



Producción de implantes vasculares celularizados basados en polivinil alcohol suplementado con biopolímeros

Liliana Maria Arroyave Muñoz

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctora en Ingeniería de Materiales

Tutora

Claudia Patricia Ossa Orozco, Doctor (PhD) en Materiales

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Materiales
Medellín, Antioquia, Colombia

2024

| Cita | Arroyave Muñoz [1] |
|----------------------------------|---|
| Referencia Estilo IEEE (2020) | [1] L. Arroyave Muñoz, "Producción de implantes vasculares celularizados basados en polivinil alcohol suplementado con biopolímeros", Tesis doctoral, Doctorado en Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2024. |



Doctorado en Ingeniería de Materiales, Cohorte IX.

Grupo de Investigación Biomateriales.

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

A mi esposo, familia, tutora, compañeros amigos y profesores,
sé que es corto, pero no tengo palabras para agradecerles tanto.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo por ser mi soporte y apoyo en mi proyecto de vida.

A mi familia por su ayuda y compañía.

A mi tutora Claudia Ossa por brindarme una mano cada que la necesité.

A mis profesores, compañeros y monitores del grupo de Investigación en Biomateriales por estar siempre dispuestos a ayudar.

A los profesores y compañeros del grupo de Investigación Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares por el todo el conocimiento y espacio brindados.

A los profesores y técnicos del grupo de Polímeros del ITM por recibirme y enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo.

Finalmente, a Minciencias por la financiación del proyecto 111577757127

RESUMEN

En 2019 según la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó que la principal causa de muerte en el mundo correspondió a enfermedades cardiovasculares (ECV), como la cardiopatía isquémica (16 %) y el accidente cerebrovascular (11 %); la primera de estas ha sido la enfermedad con mayor aumento de número de muertes desde el 2000 (2 a 8.9 millones de personas), además se estima que el número de muertes podría llegar a 23.3 millones por ECV para el 2030.

Los implantes autólogos ofrecen los mejores resultados para tratar las ECV cuando una intervención quirúrgica es requerida, ya que exhiben una permeabilidad mayor que otro tipo de implantes, sin embargo, estos implantes tienen dificultades como su poca disponibilidad, posible mala calidad debido al ECV preexistente en el paciente y morbilidad en el sitio donante, entre otros. Estas dificultades pueden ser evitadas con el uso de implantes sintéticos, fabricados por ejemplo de polivinil alcohol (PVA), que presenta propiedades adecuadas como ser tener comportamiento mecánico modificable y no presentar citotoxicidad; en los últimos años también se ha comenzado a celularizar estos implantes para mejorar sus propiedades biológicas y mecánicas.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este proyecto fue desarrollar implantes vasculares celularizados basados en polivinil alcohol suplementados con biopolímeros, para comparar sus propiedades con arterias porcinas e implantes comerciales, de manera que se mejoren las condiciones de dichos implantes frente a los comerciales existentes en el mercado nacional.

En el proyecto fueron evaluadas diversas composiciones y procedimientos de producción, para finalmente, de acuerdo con el mejor comportamiento mecánico, de estabilidad y biológico, seleccionar el material más adecuado para la fabricación de un implante vascular. Siendo así se desarrolló un sustrato para la fabricación del implante vascular basado en PVA, suplementado con quitosano y entrecruzado con ácido oxálico. El sustrato demostró excelente capacidad de adhesión celular conservando la morfología natural de las células, baja degradación lo cual es óptimo para un implante permanente, poca absorción de agua evitando la alteración de su geometría, y módulo de Young similar a la aorta porcina, no obstante, aunque la resistencia mecánica máxima es baja puede ser mejorada con la inclusión de refuerzos internos y la celularización.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO) in 2019, the leading cause of death worldwide was cardiovascular diseases (CVDs), such as ischemic heart disease (16%) and stroke (11%). Ischemic heart disease has been the disease with the greatest increase in the number of deaths since 2000, going from 2 to 8.9 million people. Furthermore, it is estimated that the number of deaths from CVDs could reach 23.3 million by 2030.

Autologous grafts offer the best results for treating CVDs when surgical intervention is required, due to their higher permeability compared to other types of grafts. However, these grafts have difficulties such as limited availability, potential poor quality due to CVD present on the patient, and donor site morbidity, among others. These difficulties can be overcome by using synthetic grafts, manufactured for instance with polyvinyl alcohol (PVA), which possesses adequate properties like bioinertness and tunable mechanical behaviour. In recent years, efforts have also been made to cellularize these grafts to enhance their biological and mechanical properties.

Therefore, the aim of this project was to develop cellularized vascular grafts based on PVA supplemented with biopolymers and compare their properties with porcine arteries and commercial implants, with the goal of improving the conditions of existing commercial implants in the national market.

In the project, various compositions and production procedures were evaluated to select the most suitable material for the manufacturing of a vascular graft, based on the best mechanical, stability, and biological performance. Consequently, a substrate for the fabrication of the vascular implant based on PVA, supplemented with chitosan and cross-linked with oxalic acid, was developed. The substrate demonstrated excellent cellular adhesion capacity while preserving the natural morphology of the cells. It showed low degradation, which is optimal for a permanent graft, and low water absorption, preventing alteration of its geometry. The Young's modulus was like that of the porcine aorta, but the maximum mechanical strength was low. This can be improved by including internal reinforcements and cellularization.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS..... | 6 |
| RESUMEN..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| ÍNDICE GENERAL | 9 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 12 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 16 |
| ÍNDICE DE ECUACIONES | 16 |
| | |
| 1. CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN | 17 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA | 19 |
| 1.3 ANTECEDENTES | 21 |
| 1.4 OBJETIVOS | 23 |
| 1.4.1 OBJETIVO GENERAL | 23 |
| 1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 1.5 REFERENCIAS | 24 |
| 2. CONCEPTOS TEÓRICOS | 28 |
| 2.1 INTRODUCCIÓN | 28 |
| 2.2 LA ARTERIA | 28 |
| 2.2.1 Estructura y composición | 28 |
| 2.2.2 Fisiología de la arteria | 29 |
| 2.2.2.1 Células endoteliales | 29 |
| 2.2.2.2 Células de músculo liso | 30 |
| 2.2.2.3 Fibroblastos | 31 |
| 2.3 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES | 32 |
| 2.3.1 Lesiones vasculares | 32 |
| 2.3.2 Mecanismos biológicos de regeneración vascular | 33 |
| 2.3.2.1 Angiogénesis | 33 |
| 2.3.2.2 Arteriogénesis | 33 |
| 2.4 TÉCNICAS USADAS EN REGENERACIÓN O REEMPLAZO VASCULAR | 35 |
| 2.4.1 Características ideales de un implante vascular | 35 |
| 2.4.2 Injertos | 35 |
| 2.4.3 Ingeniería de tejidos | 37 |
| 2.4.4 Terapia celular | 37 |
| 2.5 BIOMATERIALES USADOS EN REGENERACIÓN VASCULAR | 38 |
| 2.5.1 Generalidades | 38 |
| 2.5.2 Hidrogeles | 39 |
| 2.5.3 El polivinil alcohol | 39 |
| 2.5.3.1 Generalidades | 39 |
| 2.5.3.2 Propiedades biológicas y físicas | 39 |
| 2.5.3.3 Técnicas de fabricación | 40 |
| 2.5.4 Polímeros naturales | 40 |
| 2.5.4.1 Quitosano | 41 |

