

**Desarrollo y evaluación de plataformas poliméricas tipo
PolyHIPEs para el crecimiento de fibroblastos**

**Trabajo de grado para obtener el título de:
Química**

Lina Marcela Suárez Giraldo

Asesores:

Dr. Luis Fernando Giraldo Morales

Dr. Víctor Hugo Orozco

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Instituto de Química

Medellín

2020

Agradecimientos

A Dios y la vida por ponerme en el lugar que siempre anhele, con las personas indicadas.

A mi amada familia, mi madre: Luz Marina, mi padre: Aureliano, mis hermanos: Diana y Juan David y mi compañero Gustavo por tanto amor y apoyo incondicional.

A mis tíos Luis Fernando y Nohelia por tanto cariño, y por enseñarme el significado de trabajar duro por lo que se quiere.

Al Laboratorio de investigación en polímeros por abrirme las puertas y poder llevar a cabo mi tesis de grado y a cada uno de sus integrantes por compartir conmigo su compañerismo y conocimientos.

Al Dr. Luis Fernando Giraldo, coordinador del *Laboratorio de Investigación en Polímeros* de la Universidad de Antioquia y asesor de este trabajo, por su compañía durante el proceso, sus esfuerzos, su gestión, su paciencia y su guía que fueron claves para que este trabajo se llevara a cabo.

Al Dr. Víctor Hugo Orozco, profesor del *Laboratorio de Investigación en Polímeros* de la Universidad de Antioquia, por sus consejos y su guía, que tuvieron una importancia superlativa dentro de este trabajo.

A Sandra Alfonso, Lenka Toro y David Arboleda por abrirme las puertas en la facultad de odontología de la Universidad de Antioquia, para llevar a cabo todo lo relacionado con la viabilidad celular.

Al técnico Jorge Ruíz, del *Laboratorio de Análisis instrumental* de la Universidad de Antioquia, por facilitarnos el acceso al equipo de espectroscopia IR.

A Carlos Murillo del grupo Biomat de la universidad de Antioquia, por facilitarnos el equipo de tensiómetro

A mis amigos por tanto apoyo, cariño y felicidad brindada durante estos años, me sentí totalmente afortunada de tenerlos conmigo.

Tabla de contenido

Lista de figuras	VII
Lista de tablas	IX
Glosario de términos	XI
Resumen.	XII
Palabras clave	XIII
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Ingeniería de tejidos	1
1.1.1 Principios básicos de ingeniería de tejidos	1
1.1.2 Materiales para ingeniería de tejidos	3
1.1.3 Técnicas de fabricación en la ingeniería de tejidos	4
1.1.4 Aplicaciones de la ingeniería de tejidos	6
1.2 Fibroblastos	8
1.2.1 ¿Qué son los fibroblastos?	8
1.2.2 Clasificación.	8
1.2.3 Características	12
1.2.4 Función	13
1.3 Plantillas en emulsión	14
1.3.1 Plataformas poliméricas tipo <i>PolyHIPes</i>	14
1.3.2 Polímeros biodegradables	17
1.3.3 Porosidad en los <i>PolyHIPes</i>	18

1.3.4 Interconectividad	18
1.4 Planteamiento del problema	18
1.5 Hipótesis	19
1.6 Objetivos	19
1.6.1 Objetivo general	19
1.6.2 Objetivos específicos	19
Capítulo 2: Materiales y técnicas experimentales	21
2.1 Materiales	21
2.2 Técnica experimental	22
2.3 Metodología	23
2.3.2 Caracterización de las plataformas poliméricas	26
2.3.3 Pruebas de viabilidad celular	27
Capítulo 3: Análisis y resultados	29
3.1 Caracterización de plataformas	29
3.2 Pruebas de viabilidad celular	40
3.2.2 Adhesión y crecimiento celular	44
3.3 Obtención de microsferas	45
3.4 Conclusiones	46
Referencias	47

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama proceso ingeniería de tejidos	2
Figura 2. Fibroblasto, Tomada de: https://www.flickr.com/photos/zeissmicro/2372592486	13
Figura 3. Esquema PolyHIPE	15
Figura 4. Planteamiento del problema.....	19
Figura 5. Montaje experimental de polimerización en emulsión	22
Figura 6. Metodología usada en la fabricación del PolyHIPE	23
Figura 7. Reacción de polimerización.....	23
Figura 8. Mecanismo de reacción de la canforquinona	24
Figura 9. Lámparas usadas en el fotocurado.	25
Figura 10. Lavado de plataformas por inmersión	25
Figura 11. Cultivo de células en PolyHIPE	28
Figura 12. PolyHIPE 1, SEM	30
Figura 13. PolyHIPE 2, SEM	31
Figura 14. TGA PolyHIPE 2.....	32
Figura 15. PolyHIPE 3, SEM	33
Figura 16. IR PolyHIPE 3.....	34
Figura 17. Ángulo de contacto PolyHIPE 3.....	35
Figura 18. TGA PolyHIPE 3.....	36
Figura 19. PolyHIPE 4, SEM	38
Figura 20. PolyHIPE 5, SEM	39
Figura 21. IR PolyHIPE 5.....	39
Figura 22. Ángulo de contacto PolyHIPE 5.....	40
Figura 23. Pocillo de cultivo para PolyHIPE 1, 2 Y 3.....	41

Figura 24. Proliferación de fibroblastos	42
Figura 25. recubrimiento de plataformas con gelatina tipo B.....	43
Figura 26. Disminución de ángulo de contacto.....	43
Figura 27. Prueba de tinción con orceína.	44
Figura 28. Adherencia de fibroblastos a los PolyHIPEs	45
Figura 29. Obtención de microesferas.....	45

Lista de tablas

Tabla 1. Métodos de producción.....	5
Tabla 2. Materiales usados para PolyHIPEs.....	21
Tabla 3. Condiciones de cada grupo de análisis.....	29
Tabla 4. Composición de PolyHIPE 1.....	29
Tabla 5. Composición PolyHIPE 2.....	30
Tabla 6. Composición de PolyHIPE 3.....	33
Tabla 7. Composición del PolyHIPE 4.....	37
Tabla 8. Composición de PolyHIPE 5.....	38

Glosario de términos

CQ: Canforquinona

FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

HIPE: Emulsión de alta fase interna

IBOA: Isobornil acrilato

IR: Infrarrojo.

PolyHIPE: Polímero en emulsión de alta fase interna

PU: Poliuretano.

UV: Ultravioleta

TEGDMA: Trietilenglicol dimetacrilato.

SEM: Espectroscopia electrónica de barrido

W/O: Emulsión de agua en aceite

Resumen.

El desarrollo de nuevos materiales poliméricos que pueden ser empleados como soportes para el crecimiento y proliferación celular es un área de investigación en continuo desarrollo debido a la capacidad de diseñar estructuras biológicas funcionales que sustituyan, reparen o regeneren tejidos dañados, a causa de la demanda creciente de enfermedades y lesiones celulares que se puedan presentar. Para llevar a cabo este tipo de desarrollos son utilizadas las plataformas poliméricas, más conocidas como *polyHIPE*¹ (polímeros de emulsión alta fase interna) las cuales son plantillas en emulsión, compuestas a su vez por fase dispersa de agua que se encuentra en mayor proporción y una fase continua restante que es la orgánica, compuesta por un monómero, surfactante, entrecruzante y un iniciador, en el momento en el que la fase orgánica es polimerizada y se procede el secado se obtiene estructuras sólidas, altamente porosas. En este trabajo se emplea como alternativa una nueva plataforma polimérica donde se plantea la polimerización en emulsión² de una fase orgánica utilizando el monómero IBOA, TRIM, Span 60 y como iniciador la mezcla de Canforquinona y 4 N,N Trimetil anilina, en cada experimento se varían las porciones de ambas fases (90:10, 80:20,70:30) obteniendo emulsiones estables, estructuras altamente porosas, con una buena interconectividad por la formación de huecos-ventanas y una elevada biocompatibilidad, las plataformas son materiales bastante hidrofóbicos resistentes a procesos de esterilización y tienen potencial aplicación para el crecimiento y proliferación de fibroblastos.

Palabras clave

Fibroblastos

Fotopolimerización

Curado UV

Monómeros

PolyHIPE

Polimerización en emulsión

Plataformas poliméricas

Surfactante

Capítulo 1: Introducción

Una enfermedad degenerativa es una afección generalmente crónica mediante un proceso continuo basado en cambios degenerativos en las células, en la cual la función o la estructura de los tejidos u órganos afectados empeoran con el transcurso del tiempo, a partir de este tipo de deficiencias es posible fabricar nuevos tejidos a partir de pequeños fragmentos de tejidos sanos, logrando restaurar la funcionalidad parcial o total de tejidos u órganos dañados, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea o cartílago³. Por ahora esta nueva ciencia denominada ingeniería de tejidos es capaz de asegurar la recuperación de la función perdida y sin duda, en un futuro no lejano, será capaz de desarrollar tejidos y órganos que sean similares a los naturales, es por esto la necesidad del desarrollo de plataformas poliméricas para el estudio de células, células enfermas que puedan sobre expresarse sobre un marcador específico, de igual manera células sanas que permitan sustituir, reparar o regenerar un tejido dañado, lo que puede ser posible a partir de la síntesis de plataformas poliméricas tipo *PolyHIPE*.

1.1 Ingeniería de tejidos

1.1.1 Principios básicos de ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo que aplica principios de medicina regenerativa para restablecer la función de varios órganos al combinar células con biomateriales. Es un método multidisciplinario, que a menudo combina las habilidades de médicos, biólogos celulares, bioingenieros y científicos de materiales para recapitular la estructura tridimensional original de un órgano, los tipos celulares apropiados, los nutrientes de sostén y los factores de crecimiento que permitirán el crecimiento, diferenciación y función celulares.

La ingeniería de tejidos es un campo relativamente nuevo⁴, que se originó a finales del decenio de 1970. Los primeros estudios se centraron en esfuerzos para crear sustitutos de la piel utilizando biomateriales y células cutáneas epiteliales con el

objetivo de proporcionar una barrera de protección para los pacientes con quemaduras, las primeras estrategias utilizaron biopsias de tejidos, seguidas de expansión ex vivo de células sembradas en andamiajes. Más tarde se implantaron andamiajes complejos al mismo paciente, donde el nuevo tejido podría madurar. Sin embargo, hubo muchos obstáculos que superar. Los tres principales retos en el campo de ingeniería de tejidos involucraron: 1) la capacidad de crecer y expandir las células humanas primarias en grandes cantidades; 2) la identificación de biomateriales apropiados y 3) los requerimientos para una vascularización e inervación adecuadas del material sometido a ingeniería.

La combinación de un andamio y células en una solución restaura, sustituye o imita un tejido dentro del cuerpo para una aplicación regeneradora como lo muestra la figura 1.

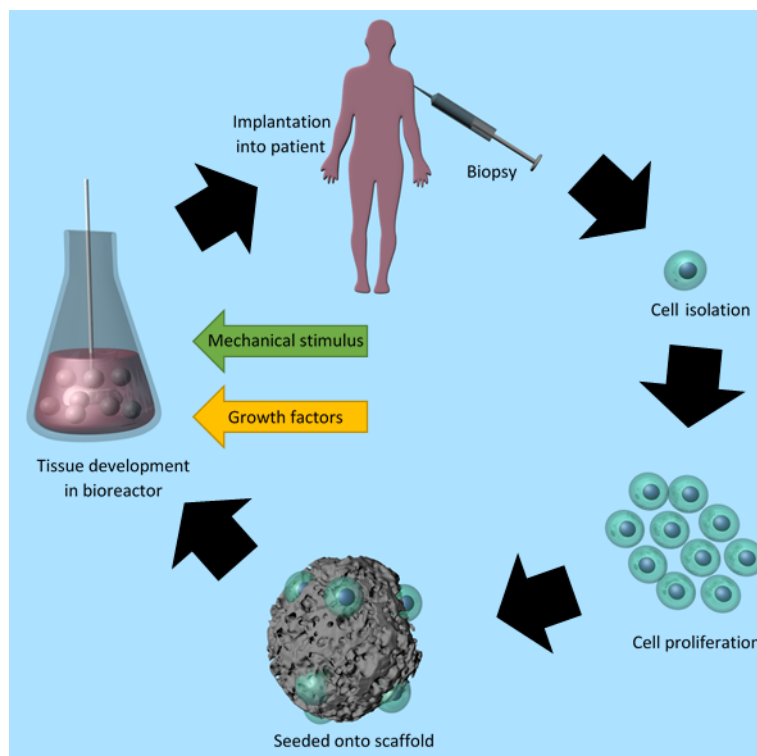


Figura 1. Diagrama proceso ingeniería de tejidos

1.1.2 Materiales para ingeniería de tejidos

Los materiales sintéticos que aparecen como más apropiados para la obtención de soportes son los materiales poliméricos. En particular, el poli (ácido láctico), PLA, y el poli (ácido glicólico), PGA, se han utilizado profusamente en el desarrollo de sustitutos para diferentes tejidos. Ambos polímeros son reabsorbibles⁵. Además, tienen un gran atractivo los propios materiales de origen biológico, buscando replicar la composición natural de nuestros tejidos. Así, por ejemplo, la hidroxiapatita es el biomaterial más abundante en nuestros huesos y se han desarrollado sustitutos biológicos empleando hidroxiapatita⁶. En este caso la ciencia de materiales ha contribuido al desarrollo de las tecnologías de obtención de pastas y sólidos que contienen hidroxiapatita y tienen una porosidad adecuada para permitir la proliferación celular y en último término la reabsorción y la sustitución del implante por hueso natural.

