocompatibilidad	Muy buena
Citocompatibilidad	Buena adhesión a corto plazo, pobre retención y proliferación celular.

N.

Apendice B. Publicaciones

Artículos

L.H. Chan-Chan; C. Tkaczyk; R.F. Vargas-Coronado; J.M. Cervantes-Uc; M. Tabrizian; J.V. Cauich-Rodríguez, Biodegradable segmented polyesterurethane ureas prepared with aminoacids as chain extenders for vascular applications. (Enviado)

L.H. Chan-Chan; R.F. Vargas-Coronado; J.M. Cervantes-Uc; J.V. Cauich-Rodríguez; R. Rath; E.A. Phelps; A.J. García; J. San Román del Barrio; J. Parra; M. Tabrizian; Y. Merhi, Platelet adhesion and human umbilical vein endothelial cell cytocompatibility of biodegradable segmented polyurethanes prepared with 4, 4'-methylene bis (cyclohexyl isocyanate), poly (caprolactone) diol and butanediol or dithioerythritol as chain extenders. *Journal of Biomaterials Applications.* 2012, On line.

Participación en congresos

L.H. Chan-Chan, C. Tkaczyk, M. Tabrizian, R.F. Vargas-Coronado, J.M. Cervantes-Uc, J.V. Cauich-Rodríguez. *Properties of Biodegradable Segmented Polyesteruretane Ureas Prepared with Aminoacids as Chain Extender*. 9th World Biomaterials Congress, 1-5 de Junio, 2012. Chengdu, China. Poster.

<u>C. Tkaczyk</u>, **L.H. Chan-Chan**; Y. Merhi; J.V. Cauich-Rodríguez; M. Tabrizian, Hemocompatibility of New Biodegradable Segmented Polyesterurethane Ureas by Quartz Crystal Microgravimetry. 9th World Biomaterials Congress,1-5 de Junio, 2012. Chengdu, China. Oral.

L.H. Chan-Chan, C. Tkaczyk, J.M. Cervantes-Uc, M. Tabrizian, J.V. Cauich-Rodríguez. *Synthesis and Biocompatibility of New Segmented Polyurethanes Prepared with Aminoacids as Chain Extenders*. 29th annual conference of the Canadian Biomaterials Society. 1-4 de Junio, 2011. Vancouver, Canada. Poster.

3

×.

and a

Anto

÷

Č

14

*