| | |
|--|----|
| 2.5.4.2 Colágeno y gelatina | 42 |
| 2.5.4.3 Fibroína | 43 |
| 2.5.5 Entrecruzantes | 43 |
| 2.6 CONSIDERACIONES FINALES | 45 |
| 2.7 REFERENCIAS | 45 |
| 3. FORMULACIONES DE LOS IMPLANTES DE PVA | 51 |
| 3.1 INTRODUCCIÓN | 51 |
| 3.2 PRUEBAS EXPLORATORIAS | 52 |
| 3.3 EFECTO DEL PORCENTAJE DE PVA Y EL NÚMERO DE CICLOS DE CONGELACIÓN EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL | 55 |
| 3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS | 55 |
| 3.3.1.1 Desinfección | 57 |
| 3.3.1.2 Caracterización química | 57 |
| 3.3.1.3 Viabilidad celular | 58 |
| 3.3.1.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 59 |
| 3.3.1.5 Comportamiento mecánico | 60 |
| 3.3.1.6 Adhesión celular | 61 |
| 3.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 63 |
| 3.3.2.1 Desinfección | 63 |
| 3.3.2.2 Caracterización química | 64 |
| 3.3.2.3 Viabilidad celular | 65 |
| 3.3.2.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 67 |
| 3.3.2.5 Comportamiento mecánico | 70 |
| 3.3.2.6 Adhesión celular | 73 |
| 3.3.3 CONSIDERACIONES FINALES | 74 |
| 3.4 REFERENCIAS | 75 |
| 4. SUPLEMENTACIÓN DE LOS IMPLANTES | 78 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 78 |
| Sección 1 | |
| 4.2 EFECTO DE LAS MACROMOLÉCULAS EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL | 79 |
| 4.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS | 79 |
| 4.2.1.1 Humectabilidad | 82 |
| 4.2.1.2 Viabilidad celular | 82 |
| 4.2.1.3 Adhesión celular | 83 |
| 4.2.1.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 83 |
| 4.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 84 |
| 4.2.2.1 Humectabilidad | 84 |
| 4.2.2.2 Viabilidad celular | 85 |
| 4.2.2.3 Adhesión celular | 86 |
| 4.2.2.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 87 |
| 4.2.3 CONSIDERACIONES FINALES | 88 |
| Sección 2 | |
| 4.3 EFECTO DE LOS ENTRECruzANTES DEL QUITOSANO EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL | 89 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS | 89 |
| 4.3.1.1 Viabilidad celular | 91 |
| 4.3.1.2 Adhesión celular | 91 |
| 4.3.1.3 Comportamiento mecánico | 91 |
| 4.3.1.4 Morfología del implante | 91 |
| 4.3.1.5 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 92 |
| 4.3.1.6 Caracterización química y térmica | 92 |
| 4.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 93 |
| 4.3.2.1 Viabilidad celular | 93 |
| 4.3.2.2 Adhesión celular | 93 |
| 4.3.2.3 Comportamiento mecánico | 94 |
| 4.3.2.4 Morfología del implante | 95 |
| 4.3.2.5 Degradación hidrolítica y absorción de agua | 96 |
| 4.3.2.6 Caracterización química y térmica | 97 |
| 4.4 CONSIDERACIONES FINALES | 99 |
| 4.5 REFERENCIAS | 100 |
| 5. PROPIEDADES DE LOS IMPLANTES | 102 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN | 102 |
| 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS | 103 |
| 5.2.1 Humectabilidad | 103 |
| 5.2.2 Morfología superficial | 105 |
| 5.2.3 Morfología de la adhesión celular | 105 |
| 5.2.4 Comportamiento mecánico | 105 |
| 5.2.5 Celularización | 106 |
| 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 106 |
| 5.3.1 Humectabilidad | 106 |
| 5.3.2 Morfología superficial | 107 |
| 5.3.3 Morfología de la adhesión celular | 109 |
| 5.3.4 Comportamiento mecánico | 110 |
| 5.3.5 Celularización | 113 |
| 5.4 CONSIDERACIONES FINALES | 115 |
| 5.5 REFERENCIAS | 115 |
| 6. CONCLUSIONES GENERALES | 117 |
| 7 RECOMENDACIONES | 118 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| Figura 1. Porcentaje de muertes por ECV del total de muertes de cada país, tomado de [1].. | 19 |
| Figura 2. Porcentaje de muertes por ECV en Colombia, tomado de [29]..... | 20 |
| Figura 3. Documentos encontrados en scopus bajo el algoritmo de búsqueda: "polyvinyl alcohol" AND (grafts OR implant) AND (vascular OR vessel)..... | 21 |