Los materiales sintéticos, por su parte, presentan más alta resistencia mecánica y siguen siendo objeto de investigación para mejorar su biocompatibilidad y controlar su degradación⁷. Dentro del estudio se presentaron los nanomateriales como un área de amplio desarrollo y de alta proyección para su aplicación en ingeniería tisular.⁸

En cuanto al componente celular de los productos obtenidos mediante ingeniería de tejidos, se trata de que estas células utilizadas ayuden a las propias células del organismo a la regeneración y recuperación de la funcionalidad. En algunos casos pueden emplearse células de donantes y en otros casos se emplean células del propio paciente, que pueden proliferar in vitro, en las condiciones adecuadas. En la primera década del siglo XXI se han abierto nuevas oportunidades para este componente, por el posible empleo de células madre en personas adultas e incluso de células pluripotenciales inducidas. En ambos casos, la esperanza es que estas células faciliten la regeneración de los tejidos.

1.1.3 Técnicas de fabricación en la ingeniería de tejidos

Existen muchas técnicas mediante las cuales se puede procesar un biomaterial para transformarlo en un *scaffold*⁹, algunas de ellas son: moldeo con solvente, lixiviación del porógeno, formación de espuma con gas a altas presiones, formación de fibras no tejidas, separación de fases y emulsión secada por liofilización, entre otras. Cada una de las tecnologías mencionadas lleva consigo sus pros y sus contras, sin embargo, es posible combinar algunas de estas metodologías con el fin de mejorar las propiedades finales del *scaffold*. Una combinación que es comúnmente usada por su bajo costo y la capacidad de generar una buena cantidad de poros interconectados, es la lixiviación del porógeno combinada con moldeo por solvente (Porogen leaching and solvent casting)¹⁰. Esta técnica consiste en dispersar partículas que tengan la morfología deseada en los poros, como una especie de plantillas en la solución polimérica, para luego gelar o fijar la estructura mediante la evaporación del solvente y finalmente removerlas, generando así el *scaffold*.¹¹ Esta técnica permite un buen control sobre el tamaño y morfología de los poros, sin embargo presenta algunas limitaciones como lo es una de ellas el espesor del *scaffold*, puesto que un espesor grande puede generar poros ocluidos y dificultar la remoción del porógeno. Dado que es una técnica que amerita el uso de solventes normalmente de tipo orgánico, es posible que queden pequeños residuos en la estructura que dependiendo el nivel de concentración y la aplicación podrían generar dificultades, sin embargo, esta situación puede sortearse con un buen procedimiento de lavado. Más de los métodos utilizados se encuentran mencionados en la **tabla 1**.

Tabla 1. Métodos de producción

Técnica	Descripción
CO ₂ supercrítico	El polímero se disuelve en CO ₂ supercrítico en la alta presión y luego la solución rápidamente se descomprime, formando micropartículas. En este proceso, el polímero se satura, primero, con dióxido de carbono (CO ₂) a alta presión. Luego, el sistema se apaga en estado sobresaturado, ya sea reduciendo presión o al aumentar la temperatura que resulta en la nucleación y crecimiento de poros: células dentro de la matriz polimérica ¹²
Gelación	Este sistema a menudo se usa para encapsular células dentro de hidrogeles. Estas células encapsuladas se pueden usar entonces para la imprenta bio o para esconder células del sistema inmunológico de un cuerpo. ¹³
Evaporación por solvente	Un polímero se disuelve en un solvente y luego esta mezcla se añade a una solución en cual el solvente es el insoluble. Dentro de esta solución, el polímero se forma en gotitas esféricas. El solvente se deja evaporarse que deja partículas sólidas del polímero. Esta técnica tiende a formar una distribución de tallas de partículas, pero los parámetros se pueden templar para crear una distribución razonablemente estrecha de tallas. ¹⁴
Emulsión	Las emulsiones son una combinación de dos soluciones inmiscibles, con una de las fases que forman partículas dentro de la otra fase. El agua en el petróleo (w/o) o petróleo en el agua (o/w) emulsiones se puede utilizar para formar partículas sólidas. Un polímero la emulsión de la fase interna alta es un ejemplo excelente de un sistema de emulsión avanzado y hablan de esto detalladamente más tarde en el capítulo. ¹⁵

1.1.4 Aplicaciones de la ingeniería de tejidos

Andamios inyectables

Las ventajas principales de usar partículas para la ingeniería del tejido consisten en que se pueden inyectar en el cuerpo, evitando la necesidad de la cirugía abierta. Este estilo de la cirugía es clave es una técnica mucho menos invasiva que la cirugía abierta. Una vez inyectado, las partículas llenarían una desprovista parte de cualquier forma dentro del cuerpo. En contraste un andamio tradicional se tendría que replantear basado en exploraciones del paciente, durante la operación o cambio de la herida del paciente para encajar la forma de la implantación. Para la ingeniería del tejido, las partículas se pueden utilizar en áreas que son difíciles al acceso quirúrgicamente o en un área donde el acto de la cirugía abierta causaría más daño que el andamio traería. Los andamios inyectables a menudo son sin embargo incapaces de apoyar la carga inmediatamente una vez implantada y sólo se pueden por lo tanto de una manera realista usar en la no carga áreas críticas.¹⁶

Recientemente, Los hidrogeles inyectables se han convertido en un candidato potencial entre varias categorías de biomateriales para la regeneración del tejido cardíaco debido al cumplimiento mejorado del paciente y la administración fácil a través del modo invasivo mínimo que trata el infarto complejo. Esta revisión analiza en detalle los avances realizados en el campo de los materiales inyectables para la ingeniería del tejido cardíaco, destacando sus méritos sobre sus homólogos preformados.¹⁷

Agregados de micropartículas

Hay dos técnicas convencionales para partículas agregadas en una estructura más grande. La técnica tradicional es la sinterización de la partícula donde las partículas se producen y luego se sinterizan juntas térmicamente o por medios químicos. La técnica más nueva permite que las células que han sido cultivadas en la superficie de partículas se agreguen a través de división celular y producción ECM. Las partículas que aglomera las partículas al azar se arreglan y se afilian el uno al otro. Esto produce una estructura muy muy interconectada. El control de la talla del poro

se consigue controlando la talla de las partículas y así técnico la talla de los huecos entre partículas. Hay sin embargo muchas desventajas a esta técnica. El proceso de sinterización por lo general requiere un tratamiento externo de calor o productos químicos que es muy tóxico a células, esto es causa de las células que solo están colonizando la estructura después de que la sinterización ha ocurrido. Es difícil entonces conseguir que las células penetren profundamente con la estructura a menos que las técnicas de perfusión complicadas se usen. Los andamios también pierden su capacidad para directamente inyectarse en el cuerpo ya que son ahora un objeto sólido grande incapaz de fluir. Si las partículas se sinterizan dentro del cuerpo para obtener alrededor de esta desventaja, el método de sinterización puede ser no tóxico para recibir el tejido que excluye la mayor parte de los tratamientos químicos.¹⁸

Andamios liberadores de agentes bioactivos

Las biomoléculas incorporadas en el andamio para ser entregadas después de la implantación son una forma poderosa de mejorar la bioactividad de los andamios. Se incluyen medicamentos y biomoléculas para mejorar el crecimiento óseo y para controlar y aumentar la vascularización. Los compuestos se pueden agregar al material del andamio para liberarlos en la degradación; embalado en la porosidad de un andamio para filtrarse con el tiempo; o unido a la superficie del andamio. Las biomoléculas usadas comúnmente para andamios óseos incluyen proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), FGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), heparina y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Se ha demostrado que BMP aumenta la formación de hueso.

1.2 Fibroblastos

Las características de fibroblastos han sido ampliamente revisadas ¹⁹²⁰ desde el año 2006.

1.2.1 ¿Qué son los fibroblastos?

El fibroblasto es la célula más común y menos especializada del tejido conjuntivo, se derivan de células primitivas mesenquimales y pluripotenciales, forma parte del tejido conjuntivo, junto con los condrocitos, los osteocitos, las células musculares lisas y los adipocitos. Las células mesenquimales son células pluripotenciales indiferenciadas (tienen capacidad de autorrenovarse y además diferenciarse en otras células del tejido conectivo) que se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo, en especial en la médula ósea. En medio de cultivo se adhieren al sustrato y proliferan por varias generaciones. Se ha postulado a estas células como fuente potencial de diversas estirpes celulares (neuronales, hepáticas, musculares, cardíacas y óseas), que podrían utilizarse para reparar ciertos tipos de daños funcionales.²¹

En el pasado su función carecía de complejidad puesto que tan sólo era catalogado como un tejido de soporte para otros tipos celulares. Sin embargo, en la actualidad, este concepto ha sido totalmente reevaluado, al encontrar en los fibroblastos una estructura y funciones muy particulares. El fibroblasto es una célula dinámica, la cual ejerce funciones tisulares a nivel local y del sistema inmune, y al evaluarlo en cultivo se ha encontrado de manera interesante, que los fibroblastos no son homogéneos entre sí, sino que presentan diferencias en morfología y función de acuerdo con la ubicación en la que se encuentren.

1.2.2 Clasificación.

Condrocitos.

Los condrocitos son el tipo celular que da lugar a los cartílagos de los animales y son la parte celular del mismo tejido. En la actualidad se ha conseguido el cultivo en

condiciones de laboratorio de condrocitos para su posterior inserción en tejido cartilaginoso dañado para su proliferación y reparación del cartílago. Se conocen como condroblastos a los condrocitos activos, presentes en cartílagos en desarrollo, cuando su actividad decrece, y varía su morfología, se denominan condrocitos. Los condrocitos sintetizan la matriz extracelular, que es el principal componente del cartílago, a diferencia de otros tejidos los condrocitos sintetizan de forma abundante la matriz extracelular, cuya composición es diferente a la del resto de tejidos, en ella el colágeno, ácido hialurónico y los peptidoglucanos son los componentes mayoritarios. Los condrocitos son, tan solo, el 5% del tejido, sin embargo sin ellos el cartílago desaparecería debido al desgarre y al desgaste de la matriz debido a su uso, es por eso que la presencia de condrocitos activos es muy importante para la salud de los tendones, dependiendo del tipo de cartílago, hialino, fibroso o elástico la composición de la matriz celular, y en consecuencia la actividad metabólica de los condrocitos, siendo en el cartílago elástico el único que sintetizan elastina como componente de la matriz.

Osteocitos.

Son un tipo de célula ósea, que parte del tejido óseo, es decir intrínseca de los huesos, la cual está alojada en la matriz, en la parte más importante de un hueso. Más precisamente se alojan en una pequeña cavidad y diseminan prolongaciones que se contactan con otros osteocitos conformando un complejo sistema, es importante indicar que la comunicación que entablan los diversos osteocitos es fundamental para tener un control de la cantidad de hueso que se está formando o que se destruye, es decir, para mantener controlado el equilibrio dinámico de esta célula tan esencial para el organismo, entre las principales funciones de los osteocitos se destacan su capacidad de sintetizar y de reabsorber los componentes de la matriz, dado que los mismos disponen de una gran relevancia en la regulación del calcio. Los huesos son sin dudas uno de los componentes fundamentales del cuerpo humano formando el esqueleto de los seres vertebrados, caracterizándose por ser sus piezas duras, tienen la importantísima función de sostenimiento del cuerpo humano de manera erguida y ni hablar de la relevancia que despliegan a la hora del movimiento, siendo fundamentales las articulaciones para tal hecho,

además tienen otra notable función los huesos que es la de proteger los órganos vitales que se alojan en el organismo, los pulmones, el corazón, el cerebro, entre otros. Es decir, si existe un golpe, una caída, primero se deberán enfrentar a la solidez que proponen los huesos que son una especie de escudos de aquellos órganos importantes. Afortunadamente, los huesos, disponen de una enorme capacidad de regeneración y de reconstitución una vez que suelen verse afectados por algún daño.

Células musculares lisas.

El tejido muscular liso está formado por la asociación de células largas que pueden medir de 5 a 10 μm de diámetro por 80 a 200 μm de largo. Están generalmente dispuestas en capas sobre todo en las paredes de los órganos huecos, como el tubo digestivo o vasos sanguíneos. Además de esta disposición encontramos células musculares lisas en el tejido conjuntivo que reviste ciertos órganos como la próstata y las vesículas seminales y en el tejido subcutáneo de determinadas regiones como el escroto y los pezones. También se pueden agrupar formando pequeños músculos individuados (músculo erector del pelo), o bien constituyendo la mayor parte de la pared del órgano, como el útero.

Las fibras musculares lisas están revestidas y mantenidas unidas por una red muy delicada de fibras reticulares. También encontramos vasos y nervios que penetran y ramifican entre las células.

En el corte transversal el músculo liso se presenta como un aglomerado de estructuras circulares o poligonales que pueden ocasionalmente presentar un núcleo central. En corte longitudinal se distinguen una capa de células fusiformes paralelas.

La fibra muscular lisa también está revestida por una capa de glucoproteína amorfa (glucálix). Frecuentemente las plasmalemas de dos células adyacentes se aproximan mucho formando uniones estrechas. Esas estructuras no sólo participan de la transmisión intercelular del impulso, sino que mantienen la unión entre las células. Existe un núcleo alargado y central por célula. La fibra muscular lisa presenta haces de miofilamentos que cruzan en todas direcciones, formando una

trama tridimensional. En el músculo liso también existen terminaciones nerviosas, pero el grado de control de la contracción muscular por el sistema nervioso varía. Es importante las uniones gap, en la transmisión del estímulo de célula a célula. El músculo liso, recibe fibras del sistema nervioso simpático y para simpático y no muestra uniones neuromusculares elaboradas (placas motoras). Frecuentemente los axones terminan formando dilataciones del tejido conjuntivo. Estas dilataciones contienen vesículas sinápticas con los neurotransmisores acetilcolina (terminaciones colinérgicas) o noradrenalina (terminaciones adrenérgicas).