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructuras comparadas de los vasos sanguíneos, modificada de [2]..... | 29 |
| Figura 2. Células endoteliales de aorta bovina (BAOEC), sin modificar de [5]..... | 30 |
| Figura 3. Células de músculo liso humano aórticas (HAOSMC). A) HAOSMC inmunomarcadas por alfa-actina de músculo liso B) por el método ABC y C) por inmunofluorescencia y DAPI, sin modificar de [8]..... | 31 |
| Figura 4. A) Fibroblastos humanos dermales (HDF), B) HDF inmunomarcado por vimentina, C) HDF teñido por FSP, sin modificar de [10]..... | 32 |
| Figura 5. Formación de un fibroateroma. Modificado de [12]..... | 32 |
| Figura 6. Proceso de angiogénesis tras la aparición de una herida. Modificado de [15]..... | 34 |
| Figura 7. Proceso de la arteriogénesis. Modificado de [16]..... | 34 |
| Figura 8. A) estructura monomérica de PVA completamente hidrolizado, B) estructura tridimensional de un monómero de PVA, C) estructura tridimensional de PVA, y D) PVA parcialmente hidrolizado [45]..... | 40 |
| Figura 9. Fuentes de polímeros naturales. Modificada de [52]..... | 41 |

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Figura 1. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error de desviación estándar promediadas cada uno por ciento de deformación. N=5 | 53 |
| Figura 2. Gráfica de degradación hidrolítica de las muestras de PVA con 5 o 10 % de PVA y 3 o 7 ciclos de C/D. Las barras de error representan la desviación estándar. N=5 ... | 54 |
| Figura 3. Esquema de la metodología del capítulo 3 | 56 |
| Figura 4. Esquema de deposición de los extractos. En rosa están los pozos "blanco", en blanco el C+, en negro el C- y los demás colores corresponden a las cuatro columnas de cada uno de los nueve tratamientos. Modificado del BLOG BALLYA... | 58 |
| Figura 5. Preparación del plato de 96 pozos en el experimento de adhesión celular por colorimetría, sintetizado en tres momentos | 62 |
| Figura 6. Esquema de la ubicación de las variaciones experimentales en la prueba de adhesión celular por colorimetría | 62 |
| Figura 7. Porcentaje de turbidimetría del medio LB en contacto con muestras de PVA 10-7 desinfectadas con diferentes tiempos de exposición. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 8. Porcentaje de turbidimetría del medio LB en contacto con muestras de PVA 10-7 desinfectadas con diferentes tiempos de exposición. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | 64 |
| Figura 9. Espectro FTIR de PVA en polvo y procesado como hidrogel del tratamiento 10-7. N=1 | 65 |
| Figura 10. Espectro FTIR de PVA procesado como hidrogel de los tratamientos esquina. N=1.. | 65 |
| Figura 11. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, se compararon las medias de los factores con Wilconxon sin evidencia de diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, no hay comparación de tratamiento a tratamiento. | 66 |
| Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución los datos de porcentaje de viabilidad celular con respecto a: A) porcentaje de PVA y B) número de ciclos de C/D | 66 |
| Figura 13. Formula química del PVA parcialmente hidrolizado, donde se observa una molécula de acetato de vinilo no hidrolizada. Modificado de [23] | 67 |
| Figura 14. Gráfica de degradación hidrolítica de las muestras de PVA con 10, 11 o 15 % de PVA y 7, 11 o 15 ciclos de C/D. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 68 |
| Figura 15. Gráfico de masa vs tiempo de exposición en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar | 69 |
| Figura 16. Porcentaje de masa de muestras con 30 minutos de exposición en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar | 70 |
| Figura 17. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error promediadas cada uno por ciento de deformación, A) muestras con 7 ciclos de C/D, B) muestras con 11 ciclos de C/D y C) muestras con 15 ciclos de C/D, D), E) y F) los módulos de Young incrementales de A), B) y C) respectivamente. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 71 |
| Figura 18. Viabilidad celular de fibroblastos sembrados sobre hidrogeles de PVA | 73 |

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de la metodología de la sección 1 capítulo 4 | 80 |
| Figura 2. Esquema de los cálculos realizados para fabricar los hidrogeles de PVA suplementados con fibroína | 81 |
| Figura 3. Gráfica de barras del ángulo de contacto medido en los tratamientos, los recuadros presentes separan las muestras que tienen la misma macromolécula. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | 84 |
| Figura 4. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | 85 |

| | |
|--|----|
| Figura 5. Área ocupada por las células en porcentaje. Donde PGs y PCs corresponde a los hidrogeles con gelatina y colágeno respectivamente. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.. | 86 |
| Figura 6. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA y PVA-quitosano en el ensayo de degradación hidrolítica. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 87 |
| Figura 7. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA y PVA-quitosano en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar.. | 88 |
| Figura 8. Esquema de la metodología de la sección 1 capítulo 4 | 90 |
| Figura 9. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA-quitosano entrecruzados. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | |
| Figura 10. Área ocupada por las células en porcentaje, los recuadros presentes separan las muestras que tienen la misma macromolécula. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, las barras de error representan la desviación estándar, no hay comparación de tratamiento a tratamiento | 93 |
| Figura 11. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error promediadas cada dos por ciento de deformación. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 94 |
| Figura 12. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región 1 y en la región 2 de las muestras de PVA-quitosano y PVA-quitosano ácido oxálico respectivamente. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con ANOVA.. | 94 |
| Figura 13. Fotografías SEM del implante PQ-AO a A) 3.000 x, B) 4.000 x y C) 10.000 x. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliificaciones | 95 |
| Figura 14. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA-quitosano y PVA-quitosano - ácido oxálico en el ensayo de degradación hidrolítica, tanto con muestras hidratadas como deshidratadas. N=5, las barrar de error representan la desviación estándar | 96 |
| Figura 15. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA -quitosano y PVA -quitosano - ácido oxálico en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar | 96 |
| Figura 16. Espectro infrarrojo de hidrogeles deshidratados de PVA, PQ y PQ-AO. N=1 | 97 |
| Figura 17. Curvas térmicas de las muestras PVA, PQ y PQ-AO. A) Análisis termogravimétrico y B) Calorimetría diferencial de barrido. N=1 | 98 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Esquema de la metodología del capítulo 5 | 104 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Figura 2. Gráfica de barras del ángulo de contacto medido en implantes comerciales, aortas porcinas y sustratos de PQ-AO. N=5, hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05 entre todos los tratamientos, realizado con ANOVA | 107 |
| Figura 3. Fotografías SEM del sustrato de PQ-AO después de un proceso de incubación, fijación, deshidratación y secado de punto crítico a 500, 1.000 y 5.000 X. Donde se puede observar una erosión superficial. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliaciones | 108 |
| Figura 4. Fotografías SEM de la cara interna de una aorta porcina a 300, 3.000 y 5.000 x. Donde se puede observar la delaminación de las capas. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliaciones | 108 |
| Figura 5. Fotografías SEM de la cara interna de una aorta porcina a 10.000, 20.000 y 40.000 x. Donde se pueden observar las fibras de colágeno. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliaciones | 108 |
| Figura 6. Fotografías SEM de la cara interna de los implantes comerciales de ePTFE donde se observa la formación de láminas y capas. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 ampliaciones | 109 |
| Figura 7. Fotografías SEM de sustrato PQ-AO después de 24 horas de exposición a A) y C) EA.hy 926 a 500 y 1000 X y B) y D) fibroblastos humanos a 500 y 1000 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 ampliaciones | 109 |
| Figura 8. Fotografías SEM de implantes comerciales después de 24 horas de exposición a A) fibroblastos humanos – 100 X, B) y C) EA.hy 926 – 100 X y 500 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 1 y 2 ampliaciones | 110 |
| Figura 9. Curvas promedio de esfuerzo-deformación de aortas en cortes longitudinales y transversales, sustrato de PQ-AO y un implante comercial de ePTFE. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 111 |
| Figura 10. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región inicial y en la región final de aorta corte transversal (AT), corte longitudinal (AL), implante comercial (C) y del sustrato de PVA- quitosano ácido oxálico (PQ-AO). N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher | 112 |
| Figura 11. A) y B) Fibroblastos humanos a 50 X y 200 X y C) y D) EA.hy 296 a 50 X y 200 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 ampliaciones | 113 |
| Figura 12. Curvas promedio de esfuerzo-deformación de sustratos de PQ-AO y sustratos PQ-AO-celularizados. N=5, las barras de error representan la desviación estándar | 114 |
| Figura 13. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región 1 y en la región 2 de sustratos de PQ-AO (Cont) y sustratos de PQ-AO-celularizados (Cél). N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con ANOVA | 114 |

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características de algunos entrecruzantes de quitosano. Modificado de [69] | 44 |
|---|----|

Capítulo 3

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Factores, niveles y variables respuesta involucrados en las pruebas exploratorias ... | 52 |
|--|----|

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Macromoléculas utilizadas para suplementar los hidrogeles de PVA | 82 |
| Tabla 2. Reactivos utilizados para entrecruzar los hidrogeles de PQ | 91 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Datos del comportamiento mecánico de las aortas de cerdo | 111 |
| Tabla 2. Datos del comportamiento mecánico de implantes vasculares basados en PVA en la literatura | 112 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Ecuación 1. Determinación del porcentaje de turbidez en la prueba de turbidimetría | 57 |
| Ecuación 2. Ecuación para determinar el porcentaje de viabilidad celular en la prueba de contacto indirecto por extractos | 59 |
| Ecuación 3. Ecuación para determinar el porcentaje de pérdida de peso de las probetas | 59 |
| Ecuación 4. Ecuación para determinar el porcentaje de masa de las probetas | 60 |
| Ecuación 5. Ecuación para determinar la elongación de la probeta | 60 |
| Ecuación 6. Ecuación para determinar el esfuerzo ejercido sobre la probeta | 60 |
| Ecuación 7. Ecuación para el cálculo del módulo de Young entre dos puntos | 61 |

CAPÍTULO 1.

CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

La OMS declaró a las ECV como la principal causa de muerte en el mundo, y pronostica que estas muertes se incrementarán si no se cambian los hábitos de vida en la población [1][2]. Para solventar este problema, se han propuesto tratamientos que dependen de la gravedad de la enfermedad y pueden llegar hasta intervenciones quirúrgicas [3]. Los injertos autólogos [4][5][6] han constituido la alternativa quirúrgica más común debido a su biocompatibilidad y a las propiedades naturales del tejido, sin embargo, tienen poca disponibilidad [4][7] y pueden generar complicaciones y morbilidad [8], además la calidad del tejido se ve comprometida cuando el paciente sufre de ECV (sus vasos pueden verse afectados por esta enfermedad) [5][6]; como respuesta a estas complicaciones se han utilizado implantes sintéticos [6][8][9], que actualmente presentan problemas de permeabilidad, en especial en vasos de diámetro pequeño (< 6 mm) [5], provocando trombosis, hiperplasia de la íntima, arterosclerosis o infección [7][9].

Los implantes comerciales fabricados de Dacron® y de ePTFE no cumplen con todos los requerimientos esperados para su aplicación clínica, se han reportado casos donde existe migración del implante [10], mala respuesta dinámica al flujo pulsátil [11], obstrucciones por crecimiento celular en la luz del implante [12] e infecciones [13], entre otros. Un material promesa en este tipo de aplicaciones es el PVA, debido a que es un polímero cuyas propiedades han permitido su estudio para reemplazo del menisco de la rodilla [14], membrana de hemodiálisis [15] y válvula cardíaca [16], entre otros. Propiedades como el comportamiento mecánico, no toxicidad, control de procesamiento y facilidad en la manipulación y en la suturación; han permitido que el PVA también haya sido estudiado como injerto vascular, aun así, sigue siendo una prótesis sintética que no iguala biomiméticamente al tejido natural y por lo tanto, puede presentar dificultades a la hora de crear el microambiente adecuado para la proliferación celular *in situ*. Las técnicas más representativas en la literatura de fabricación de implantes vasculares de PVA son el electrohilado [17][18][19] y los ciclos de congelación/descongelación (C/D) [20][21][22], cuya relevancia es debida a la morfología y al entrecruzamiento de las fibras obtenidos con estas técnicas respectivamente. Sin embargo, la hidrofiliidad del PVA le genera dificultades para ser un sustrato celular, por ello se propone en este trabajo, hacer un implante vascular suplementado con biopolímeros que permita la celularización. Dicho procedimiento ha demostrado tener la capacidad de mejorar el rendimiento funcional y estructural de los implantes [22], no obstante, ha sido probado por pocos autores [23][24][25]. De lo anterior se desprende la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo puede el PVA celularizado ser un material adecuado para su potencial uso como implante vascular que supla las deficiencias de los injertos vasculares actuales?