Adipocitos.

El adipocito es un tipo celular derivado del fibroblasto cuya principal función es almacenar lípidos, en concreto triglicéridos y colesterol esterificado, como reserva energética. Existen dos tipos de adipocitos, el blanco y el pardo, que forman dos tipos de tejido graso. El adipocito blanco se caracteriza por tener una sola vesícula de grasa que ocupa casi todo el volumen celular quedando el citosol, los orgánulos y el núcleo en una estrecha franja periférica. El adipocito pardo tiene menos cantidad de grasa presentando un mayor número de vesículas de menor tamaño además de un gran número de mitocondrias. El tejido adiposo pardo tiene como principal función generar calor y el tejido adiposo blanco está especializado en el almacenamiento de lípidos como reserva energética a largo plazo. Entre las células del tejido adiposo blanco se han observado tabiques de tejido conectivo probablemente relacionados con la función de amortiguación. En los niños pequeños la grasa blanca se distribuye por todo el cuerpo mientras que en los adultos la acumulación de este tejido es más localizada. La localización diferenciada en los adultos es un carácter sexual secundario. El tejido adiposo puede aumentar por un crecimiento del número de células que lo forman (crecimiento hiperplásico) o por el tamaño de las células existentes (crecimiento hipertrófico). El tejido adiposo pardo es más abundante en neonatos y va transformándose en tejido adiposo blanco con el desarrollo. Está situado en regiones estratégicas como rodeando grandes vasos sanguíneos para mantener siempre la temperatura corporal adecuada. Sus mitocondrias presentan un gran número de crestas donde se

produce una oxidación desacoplada del proceso de fosforilación oxidativa con lo que la energía se disipa en forma de calor sin producir ATP.

Determinados estudios in vitro con células del tejido conjuntivo han determinado factores que pueden influir en la diferenciación hacia adipocitos. La hormona del crecimiento y el IGF-1 estimulan esta diferenciación. También se ha visto que la falta de espacio en los cultivos inhibe la diferenciación hacia adipocitos. En cualquier caso, parece ser una combinación de señales solubles y contactos con la matriz lo que determina su formación, aunque los efectos de cada elemento dependerán también del microambiente de la célula.

1.2.3 Características

El tejido conjuntivo y las células que lo forman varían según el órgano, tiene gran capacidad de diferenciación hacia el resto de las células del tejido conjuntivo, normalmente tiene forma alargada, fusiforme, citoplasma basófilo, un núcleo elíptico, abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi desarrollado, se encuentran ampliamente distribuidos y son fáciles de cultivar in vitro. Hay dos tipos celulares: los fibroblastos y los fibrocitos. Se distinguen gracias a que los fibroblastos son células activas y con gran producción y secreción, en cambio, los fibrocitos son células con una secreción relativamente baja, aunque no son inactivas, ya que mantienen, en parte, la composición de la matriz extracelular. Puede realizarse una imagen visual a través de un microscopio de luminiscencia de las células de fibroblastos tal y como se muestra en la figura 2.

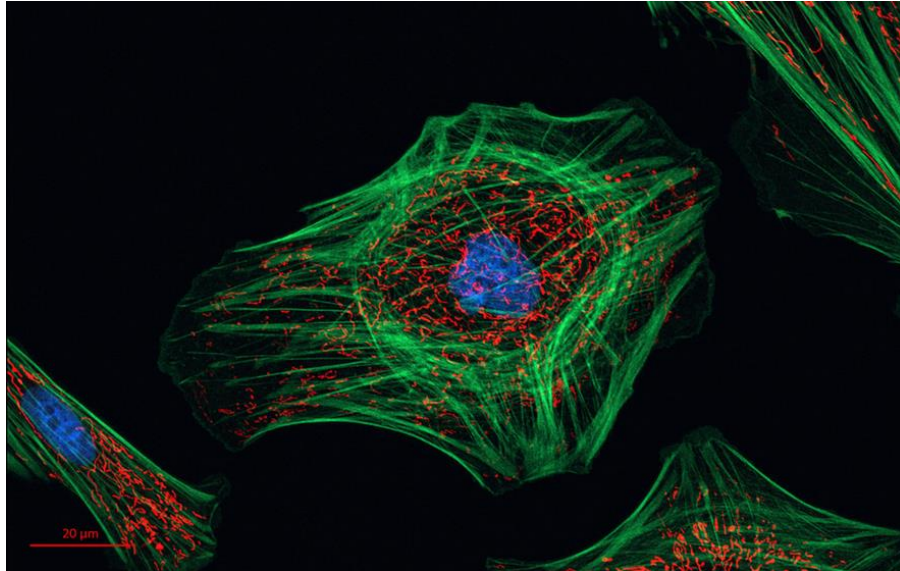


Figura 2. Fibroblasto, Tomada de: <https://www.flickr.com/photos/zeissmicro/2372592486>

1.2.4 Función

Su función es la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, imprescindible para mantener la integridad del tejido conjuntivo. El fibroblasto está involucrado además en los procesos de cicatrización, ya que cuando ocurre daño tisular, se induce mitosis de fibroblastos y se estimula la producción de, sobre todo, colágeno, que aísla el tejido y favorece su reparación. También sintetiza los precursores de la matriz extracelular como el colágeno, sintetiza especialmente el colágeno de tipo I, aunque puede sintetizar también otros tipos según el órgano donde se encuentre el tejido.

Proteínas fibrosas que se encuentran embebidas en la sustancia amorfa. Destacan la fibronectina y la laminina. La fibronectina forma fibrillas que permiten la adhesión de las células a la matriz extracelular. Además, interviene en la migración de las células y en los procesos de cicatrización. También regula la forma celular y la organización del citoesqueleto. La laminina forma parte de la lámina basal. Exhiben contractilidad y motilidad utilizadas en la determinación de la organización estructural del tejido conectivo, especialmente durante la embriogénesis.

1.3 Plantillas en emulsión

1.3.1 Plataformas poliméricas tipo *PolyHIPES*

Los *PolyHIPES* (polímeros de emulsión alta fase interna) las cuales son plantillas en emulsión, compuestas a su vez por fase dispersa de agua que se encuentra en mayor proporción y una fase continua restante que es la orgánica, compuesta por un monómero, surfactante, entrecruzante y un iniciador, en el momento en el que la fase orgánica es polimerizada y se procede el secado se obtiene estructuras sólidas, altamente porosas, un HIPE se encuentra en un estado semiestable, la estabilidad de una emulsión es dictada por la energía interfacial del sistema. Un sistema intenta reducir al mínimo la energía interfacial reduciendo el área de superficie entre las dos fases. El proceso de plantilla en emulsión conserva la estructura interna de una emulsión cuando este es convertido a un material sólido.²²

La parte sólida de un *polyHIPE* se forma cuando la fase monómero que rodea la gotita, que puede ser polimerizada para dejar una cáscara sólida en la cual la fase acuosa puede drenar. Una emulsión de la fase interna alta (HIPE) es una emulsión que puede formar una porosidad de hasta el 99%, pero debe contener al menos el 74% de agua, cuando el contenido de agua es mayor que el 74%, las gotitas comienzan a deformarse para permitir la porosidad más alta. Las gotitas son todas distintas el uno del otro en esta etapa con una capa delgada de la fase continua que rodea cada gotita. La emulsión implica retener la estructura interna de una emulsión durante el proceso de solidificación para formar una estructura sólida. Esto se hace substituyendo un monómero como una de las fases y luego curando el monómero²³.

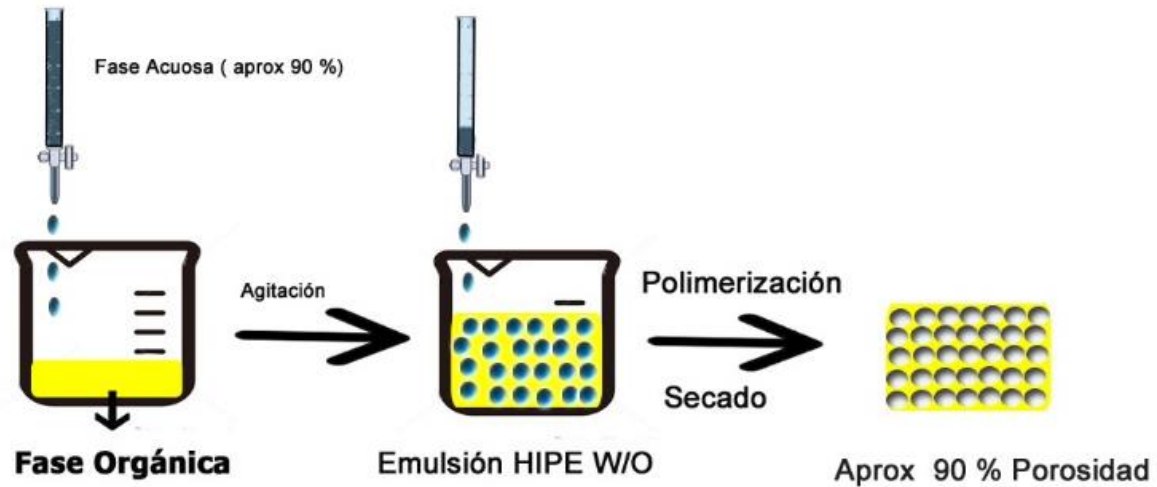


Figura 3. Esquema PolyHIPE

Los siguientes componentes se usan comúnmente para formular un polyHIPE. Hay excepciones a las que se enumeran a continuación, pero la mayoría del material PolyHIPE contiene lo siguiente.

Surfactante

Se forma un tensioactivo a partir de dos regiones, una hidrofóbica y otra hidrofílica y su función principal es estabilizar una emulsión. El tensioactivo se disuelve en la fase continua y reside en la interfaz entre las dos fases y permite la formación de un límite entre las dos fases. Un ejemplo bien conocido de esto es el jabón doméstico, que permite la emulsión de gotas de grasa dentro del agua. Cuando se agrega surfactante al monómero, disminuye la tensión interfacial de las gotas y también aumenta la probabilidad de la formación de porosidad interconectada. Si bien generalmente cuanto más surfactante se agrega a un sistema, las micelas son donde el surfactante se autoensambla en una esfera con todas las colas hidrofílicas o hidrofóbicas dispuestas hacia adentro para minimizar la energía de la superficie y así eliminar efectivamente el surfactante del sistema. El surfactante más común es el Span 80²³, aunque existen muchos otros junto con materiales naturales de superficie activa como como gelatina y almidón. La adición de un tensioactivo disminuye la tensión superficial y la viscosidad de la solución de monómero. Esto

provoca una formación de pared más delgada entre los poros dentro del andamio, lo que aumenta el tamaño de poro de interconexión del polyHIPE. El tensioactivo no sufre ningún cambio durante la etapa de curado y, por lo tanto, puede eliminarse del *polyHIPE* para eliminar cualquier efecto tóxico que pueda tener sobre las células. Puede ser difícil asegurar que todo el surfactante se haya eliminado del polyHIPE durante el paso posterior al procesamiento, aunque técnicas como la extracción de Soxhlet se usan ampliamente.

Entrecruzante

El grado de reticulación afecta tanto a las propiedades mecánicas como a la respuesta celular al material. El reticulante aumenta el número de conexiones ramificadas dentro del polímero. Es posible aumentar la rigidez de un material aumentando la concentración de reticulante dentro de la solución de monómero. La rigidez es bien conocida por tener un efecto significativo en la diferenciación celular y los materiales de alta rigidez pueden causar protección contra el estrés en los huesos, reduciendo la masa ósea y la densidad en las áreas circundantes. La rigidez de los materiales en la escala microscópica a la que se enfrentan las células puede ser diferente a la rigidez en masa que está influenciada por otros factores como la porosidad.¹

Monómero

Se utiliza un monómero o una combinación de monómeros para formar el material continuo del *PolyHIPE*. Para formar una fase polimérica continua dentro de una emulsión de aceite en agua, el polímero debe ser hidrófobo. Cuanto más fuerte sea la hidrofobicidad, más estable será la emulsión. Esto puede ser un problema para los polímeros biocompatibles ya que la unión celular es superior en superficies hidrofílicas. Las emulsiones de aceite en agua se pueden formar con polímeros hidrófilos, pero la fase de gotitas debe ser un aceite. Esto aumenta en gran medida el tiempo de procesamiento posterior y el gasto de formar un andamio. Las superficies hidrofóbicas se pueden tratar con recubrimientos como ácido acrílico o colágeno depositados en plasma para aumentar la eficiencia de absorción celular, aunque esto nuevamente agrega tiempo y gastos al proceso de formación del

andamio. Un sistema de copolímero permite la combinación de propiedades del material para superar un déficit de un material en particular. Los materiales populares de estireno se usan a menudo y producen *polyHIPEs* muy efectivos, aunque no son biodegradables y no son materiales deseables para andamios de ingeniería de tejidos. ²⁴

1.3.2 Polímeros biodegradables

D. Puppi et al ²⁵, investigadores del departamento de química y química industrial de la universidad de Pisa, en Pisa Italia, publicaron un trabajo titulado “Polymeric materials for bone and cartilage repair” en el cual se recopilan los materiales poliméricos tanto naturales como sintéticos, que han sido estudiados para ser empleados en la reparación y/o remplazo del cartílago. Los polímeros naturales más empleados han sido los siguientes:

Colágeno

Este polímero natural es muy biocompatible, pero se degrada fácilmente. Además, ofrece una baja rigidez mecánica.

Quitosano

Tiene buena biocompatibilidad y actividad antibacteriana, pero también presenta debilidad mecánica e incapacidad de mantener una forma predefinida.

Ácido Hialurónico

Su longitud de cadena se puede manipular fácilmente, pero su mayor desventaja radica en que es soluble en agua, lo cual lo hace inadecuado para implantar en medios biológicos, donde el porcentaje de agua es elevado.

Los polímeros sintéticos de uso más común son:

Policaprolactona (PCL).

Este material fue aprobado por la FDA para diferentes aplicaciones médicas, ya que presenta una lenta velocidad de degradación; sin embargo genera productos ácidos en su degradación que pueden generar inflamación y además posee baja interacción celular.

Ácido Poliglicólico (PGA).

Su tamaño y morfología se pueden modificar fácilmente, pero es de rápida degradación y ofrece pocas ventajas mecánicas.

1.3.3 Porosidad en los PolyHIPEs

El aumento del volumen de porosidad en el *PolyHIPE* se puede controlar cambiando el volumen del agua (fase discontinua) añadido a la fase continua. El aumento de la porosidad del material aumenta la difusión de masas de nutrientes y oxígeno, pero reduce la rigidez del bulto del andamio.²²

1.3.4 Interconectividad

La contracción de la transición del monómero al polímero causa la interconectividad del sistema, formándose huecos y dentro de los huecos más agujeros llamados: ventanas que permiten la difusión masiva de nutrientes que necesitan las células para crecer.

1.4 Planteamiento del problema

Se necesitan soportes para el estudio de células en lo que respecta a estructura, funciones, organelas, interacciones, entre otros, se puede cultivar células enfermas que son marcadores que se sobreexpresan en una patología en particular como es el caso de paladar hendido en niños, defectos de nacimiento que se producen cuando el labio o la boca del bebe no se forman adecuadamente durante del embarazo o por el contrario pueden cultivarse células que permitan sustituir, reparar o regenerar un tejido dañado, estos soporte pueden dar soluciones a una gran variedad de enfermedades, dependiendo de donde se haga el implante de la plataforma pueden diferenciarse celularmente tal y como es mostrado en la figura 4.

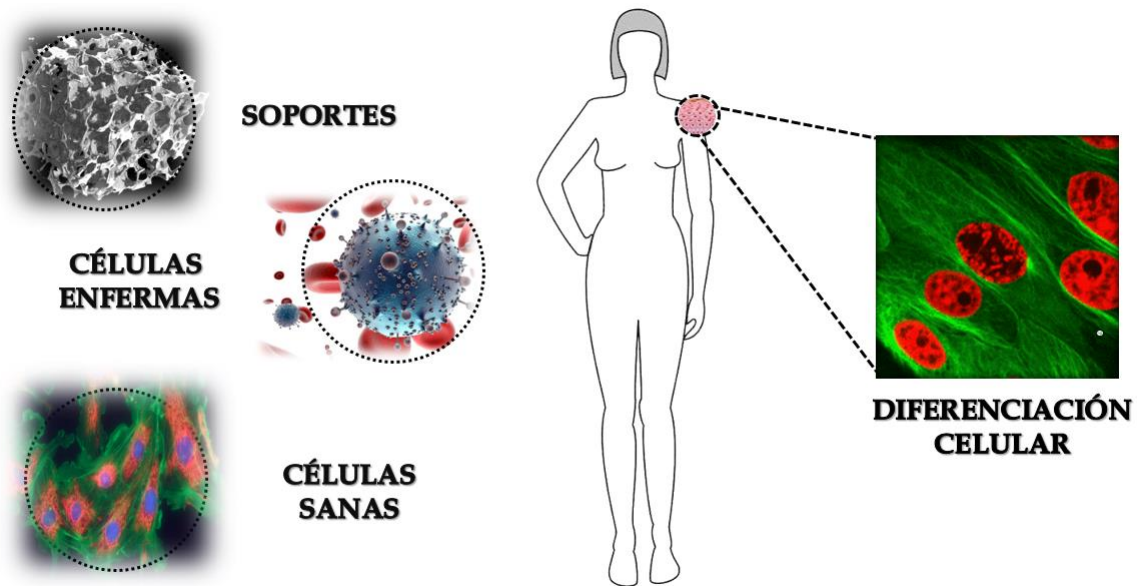


Figura 4. Planteamiento del problema

1.5 Hipótesis

Las plataformas poliméricas tipo *PolyHIPE* basados en (IBOA/TRIM) forman estructuras altamente porosas, permitiendo la proliferación de fibroblastos

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Desarrollar plataformas poliméricas tipo polyHIPE para el crecimiento y proliferación de fibroblastos.

1.6.2 Objetivos específicos

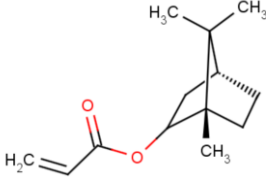
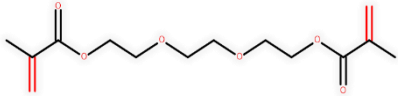
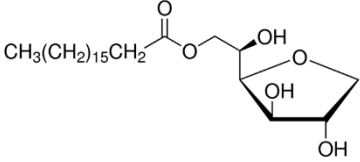
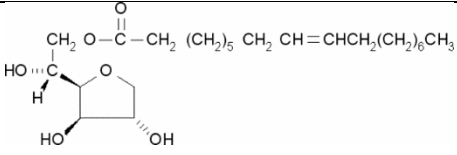
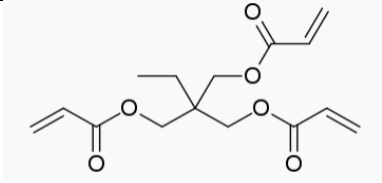
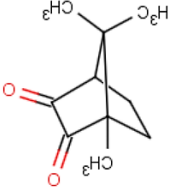
- Sintetizar mediante polimerización en emulsión, plataformas poliméricas basados en IBOA, TRIM
- Evaluar el efecto del surfactante, tipo de entrecruzante sobre las propiedades morfológicas y estructurales.
- Caracterizar las plataformas poliméricas por medio de SEM, FT-IR y ángulo de contacto.

- Realizar pruebas de viabilidad celular para evaluar la biocompatibilidad de los *polyHIPE*

Capítulo 2: Materiales y técnicas experimentales

2.1 Materiales

Tabla 2. Materiales usados para PolyHIPEs

MATERIALES	ESTRUCTURA
Isobornil acrilato (IBOA)	
Trietilenglicol dimetacrilato (TEGMA)	
monoestearato de sorbitano (Span 60)	
Span 80 (monooleato de sorbitano)	
(TRIM) Trimetilol propano triametacrilato	
Canforquinona	

2.2 Técnica experimental

Polimerización en emulsión



Figura 5. Montaje experimental de polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión es un tipo de polimerización radical que generalmente comienza con una emulsión incorporando agua, monómero y un surfactante. El tipo más común de polimerización en emulsión es una emulsión de aceite en agua, en la que las gotitas de monómero se emulsionan con surfactantes en una fase continua de agua. También se pueden usar polímeros solubles en agua, tales como ciertos alcoholes polivinílicos o hidroxietil-celulosas, para actuar como emulsionantes o estabilizadores. ²

2.3 Metodología

La metodología usada se resume en el siguiente esquema, figura 6.

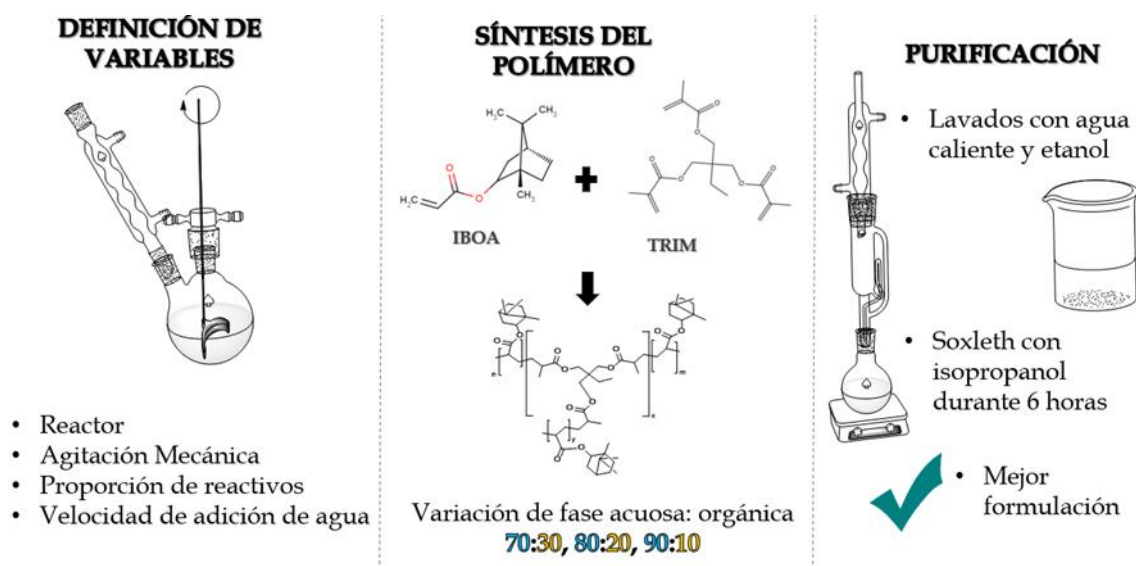


Figura 6. Metodología usada en la fabricación del PolyHIPE

Síntesis del PolyHIPE

La síntesis se llevó a cabo a una temperatura: 80 °C, durante aproximadamente 4 horas, la velocidad de agitación fue de 750 rpm. La fase orgánica es agregada, el monómero IBOA, el cual se mantendrá fijo durante los experimentos, el entrecruzante entre los cuales serán usados el TEGDMA y TRIM y como surfactantes Spam 60 y Span 80.

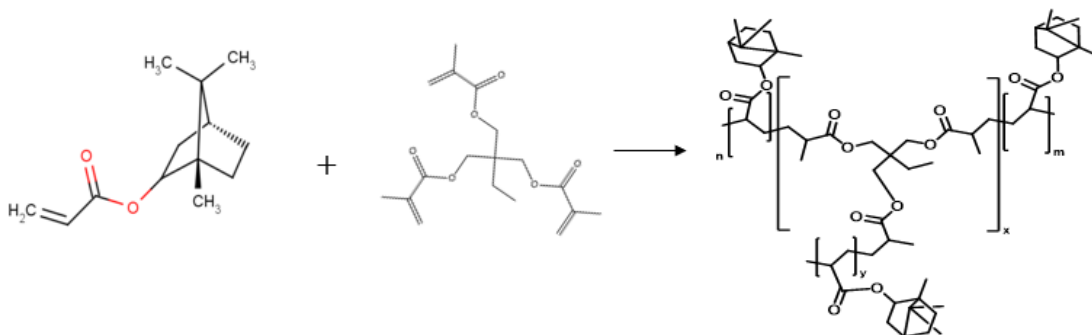


Figura 7. Reacción de polimerización.

Adición del fotoiniciador

Cuando pasó una hora de la reacción, en el tiempo en el que la temperatura es estabilizada se agregó el iniciador (Canforquinona) donde su máxima longitud de onda de absorción es de 468 nm, junto con el coiniador: 4 N, N trimetil anilina para dar paso a la fotopolimeración. El mecanismo de reacción de la Canforquinona junto con el coiniador es mostrado en la figura 8.

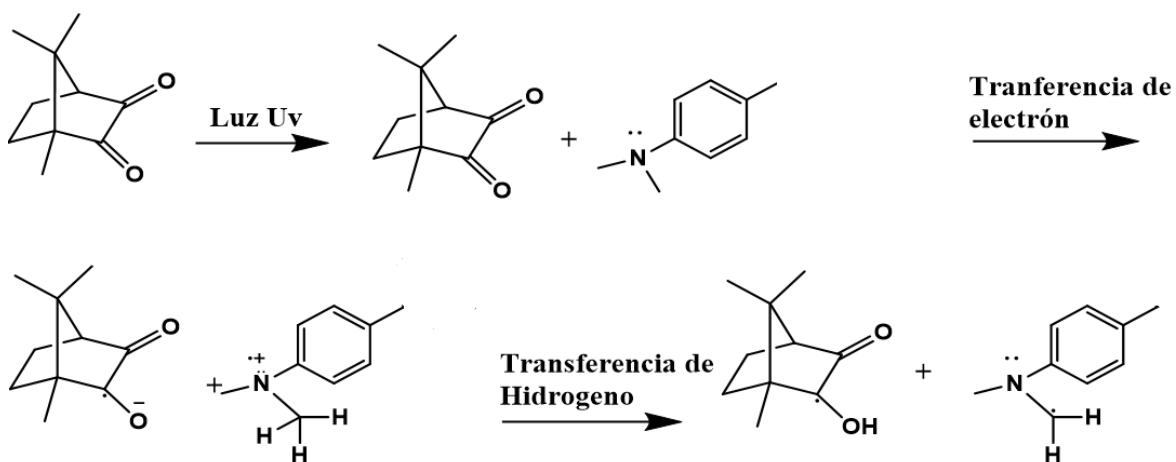


Figura 8. Mecanismo de reacción de la canforquinona

Adición de la fase acuosa

El nivel de dosificación debe ser muy lento, gota por gota ya que este determina la cantidad de poros en el sistema, la dosificación fue: 0,1 ml/min con tiempo de duración de 2 Horas.

Fotocurado

Para el proceso del fotocurado se utilizó una lámpara de curado dental led de 1500mw y una lámpara UV 36 watts, empleándose moldes de teflón para poner las muestras, tal y como lo muestra la figura 9.



Figura 9. Lámparas usadas en el fotocurado.