Para abordar esta pregunta de investigación se desarrollaron tres capítulos experimentales que van desde el Capítulo 3 hasta el Capítulo 5, a continuación, se describe brevemente la información contenida en cada uno de ellos.

En el capítulo 3 se tiene como hipótesis que *es posible fabricar un hidrogel de PVA como sustrato para el desarrollo de un implante vascular*. Para desarrollar esta hipótesis se fabricaron hidrogeles de PVA variando el peso molecular, el porcentaje de PVA utilizado y el número de ciclos de C/D. Se determinó que si bien no hubo efectos significativos de los factores: porcentaje de PVA y número de ciclos de C/D en la resistencia mecánica y en la degradación hidrolítica, no se logró la adherencia de las células a su superficie.

Con los resultados del capítulo 3, se planteó como hipótesis del capítulo 4, que *es posible mejorar la capacidad de adhesión celular del hidrogel del PVA sin perder las propiedades antes logradas*. Para desarrollar esta hipótesis se agregaron cuatro moléculas en diferentes configuraciones a los hidrogeles de PVA, estas fueron gelatina, colágeno, fibroína y quitosano. Se determinó que la molécula de quitosano disminuyó en mayor grado la hidrofiliidad del hidrogel de PVA y, en consecuencia, permitió la mayor adherencia celular posible de los tratamientos evaluados. Adicionalmente, se evaluaron cuatro agentes entrecruzantes ya que el quitosano comprometió la integridad del hidrogel en soluciones acuosas. Estos entrecruzantes fueron: glutaraldehído, tripolifosfato de sodio, ácido oxálico y citrato trisódico, de los cuales el ácido oxálico conservó de manera más efectiva la adhesión celular generada por el quitosano e incrementó la resistencia mecánica del hidrogel.

Para evaluar las propiedades del hidrogel obtenido en el capítulo anterior, ahora como sustrato para la fabricación de un injerto vascular, se planteó como hipótesis *que el sustrato tiene propiedades adecuadas para su uso en aplicaciones vasculares*. Para ello se compararon las propiedades del sustrato con aortas porcinas frescas y con un implante vascular de ePTFE. Se determinó que la humectabilidad del sustrato es más similar a la de las aortas que a la del implante comercial, además que permitió conservar la morfología celular natural de las células sembradas sobre este. Con respecto al comportamiento mecánico, el sustrato ofrece valores de módulo de Young más similares a las aortas que los implantes comerciales, pero la resistencia mecánica es muy inferior a los valores obtenidos en las aortas. No obstante, la celularización demostró ser una alternativa para incrementar dicho valor.

Se concluye entonces que se desarrolló un sustrato para la fabricación de implantes vasculares que permite la adecuada adhesión celular, mejorando las propiedades de los implantes vasculares pero que requiere un refuerzo para alcanzar la resistencia mecánica adecuada.

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las ECV, constituyen la principal causa de muerte en el mundo y contribuyen de manera importante a la reducción de la calidad de vida. Según la OMS en 2019, las ECV causaron aproximadamente 17,9 millones de muertes que corresponde el 32 % del total de muertes en el mundo [1][28]. Mensah, Roth y Fuster recopilaron datos de enfermedades, lesiones y factores de riesgo en el mundo desde 1999 a 2017 y afirman que casi el 80 % de las muertes por ECV a nivel mundial ocurren en países de bajos y medianos ingresos [28].

A nivel de la región en Centro y Suramérica, Colombia es uno de los países con mayor porcentaje de muertes por ECV (del total de muertes) durante los últimos años (ver *Figura 1*), entre 2015 y 2019 encabeza la lista de muertes por ECV entre los países de los que se tiene información [1].

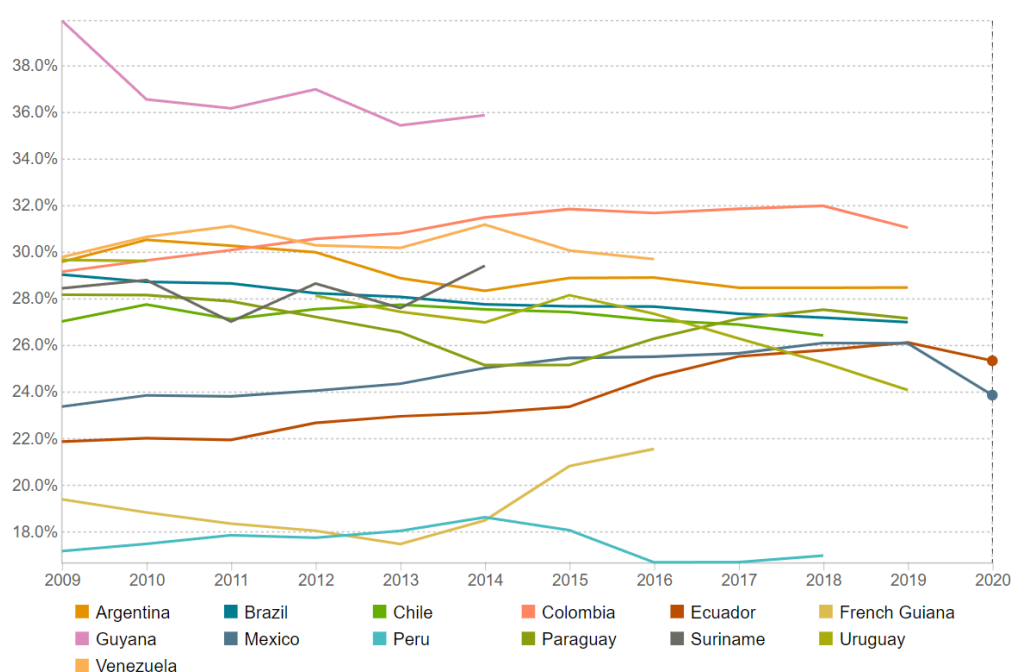


Figura 1. Porcentaje de muertes por ECV del total de muertes de cada país, tomado de [1].

Las muertes por ECV en Colombia han ido en aumento en los últimos años (ver *Figura 2*), según el DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística en Colombia) para 2018 la principal causa de muerte en 30 de los 32 departamentos de Colombia (exceptuando Amazonas y Vaupés), fue el infarto agudo de miocardio. Entre el 2019 y el 2021, constituyó la segunda causa de muerte después del COVID-19 y para el primer trimestre de 2022, volvió a encabezar la lista con 7.483 muertes en hombres (20.1 %) y 6.443 muertes en mujeres (18.9 %) [29].

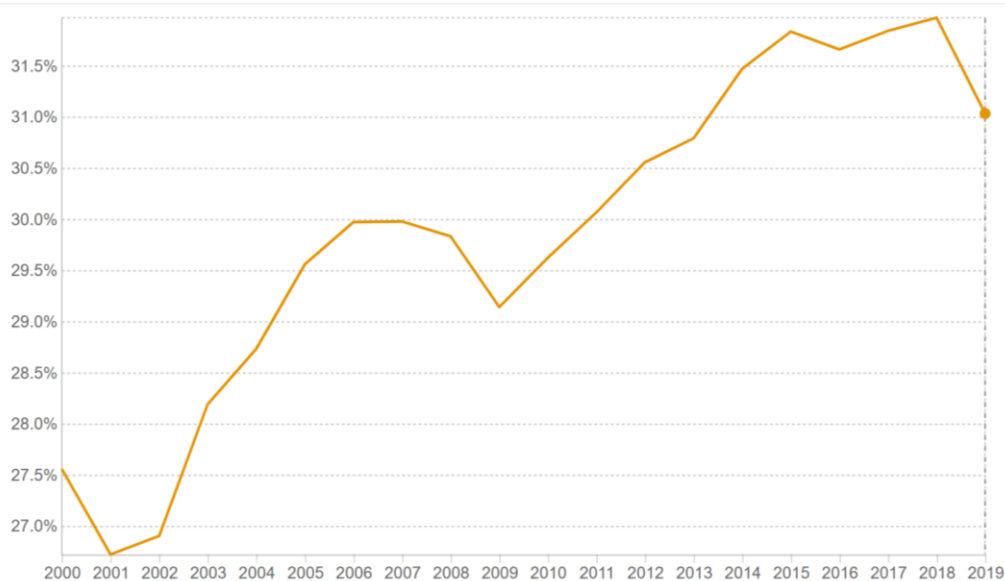


Figura 2. Porcentaje de muertes por ECV en Colombia, tomado de [29].

Un injerto comercial muy utilizado, posiblemente el más popular de todos es el *Dacron*[®], fabricado de fibras de *PET*; pero se han registrado problemas asociados a este como la incapacidad de regeneración tisular y a algunos problemas de trombogenicidad e infecciones [30]; el *ePTFE* es otro material utilizado en injertos vasculares y es comercializado como *Gore Tex*[®], tiene la capacidad de ser manipulado para fabricar venas de diámetros pequeños y posee bajo coeficiente de fricción, pero es mucho más rígido que las venas o arterias. Otros injertos comerciales menos conocidos, usados en la industria, son los fabricados de poliéter uretano (*PEEU* por sus siglas en inglés), cuyo atractivo radica en su capacidad de degradarse *in vivo*, dicho implante fue fabricado por varias empresas pero ninguna logró que este fuera aprobado para implantes a largo plazo, principalmente por resultados poco alentadores, como *Mitrathane*[®] de la compañía *Mitral*, y *Vectra*[®] de *Thoratec Laboratories* [31]; estudios científicos respaldan estos resultados del *PEEU*, donde se han evaluado implantes *Vectra*[®] como acceso de hemodiálisis (corto plazo) y aun así se encuentran dificultades como la incapacidad del implante para conservar su estabilidad geométrica [32], presencia de trombosis [33] e infección [34].

1.3 ANTECEDENTES

La *Figura 3*, muestra los resultados de 221 documentos encontrados referentes a la utilización de *PVA* en el diseño de implantes vasculares, datan del año 1957 e incluyen artículos originales (71.9 %), cartas, libros, notas, capítulos de libros, conferencias y artículos de revisión.

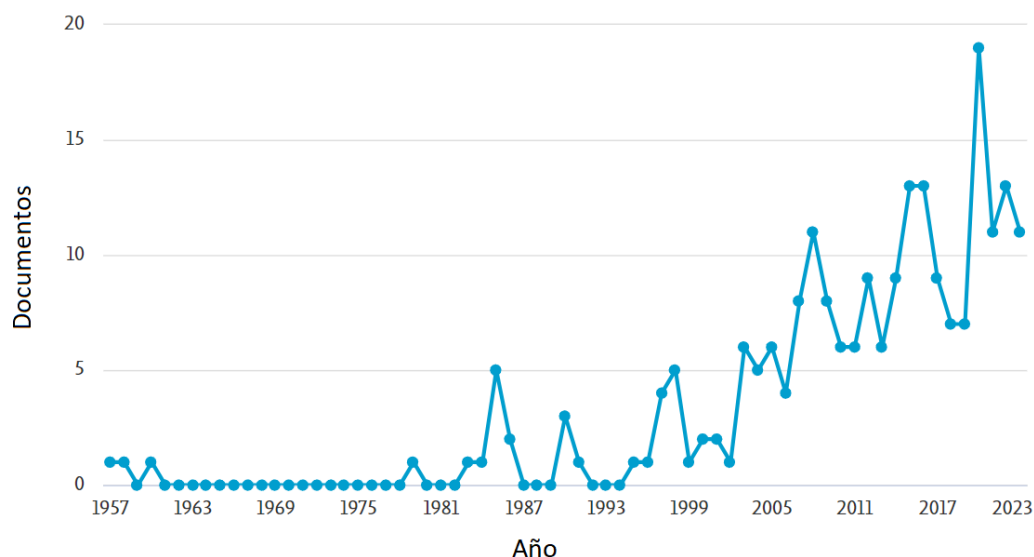


Figura 3. Documentos encontrados en scopus bajo el algoritmo de búsqueda: "polyvinyl alcohol" AND (grafts OR implant) AND (vascular OR vessel).

Los primeros artículos publicados de los que se tuvo acceso consistieron en experimentación animal con una alta tasa de fracaso (utilizaron *PVA* en un producto conocido como *Ivalon*[®]), en el reemplazo de vasos sanguíneos. Pero desde entonces los autores exponen la necesidad de utilizar un agente que evite la formación de trombos como la heparina [35][36].