Pufrificación de plataformas poliméricas

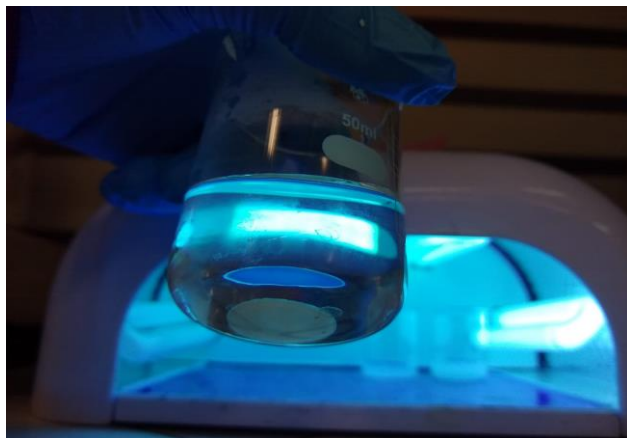


Figura 10. Lavado de plataformas por inmersión

Las plataformas obtenidas se les realizó lavados con: agua caliente, acetona, etanol, además de un soxhlet con isopropanol durante 6 horas y posteriormente son esterilizadas.

2.3.2 Caracterización de las plataformas poliméricas

SEM

El microscopio electrónico de barrido (SEM, utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes. Al incidir el haz de electrones sobre la muestra, interactúa con ella y se producen diversos efectos que serán captados y visualizados en función del equipo que utilizemos.

FT-IR

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR) es el método utilizado para determinar las estructuras de moléculas con características de absorción de la radiación infrarroja según su vibración molecular. La región IR va de 12.800 a 10 cm^{-1} y se puede dividir en la región de IR cercano (NIR) (12.800-4000 cm^{-1}), IR medio (4.000-400 cm^{-1}) e IR lejano o FAR-IR (50-400 cm^{-1}). El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, polímeros, geles, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos.

Angulo contacto

El ángulo de contacto mide el ángulo que forma un líquido al entrar en contacto con un sólido. Cuando las fuerzas de adherencia son muy altas el ángulo es menor de 90° ya que el líquido se ve ‘atraído’ por el sólido y se extiende. En el caso del agua

se denomina superficies hidrófilas. En el caso de que las fuerzas de atracción sean muy bajas la superficie tenderá a 'repeler' el líquido y el ángulo será mayor de 90°, en el caso del agua se le llama hidrófobas.

TGA

TGA, es una técnica que mide la masa de una muestra mientras se calienta, enfría o se mantiene isotérmicamente en una atmósfera definida. Se utiliza principalmente para el análisis cuantitativo de productos. Una curva TGA típica muestra los pasos de pérdida de masa relacionados con la pérdida de componentes volátiles (humedad, solventes, monómeros), descomposición del polímero, combustión de negro de carbón y residuos finales (ceniza, cargas). El método nos permite estudiar la descomposición de productos y materiales y sacar conclusiones sobre sus componentes individuales.

2.3.3 Pruebas de viabilidad celular

Procedimiento:

1. Las plataformas se distribuyen en los pozos y se agrega 200 uL DE PBS, durante 40 minutos, se realizan dos cambios del buffer, durante el proceso se observa el material hidrófobo.
2. Se siembran 30.000 fibroblastos gingivales humanos aislados de pacientes con labio y paladar hendido (hGF-CLP) (Muestra PVL3P3), cultivo con más del 100% de confluencia en un plato de 24 pozos (2 pozos por cada muestra), se completa el volumen con medio de cultivo a 0.5 ml (DMEM + 10% FBS + 1% P/S).
3. Se evalúa en microscopio invertido la morfología y proliferación celular a las 24, 48, 72 horas, y hasta el día 7 de cultivo.

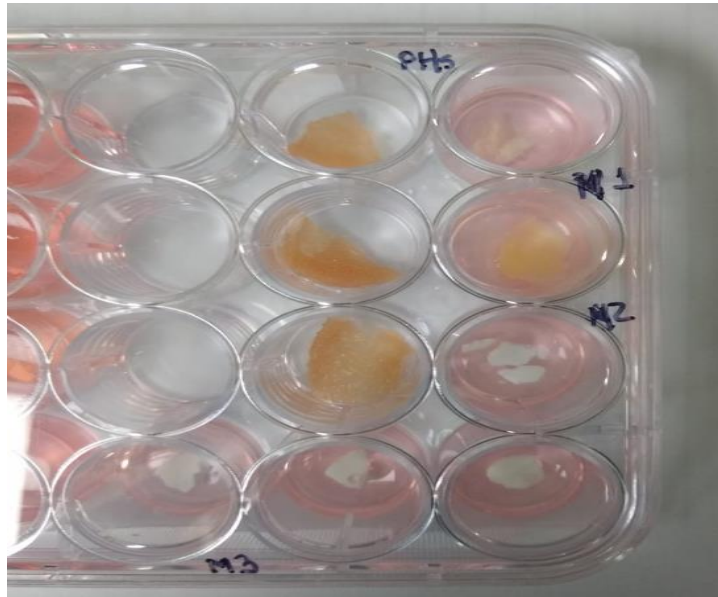


Figura 11. Cultivo de células en PolyHIPE

Capítulo 3: Análisis y resultados

Tabla 3. Condiciones de cada grupo de análisis

GRUPO	I		II	III	
PolyHIPE	1	2	3	4	5
Composición	80:20	90:10	80:20	80:20	70:30
Monómero (63%)	IBOA				
Surfactante (3%)	Span 80		Span 60		
Entrecruzante (35%)	TEGDMA		TRIM		
Foto iniciador (1%)	Canforquinona/ 4-N,N Trimetil anilina				
Cizalla	700 rpm			1200 rpm	

3.1 Caracterización de plataformas

GRUPO I

Síntesis de PolyHIPE 1.

Tabla 4. Composición de PolyHIPE 1.

PolyHIPE 1. 80:20	%m/m
Monómero: IBOA	(63%)
Surfactante: Span 80	(3%)
Entrecruzante: TEGDMA	(35%)
Fotoiniciador: canforquinona/ 4-N,N Trimetil anilina	(1%)
Velocidad de agitación (rpm)	750

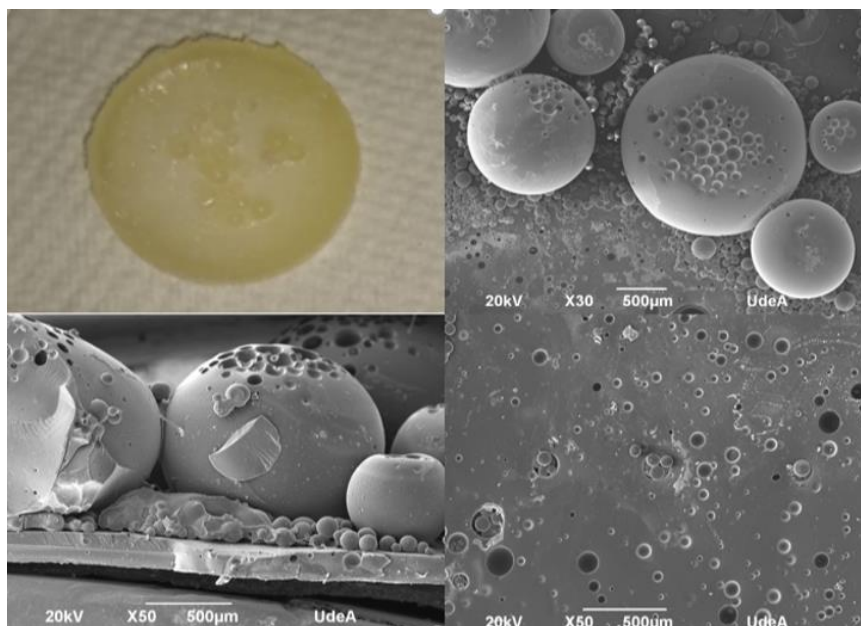


Figura 12. PolyHIPE 1, SEM

Análisis

- En la síntesis del *PolyHIPE 1*, se obtuvieron emulsiones no estables con separación de fases.
- No se observa la interconexión hueco-ventana.
- Los materiales obtenidos son bastante rígidos.

Síntesis de PolyHIPE 2.

Tabla 5. Composición PolyHIPE 2.

PolyHIPE 2. 90:10	%m/m
Monómero: IBOA	(63%)
Surfactante: Span 80	(3%)
Entrecruzante: TEGDMA	(35%)
Fotoiniciador: canforquinona/ 4-N,NTrimetil anilina	(1%)
Velocidad de agitación (rpm)	750

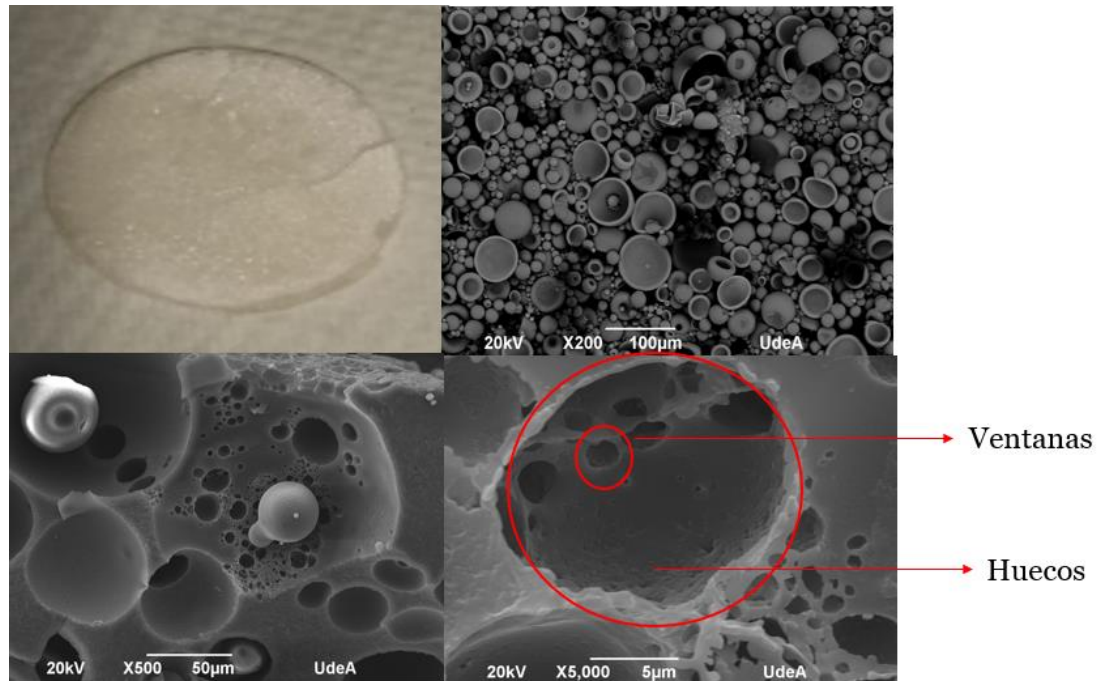


Figura 13. PolyHIPE 2, SEM

Análisis

- En la síntesis del PolyHIPE 2, se obtuvieron esferas colapsadas sobre sí misma, hubo una inversión de fases.
- Obtención de emulsiones no estables, debido a separación de fases
- Se observó una mayor cantidad de zonas porosas, mejor distribución de hueco-ventana, esto se debe al incremento de la fase acuosa.

Análisis de TGA

Puede observarse que son térmicamente estables a temperaturas cercanas a 250°C, esto puede ser por una pérdida leve de masa que puede estar asociada a la pérdida de humedad y también de monómero residual. El primer máximo de la

derivada del % masa con respecto a la temperatura puede corresponder a la descomposición de los segmentos del polímero asociados al poli isobornil acrilato.

Tabla 6. Datos de TGA para PolyHIPE 2 y 2

Muestra	Pérdida de peso (%)	Temperatura (c°)
Polyhipe 2	26,17	286
	66,75	367
	92,617	523
Polyhipe 3	21,19	286
	65,33	372
	90.796	527

Sample: P2
Size: 2.8250 mg

TGA

File: C:\Users\Lina Suárez\Downloads\P2.001
Operator: Brandon
Run Date: 12-Dec-2019 11:30
Instrument: TGA Q500 V6.7 Build 203

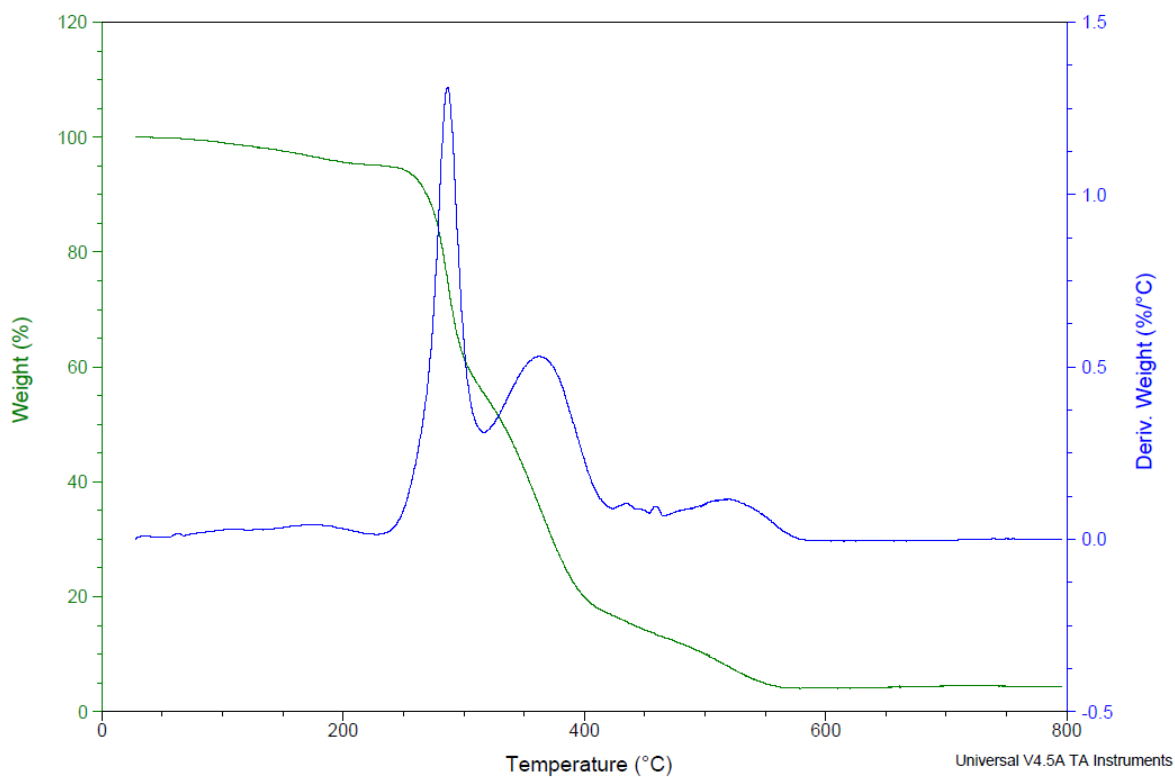


Figura 14. TGA PolyHIPE 2

Síntesis de PolyHIPE 3.