Incluso para 2010 algunos autores continuaban considerando la utilización de la heparina como decisiva en el diseño de implantes vasculares, pero otros se aventuraban a utilizar alternativas a la heparina; Negishi et al. [37] por ejemplo, agregaron heparina para minimizar el efecto de coagulación sanguínea en un implante hecho por presurización hidrostática fría, y a su vez Bolger et al. [38] funcionalizaron *PVA* con grupos de estirilpiridinio y fabricaron implantes por electrohilado para imitar la morfología de los vasos sanguíneos. Estos autores encontraron mejorías en las propiedades de los implantes a través de la modificación de los sustratos de *PVA*, lo que constituyó un primer camino para encontrar el implante vascular adecuado. A partir de allí otros autores comenzaron a utilizar el *PVA* mezclado con diversos polímeros, no solo como funcionalización sino también como refuerzo estructural del mismo, Lou et al. [21], Najafi et al. [39], Hu et al. [40] y Lin et al. [41] usaron polietilentereftalato (*PET*), poliuretano (*PU*) y el mismo *PVA* para crear tejidos que se incorporan en el interior del implante, con el objetivo de incrementar la resistencia a la tracción y disminuir la elongación producto de las fuerzas de cizalla generadas por el paso de la sangre, en general, estos autores obtuvieron buenos resultados en esta propiedad que dependió del tipo de entramado fabricado. Otros autores como Cutiongco et al. [42] continuaron apostando a la funcionalización de la superficie de los implantes, aunque no se limitaron a mejorar el efecto de repulsión hacia los fluidos

que impide la coagulación sanguínea, también utilizaron péptidos (además de la heparina) que constituyen puntos de anclaje celulares y de esta manera mejorar el comportamiento celular.

Algunos autores con trabajos publicados en el último par de años han reportado al PVA como un material prometedor para su uso como implante vascular, como estos, está el trabajo de Yao et al. [43], quienes desarrollaron hidrogeles de PVA para aplicación vascular con el objetivo de reducir la incidencia de trombosis e hiperplasia de la íntima causada por el desajuste de distensibilidad entre el tejido nativo y el implante. Para ello, implantaron hidrogeles con alta y baja distensibilidad en la zona termino-lateral de un modelo de arteria carótida de conejos por un periodo de cuatro semanas. Los resultados indicaron que los implantes con distensibilidad similar al modelo de carótida presentaron menor formación de hiperplasia de la íntima y mayor permeabilidad en comparación con los implantes con baja distensibilidad.

Wakabayashi et al. diseñaron implantes vasculares de PVA con una matriz de policaprolactona electrohilada para mejorar la permeabilidad del implante comparada con otros implantes vasculares sintéticos logrando tasas de permeabilidad del 83.3 % a las 8 semanas de implantación en aorta abdominal de rata *Wistar*. Con respecto a las propiedades mecánicas, ellos atribuyeron el incremento de la rigidez a la presencia de PVA, ya que pasó de 0.38 ± 0.15 a 1.46 ± 0.18 gf/cm² de implantes sin y con PVA respectivamente. Adicionalmente, la presencia de PVA incrementó la hidrofiliidad del material, lo que conduce a una reducción en la adsorción de plaquetas [44].

Yao et al. desarrollaron implantes vasculares de PVA combinados con fucoidan para permitir la adhesión y migración celular de células endoteliales en la superficie. En uno de sus experimentos que implicaba la incorporación de fucoidan, lograron formar una monocapa endotelial, lo que minimizó la trombogenicidad en pruebas *in vitro* con plasma rico en plaquetas y en ensayos de shunt *ex vivo* en primates no humanos. También probaron patrones de superficie en injertos de PVA y descubrieron que las ranuras de 2 µm mejoraban la migración celular [45].

Otros autores como Hu et al. encontraron adhesión celular sobre PVA; ellos desarrollaron implantes vasculares con matriz de nanocelulosa bacteriana y los implantaron en la aorta abdominal de un modelo de rata *Sprague-Dawley* por 32 semanas, y observaron la formación de un endotelio y capas de musculo liso [46].

Por lo tanto, el PVA es un candidato prometedor para el desarrollo de implantes vasculares debido a sus propiedades, sin embargo, muchos estudios han demostrado que su resistencia mecánica es insuficiente para dicha aplicación; por ello en PVA requiere procesos de entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas para mejorar sus propiedades mecánicas [47].

Dentro de las patentes consultadas de injertos vasculares con PVA es posible encontrar dispositivos fabricados para usos temporales como hemodiálisis [48], para usos académicos como prácticas de resección y ligaduras [49], y algunos como implantes vasculares donde el PVA hace parte de la formulación, los cuales deben ser estudiados más a fondo [50].

Scopus registró 11 publicaciones en el presente año, al retirarse los artículos de revisión y aquellos que realmente no estaban relacionados se encontró que las últimas técnicas utilizadas para la

fabricación de estos implantes fueron la mercerización, la utilización de entrecruzantes químicos como el trimetafosfato de sodio, el electrohilado y los ciclos de *C/D*, además utilizaron nanocelulosa bacteriana para mejorar la permeabilidad del injerto, liberación de óxido nítrico para favorecer la formación de una capa de endotelio, rampamicina para evitar la estenosis anastomótica, inmovilización de fucoïdan y generación de topografías para favorecer la formación de una capa de endotelio, inmovilización de andamios descelularizados y heparina para conservar la permeabilidad y alginato para generar anticoagulación [45][46][51][52][53][54][55]. No fueron encontrados documentos que estudien los procedimientos propuestos en este trabajo, por lo cual analizar las opciones propuestas genera una oportunidad importante de investigación.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar implantes vasculares celularizados basados en polivinil alcohol suplementados con biopolímeros

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir implantes vasculares basados en polivinil alcohol suplementados con biopolímeros, para promover el proceso de celularización de los mismos.
- Establecer un método de celularización de los implantes vasculares con células endoteliales y fibroblastos humanos, evaluando sus propiedades frente a los implantes no celularizados.
- Comparar las propiedades físicas y químicas de los implantes obtenidos con arterias porcinas e implantes vasculares comerciales para determinar su potencial aplicación