GRUPO II

Tabla 7. Composición de PolyHIPE 3

PolyHIPE 3. 80:20	%m/m
Monómero: IBOA	(63%)
Surfactante: Span 60	(3%)
Entrecruzante: TRIM	(35%)
Fotoiniciador: canforquinona/ 4-N,NTrimetil anilina	(1%)
Velocidad de agitación (rpm)	750

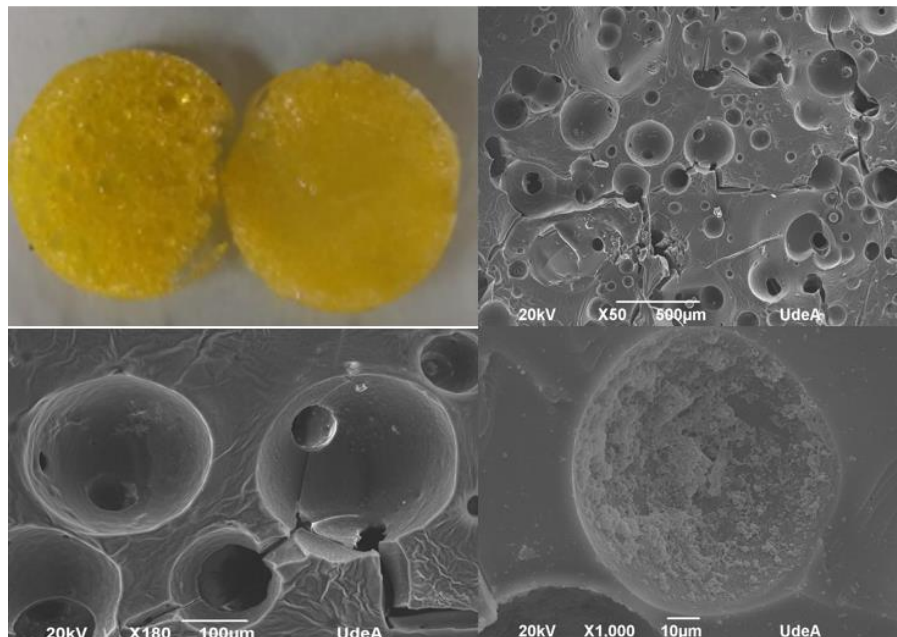


Figura 15. PolyHIPE 3, SEM

Análisis

- Utilizando el TRIM se obtiene un mejor entrecruzamiento, se pasó de una funcionalidad de 2(TEGDMA) a 3(TRIM) y el fotocurado es mucho más rápido
- Se observa la adecuada disposición de los poros, interconexiones hueco-ventana
- La emulsión fue estable, sin separación de fases.

La formulación del PolyHIPE 3, fue la más adecuada es por esto que se le hicieron análisis de IR y ángulo de contacto.

Espectroscopia Infrarroja (IR)

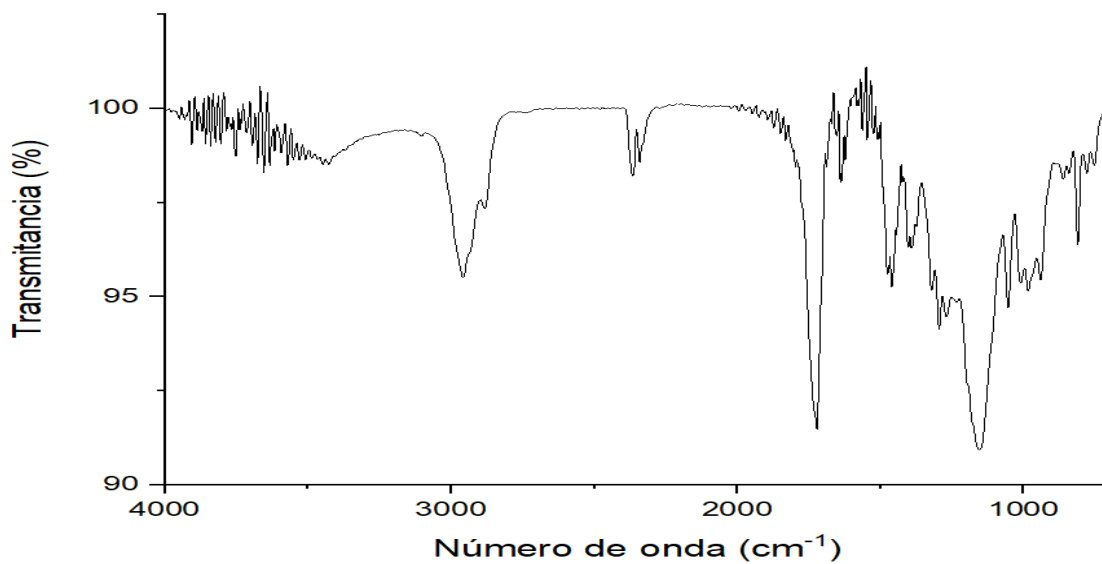


Figura 16. IR PolyHIPE 3

Análisis de IR

El infrarrojo del PolyHIPE 3, muestra las bandas características del grupo carbonilo: 1600-1800, extensión de CH₂ y CH₃: 3000 y extensión C-O: 1100, además de no presentar señal en 1200 características del doble enlace, lo que indica que hubo una buena polimerización.

Ángulo de contacto

La mojabilidad, es la capacidad que tiene un líquido de extenderse y dejar una traza sobre un sólido. Depende de las interacciones intermoleculares entre las moléculas superficiales de ambas sustancias. Se puede determinar a partir del ángulo que el líquido forma en la superficie de contacto con el sólido, denominado ángulo de contacto; a menor ángulo de contacto, mayor mojabilidad. La mojabilidad está relacionada con otros efectos, como la capilaridad. Independientemente del valor de la mojabilidad, cualquier líquido sobre una superficie sólida forma un casquete esférico. Algunas sustancias disueltas en el agua pueden modificar su tensión superficial y por tanto su mojabilidad

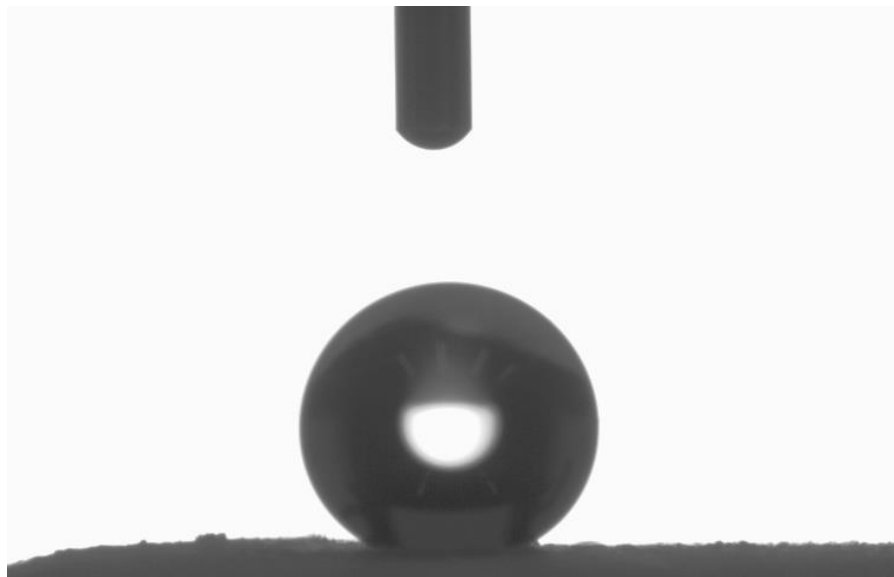


Figura 17. *Ángulo de contacto PolyHIPE 3*

Análisis de ángulo de contacto

Se obtuvo un ángulo de contacto de 152° , presentando un grado de mojabilidad bajo, a este tipo de materiales se le denominan “materiales superhidrofóbicos” ya que el aire queda atrapado en la en las estructuras de la superficie, es por esto que existe una interdependencia entre las irregularidades de la superficie y la reducción de la adhesión de partículas y repelencia al agua, incluso desde la misma naturaleza puede explicarse este fenómeno, que es conocido como el efecto loto, mecanismo

de autolimpieza de muchas superficies biológicas, las hojas de loto siempre van a permanecer limpias a pesar de vivir en zonas lodosas.

Análisis termogravimétrico (TGA)

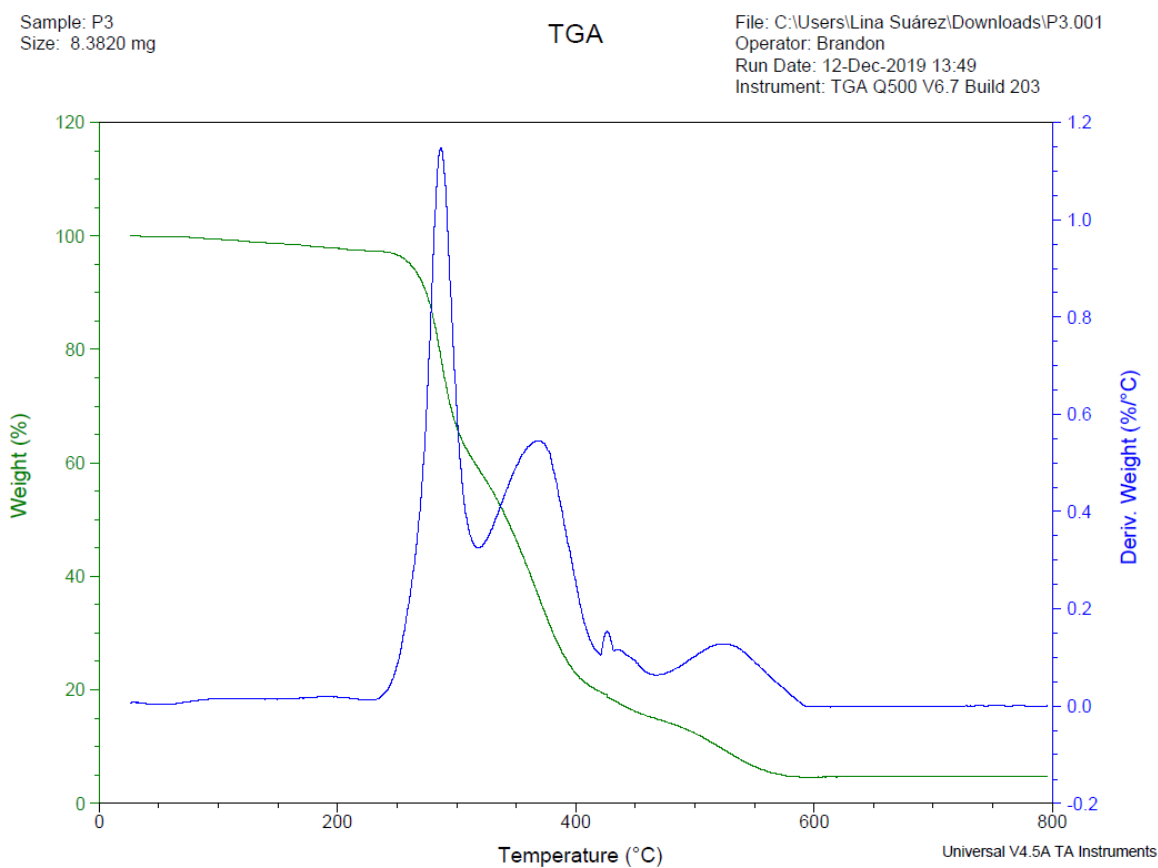


Figura 18. TGA PolyHIPE 3

Análisis de TGA

Puede observarse que son térmicamente estables a temperaturas cercanas a 250°C, esto puede ser por una pérdida leve de masa que puede estar asociada a la pérdida de humedad y también de monómero residual.

El primer máximo de la derivada del % masa con respecto a la temperatura puede corresponder a la descomposición de los segmentos del polímero asociados al poli isobornil acrilato.

Síntesis de PolyHIPE 4

Tabla 8. Composición del PolyHIPE 4

PolyHIPE 4. 80:20	%m/m
Monómero: IBOA	(63%)
Surfactante: Span 60	(3%)
Entrecruzante: TRIM	(35%)
Fotoiniciador: canforquinona/ 4-N,NTrimetil anilina	(1%)
Velocidad de agitación (rpm)	1200

Análisis

- El PolyHIPE tomó una textura débil, quebradiza, debido al aumento de cizalla ya que se pasó de 750 rpm a 1200 rpm.
- Por medio de la microscopia electrónica de barrido pudo observarse la formación de poros, bastante finos esto se debe al aumento de la cizalla, se observan de manera más clara las interconexiones entre los poros, la formación de hueco-ventana

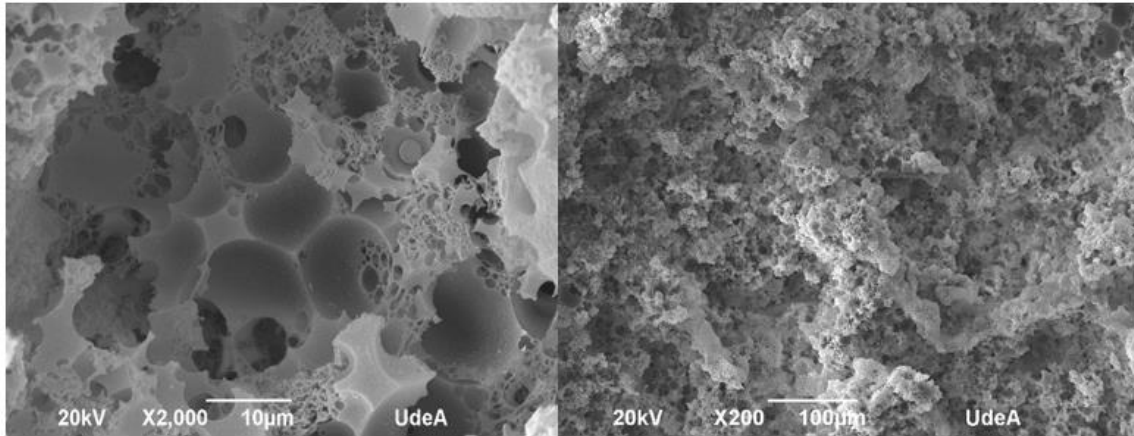


Figura 19. PolyHIPE 4, SEM

Síntesis de Polyhipe 5

Tabla 9. Composición de PolyHIPE 5

PolyHIPE 5.70:30	%m/m
Monómero: IBOA	(63%)
Surfactante: Span 60	(3%)
Entrecruzante: TRIM	(35%)
Fotoiniciador: canforquinona/ 4-N,NTrimetil anilina	(1%)
Velocidad de agitación (rpm)	1200

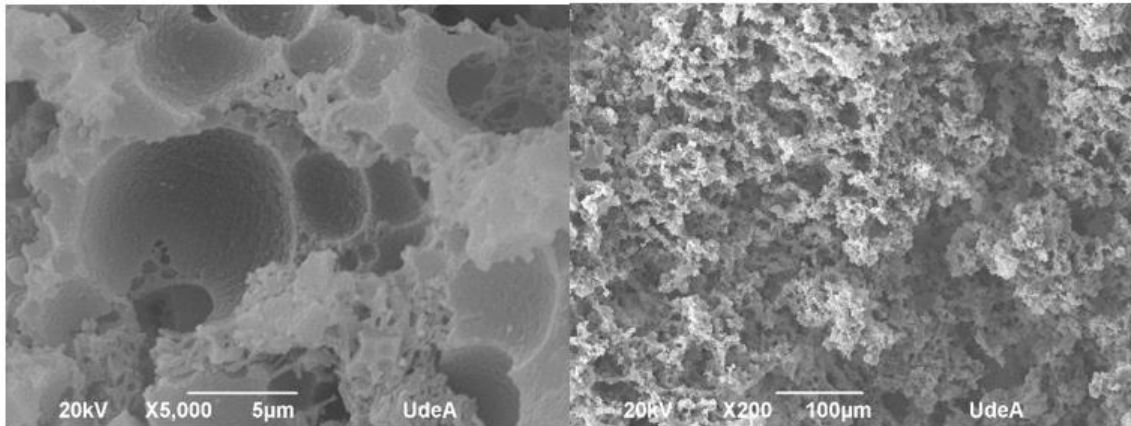


Figura 20. PolyHIPE 5, SEM

Análisis

La emulsión fue estable, no se presentó la separación de fases, muy viscosa, el PolyHIPE tomó una textura débil, quebradiza, por medio de la microscopia electrónica de barrido pudo observarse la formación de poros finos, esto se debe al aumento de la cizalla, se observan de manera adecuada interconexiones entre los poros, la formación de hueco-ventana.

Análisis Infrarrojo

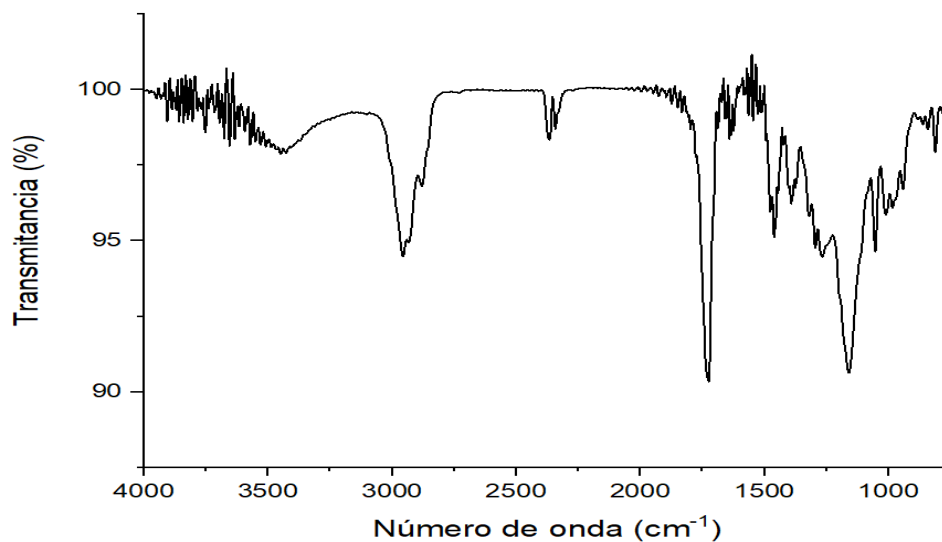


Figura 21. IR PolyHIPE 5

Análisis de IR

El infrarrojo del PolyHipe 5, muestra las bandas características del grupo carbonilo: 1600-1800, extensión de CH₂ y CH₃: 3000 y extensión C-O: 1100, además de no presentar señal en 1200 características del doble enlace, lo que indica que hubo una buena polimerización.

Ángulo de contacto

Se obtuvo un ángulo de contacto de 147°, presentando un grado de mojabilidad bajo, a este tipo de materiales se le denominan “materiales superhidrofóbicos”

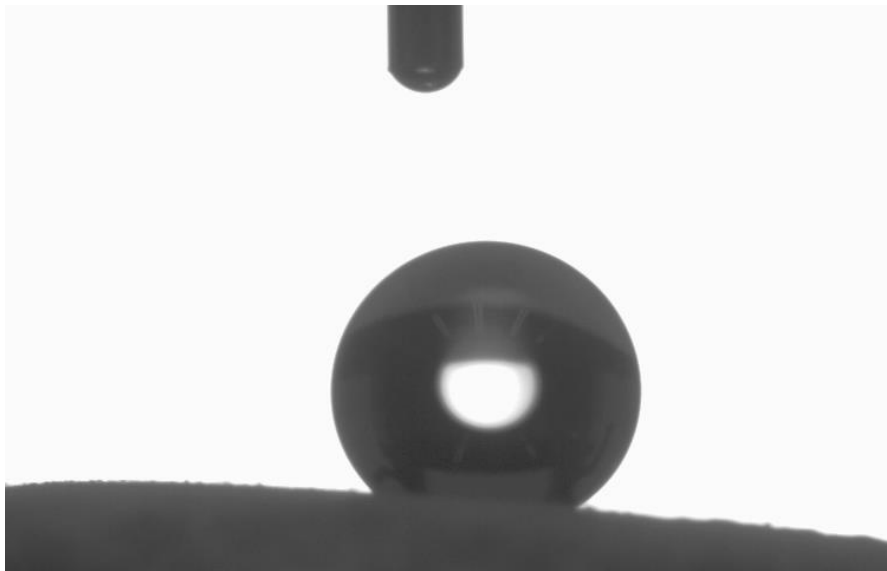


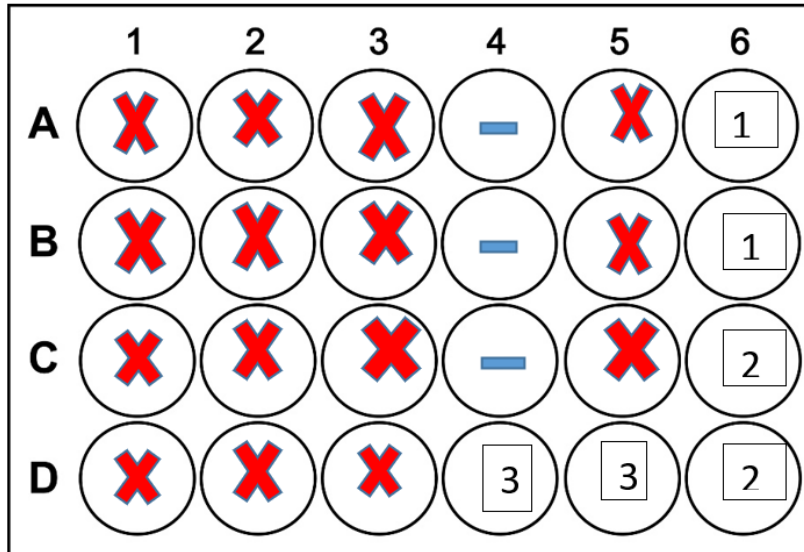
Figura 22. *Ángulo de contacto PolyHIPE 5*

3.2 Pruebas de viabilidad celular

Ensayo de biocompatibilidad

Fecha: agosto 20 de 2019 Hora: 10:30 am

Objetivo: evaluar biocompatibilidad de tres muestras diferentes de PolyHIPEs



Convenciones X: pocillo cultivado - otro ensayo —: pozo sin cultivar. 1,2,3: muestras PHs

Figura 23. Pocillo de cultivo para PolyHIPE 1, 2 Y 3.

Las muestras de células cultivadas fueron (Fibroblastos gingivales) tomadas de pacientes con labio y paladar hendido (hGF-CLP) (Muestra PVL3P3), cultivo con más del 100% de confluencia en un plato de 24 pozos (2 pozos por cada muestra), se completa el volumen con medio de cultivo a 0.5 ml (DMEM + 10% FBS + 1% P/S).

Se evalúa en microscopio invertido la morfología y proliferación celular a las 24, 48, 72 horas. Las plataformas se distribuyen en los pozos y se agrega 200 ul DE PBS, durante 40 minutos, se realizan dos cambios del buffer, durante el proceso se observa el material hidrófobo. Se siembran 30.000 fibroblastos gingivales humanos aislados.

Análisis de biocompatibilidad

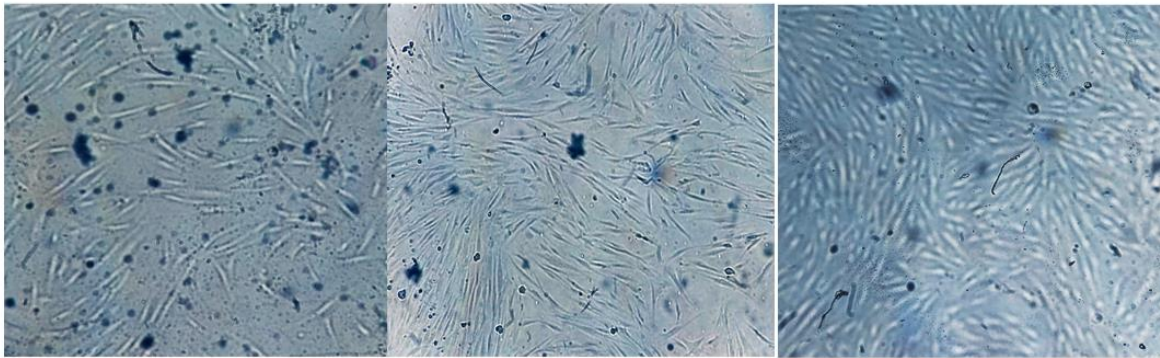


Figura 24. Proliferación de fibroblastos

24 horas de cultivo

Morfología de las células en forma de uso, adheridas al sustrato, con aproximadamente 50% de confluencia.

48 horas de cultivo

Morfología de las células en forma de uso, adheridas al sustrato, con aproximadamente 60% de confluencia.

72 horas de cultivo

Morfología de las células en forma de uso, adheridas al sustrato, con aproximadamente 70% de confluencia.

144 horas de cultivo

Morfología de las células en forma de uso, adheridas al sustrato, con aproximadamente 80% de confluencia.

192 horas de cultivo

Morfología de las células en forma de uso, adheridas al sustrato, con aproximadamente 90% de confluencia. Las células en este tiempo empiezan a morir debido a la falta de espacio, por el contacto.

Recubrimiento de plataformas

Para mejorar hidrofobicidad de los materiales, las plataformas fueron recubiertas por gelatina tipo B, una de las proteínas mas abundantes, extraídas del cuerpo de los animales, su importancia radica en las propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, contiene abundantes grupos hidrofílicos.

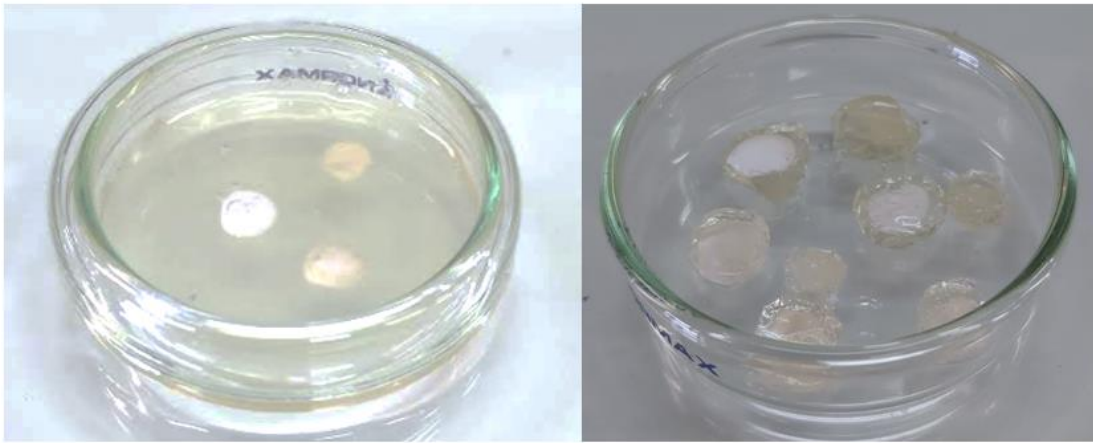


Figura 25. recubrimiento de plataformas con gelatina tipo B

Disminución de ángulo de contacto

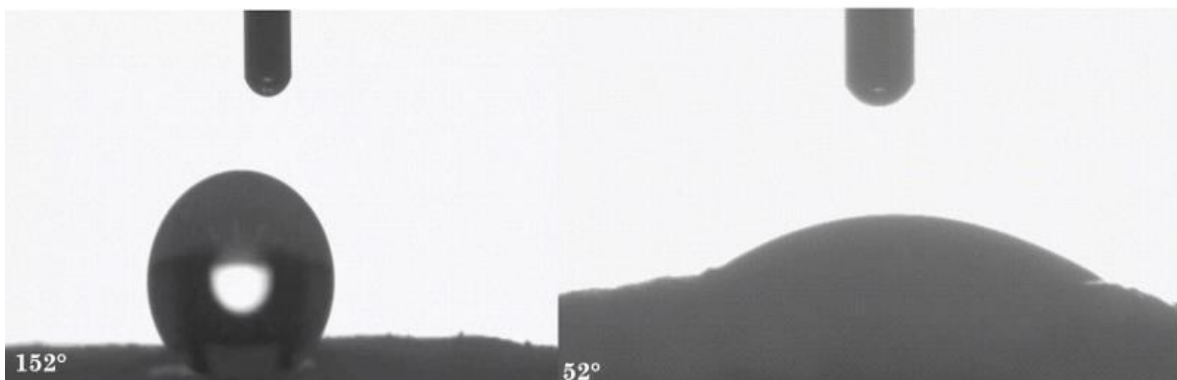


Figura 26. Disminución de ángulo de contacto

El carácter hidrofílico de la gelatina se le atribuye a la gran cantidad de grupo amino y carboxílicos, el grupo amino es polar y tiende a recoger un ion de hidrogeno adicional, esto hace que sea una especie que aceptora de hidrógenos y por lo tanto que tenga una fuerte influencia hidrofílica, es por esto que se logra pasar de 152° a 52°.

3.2.2 Adhesión y crecimiento celular

Pruebas de Orceína

La Orceína es un colorante natural de color púrpura, extraído de diversos líquenes como: orchilla o urchilla, liquen fruticoso, Rocella tinctoria y Lecanora parella principalmente. La Rocella tinctoria se encuentra en el continente africano y americano, aunque puede ser remplazada por otras especies ubicadas en Europa.

Este colorante ha sido ampliamente usado en los estudios citogenéticos desde la antigüedad.

Esta técnica de tinción permite ver los cromosomas impregnados por la orceína acética en color morado y de esta manera poder observar las diferentes etapas de la mitosis; esto facilita la visualización de las etapas del ciclo celular.

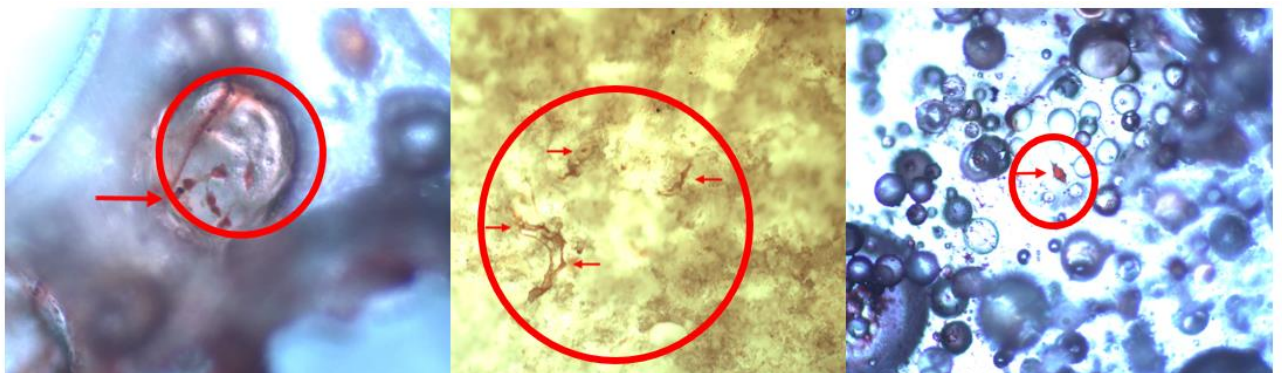


Figura 27. Prueba de tinción con orceína.

Por medio del SEM, se pudieron observar la adherencia de los fibroblastos a las plataformas poliméricas tal y como lo muestra la figura 28.

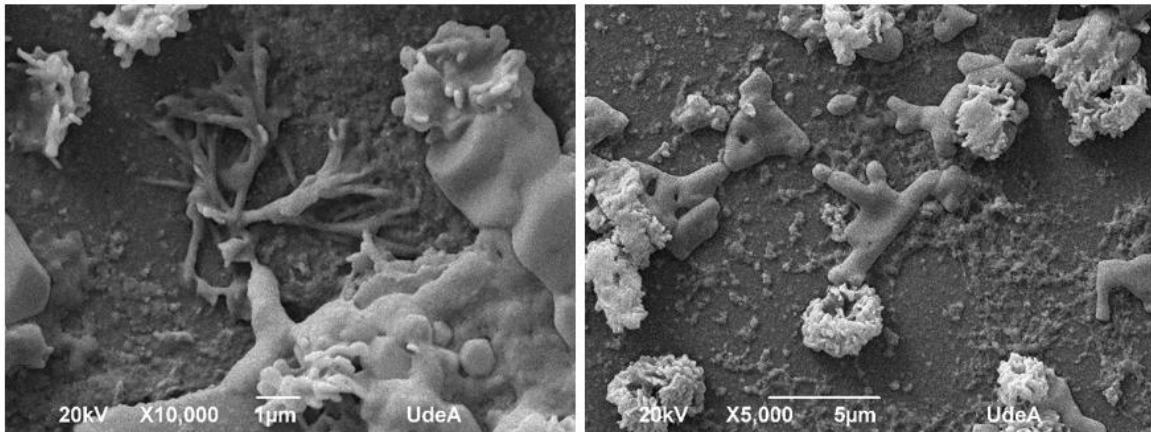


Figura 28. Adherencia de fibroblastos a los PolyHIPEs

3.3 Obtención de microesferas

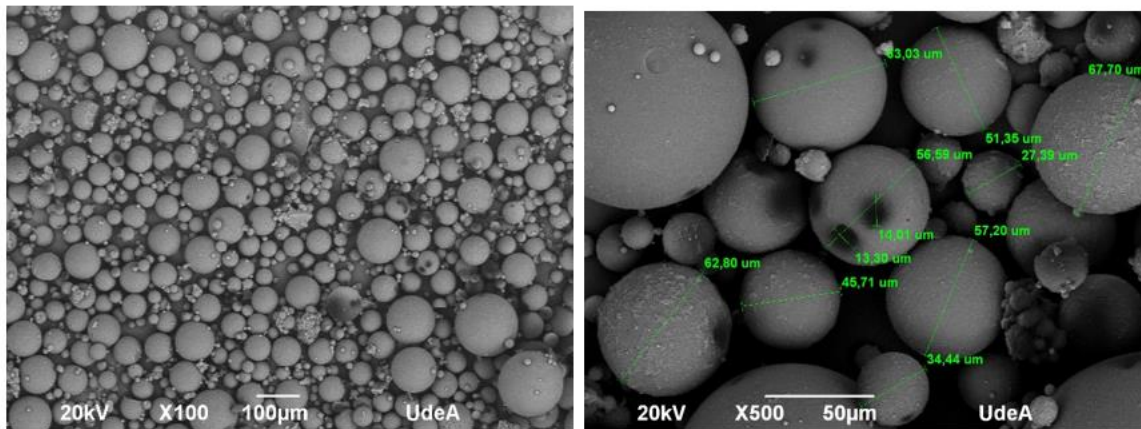


Figura 29. Obtención de microesferas

La composición del *PolyHIPE 2* arroja microesferas que son muy utilizadas en ingeniería de tejidos como micro transportes para la expansión de la célula, liberación de agentes activos, la ventaja de utilizar este tipo de partículas es que son materiales inyectables, así se evitaría el requisito de cirugía abierta.

3.4 Conclusiones

- Se logró la síntesis de la plataforma polimérica tipo PolyHIPE, una emulsión estable: TRIM, IBOA, cizalla a 700 rpm, con una porción de 80:20
- Los PolyHIPEs son materiales biocompatibles, que no interfieren en el crecimiento y proliferación de fibroblastos
- Se logró disminuir el ángulo de contactos con recubrimiento de gelatina tipo B ya que el grupo amino es polar y tiende a recoger un ion de hidrogeno adicional, esto hace que sea una especie que aceptora de hidrógenos y por lo tanto que tenga una fuerte influencia hidrofílica.
- Obtención de microesferas, con potencial aplicaciones como materiales inyectables, donde se evita el requisito de cirugía abierta.

Referencias

1. Owen R, Sherborne C, Paterson T, Green NH, Reilly GC, Claeysens F. Emulsion templated scaffolds with tunable mechanical properties for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;54:159-172. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.09.019
2. Smith W V, Ewart RH. Kinetics of Emulsion Polymerization Kinetics of Emulsion Polymerization. 1948;592. doi:10.1063/1.1746951
3. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. 2000;21:2529-2543.
4. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. 2005;4(July).
5. Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. 2005;26:4273-4279. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.037
6. Fragal EH, Cellet TSP, Fragal VH, et al. Hybrid materials for bone tissue engineering from biomimetic growth of hydroxiapatite on cellulose nanowhiskers. *Carbohydr Polym*. 2016;152:734-746. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.063
7. Nemir S, West JL. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(1):2-20. doi:10.1007/s10439-009-9811-1
8. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. 2003;24:4353-4364. doi:10.1016/S0142-9612(03)00339-9
9. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):109-116. doi:10.1016/j.smim.2007.11.003
10. Huang R, Zhu X, Tu H, Wan A. The crystallization behavior of porous poly(lactic acid) prepared by modified solvent casting/particulate leaching

- technique for potential use of tissue engineering scaffold. *Mater Lett*. 2014;136:126-129. doi:10.1016/j.matlet.2014.08.044
11. Prasad A, Sankar MR, Katiyar V. State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic ScaffoldsFabrication. *Mater Today Proc*. 2017;4(2):898-907. doi:10.1016/j.matpr.2017.01.101
 12. Tsivintzelis I, Pavlidou E, Panayiotou C. Porous scaffolds prepared by phase inversion using supercritical CO₂ as antisolvent. I. Poly(l-lactic acid). *J Supercrit Fluids*. 2007;40(2):317-322. doi:10.1016/j.supflu.2006.06.001
 13. Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials*. 2004;25(1):129-138. doi:10.1016/S0142-9612(03)00483-6
 14. Sin DC, Miao X, Liu G, et al. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(1):78-85. doi:10.1016/j.msec.2009.09.002
 15. Ryu Y-S, Lee Y-H, Kim J-S, Park C-C, Kim H-D. Preparation and properties of emulsifier-/solvent-free polyurethane-acrylic hybrid emulsions for binder materials: Effect of the glycidyl methacrylate/acrylonitrile content. *J Appl Polym Sci*. 2017;134(8):n/a--n/a. doi:10.1002/app.44497
 16. Kretlow JD, Klouda L, Mikos AG. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):263-273. doi:10.1016/j.addr.2007.03.013
 17. Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):449-461. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.010
 18. Surmenev RA, Shkarina S, Syromotina DS, et al. Characterization of biomimetic silicate- and strontium-containing hydroxyapatite microparticles embedded in biodegradable electrospun polycaprolactone scaffolds for bone regeneration. *Eur Polym J*. 2019;113(December 2018):67-77.

doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.01.042

19. Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts - A review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(3):165-176. doi:10.1159/000111805
20. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401. doi:10.1038/nrc1877
21. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(2 SPEC. ISS.):159-178. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.004
22. Silverstein MS. Progress in Polymer Science PolyHIPEs : Recent advances in emulsion-templated porous polymers. *Prog Polym Sci*. 2014;39(1):199-234. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.07.003
23. Cameron NR. High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers. *Polymer (Guildf)*. 2005;46(5):1439-1449. doi:10.1016/j.polymer.2004.11.097
24. Wang AJ, Paterson T, Owen R, et al. Photocurable high internal phase emulsions (HIPEs) containing hydroxyapatite for additive manufacture of tissue engineering scaffolds with multi-scale porosity. *Mater Sci Eng C*. 2016;67:51-58. doi:10.1016/j.msec.2016.04.087
25. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci*. 2010;35(4):403-440. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006