1.5 REFERENCIAS

- [1] World Health Organization (WHO), "Global health estimates: Leading causes of death," 2020.
- [2] C. D. Mathers and D. Loncar, "Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030," *PLOS Med.*, vol. 3, no. 11, pp. 2011–2030, 2006, doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
- [3] P. Abdulhannan, D. A. Russell, and S. Homer-Vanniasinkam, "Peripheral arterial disease: a literature review," *Br. Med. Bull.*, vol. 104, pp. 21–39, 2012, doi: 10.1093/bmb/lds027.
- [4] M. H. Florian Ernst, P. Lamm, P. Wellmann, S. Milzc, C. Hagla, and G. Juchem, "Autologous endothelialized vein allografts in coronary artery bypass surgery – Long term results," *Biomaterials*, no. 212, pp. 87–97, 2019.
- [5] B. B. J. Leal, N. Wakabayashi, K. Oyama, H. Kamiya, D. I. Braghirolli, and P. Pranke, "Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, no. January, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2020.592361.
- [6] F. Fazal, S. Raghav, A. Callanan, V. Koutsos, and N. Radacsi, "Recent advancements in the bioprinting of vascular grafts," *Biofabrication*, vol. 13, no. 3, 2021, doi: 10.1088/1758-5090/ac0963.
- [7] M. J. Moore, R. P. Tan, N. Yang, J. Rnjak-Kovacina, and S. G. Wise, "Bioengineering artificial blood vessels from natural materials," *Trends Biotechnol.*, vol. 40, no. 6, 2022.
- [8] D. Wang, Y. Xu, Q. Li, and L.-S. Turng, "Artificial small-diameter blood vessels: materials, fabrication, surface modification, mechanical properties, and bioactive functionalities," *J. Mater. Chem. B*, no. 9, 2020.
- [9] A. Weekes, N. Bartnikowski, N. Pinto, J. Jenkins, C. Meinert, and T. J. Klein, "Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts," *Acta Biomater.*, vol. 138, pp. 92–111, 2022.
- [10] Y. You et al., "Migration of the Dacron Interposition Graft for Middle Hepatic Vein Reconstruction in Living Donor Liver Transplantation," *Transplantation*, vol. 102, no. p S507, p. 2018, 2018.
- [11] E. Tubaldi, M. Amabili, and M. P. Paidoussis, "Nonlinear Dynamics of Dacron Aortic Prostheses Conveying Pulsatile Flow," *J. Biomech. Eng.*, vol. 140, no. 6, 2018.
- [12] W. Han, J. H. Yu, M. H. Na, and S. Kang, "Right ventricular outflow tract obstruction caused by a foreign body granuloma originating from a Dacron® graft 30 years after transannular patching," *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, no. 6, pp. E459–E461, 2018, doi: 10.21037/jtd.2018.05.181.
- [13] R. D. Kirkton, H. L. Prichard, M. Santiago-Maysonet, L. E. Niklason, J. H. Lawson, and S. L. M. Dahl, "Susceptibility of ePTFE vascular grafts and bioengineered human acellular vessels to infection," *J. Surg. Res.*, vol. 221, pp. 143–151, 2018, doi: 10.1016/j.jss.2017.08.035.
- [14] L. Kluyskens, P. Debieux, K. L. Wong, A. J. Krych, and D. B. F. Saris, "Biomaterials for meniscus and cartilage in knee surgery: state of the art," *J. ISAKOS*, vol. 7, no. 2, pp. 67–77, 2022, doi: 10.1136/jisakos-2020-000600.
- [15] O. Azhar, Z. Jahan, F. Sher, M. B. K. Niazi, S. J. Kakar, and M. Shahid, "Cellulose acetate-polyvinyl alcohol blend hemodialysis membranes integrated with dialysis performance and high biocompatibility," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 126, no. April, p. 112127, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112127.
- [16] H. Mohammadi, D. Goode, and K. Mequanint, "Proposed percutaneous aortic valve prosthesis made of cryogel," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 233, no. 5, 2019.

- [17] Z. Tan, H. Wang, X. Gao, T. Liu, and Y. Tan, "Composite vascular grafts with high cell infiltration by co-electrospinning," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 369–377, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.067.
- [18] S. Deepthi, M. Nivedhitha Sundaram, P. Vijayan, S. V. Nair, and R. Jayakumar, "Engineering poly(hydroxy butyrate-co-hydroxy valerate) based vascular scaffolds to mimic native artery," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, no. 2018, pp. 85–98, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.077.
- [19] L. Velutheri Thomas and P. D. Nair, "An electrospun citric acid modified polyvinyl alcohol scaffold for vascular tissue engineering," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 34, no. 3, pp. 263–279, 2019, doi: 10.1177/0883911519841390.
- [20] M. Bernal, J. Saldarriaga, C. Cabeza, C. Negreira, J. Bustamante, and J. Brum, "Development and evaluation of anisotropic and nonlinear aortic models made from clinical images for in vitro experimentation," *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, no. 16, 2019, doi: 10.1088/1361-6560/ab2db5.
- [21] C. W. Lou, P. C. Lu, J. J. Hu, and J. H. Lin, "Effects of yarn types and fabric types on the compliance and bursting strength of vascular grafts," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 59, pp. 474–483, 2016, doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.03.002.
- [22] N. Alexandre et al., "Long term performance evaluation of small-diameter vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and dextran and MSCs-based therapies using the ovine pre-clinical animal model," *Int. J. Pharm.*, vol. 523, no. 2, pp. 332–346, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.045.
- [23] C. Li et al., "Study of vascular tissue grafts cellularization process in bioreactors using label-free fluorescence lifetime imaging (Conference Presentation)," 2019, [Online]. Available: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/10855/108550A/Study-of-vascular-tissue-grafts-cellularization-process-in-bioreactors-using/10.1117/12.2510823.short?SSO=1>.
- [24] A. Fayon, P. Menu, and R. El Omar, "Cellularized small-caliber tissue-engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard," *npj Regen. Med.*, vol. 6, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41536-021-00155-x.
- [25] J. Cordelle and S. Mantero, "Insight on the endothelialization of small silk-based tissue-engineered vascular grafts," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 43, no. 10, pp. 631–644, 2020, doi: 10.1177/0391398820906547.
- [26] M. Bernal, I. Sen, and M. W. Urban, "Evaluation of materials used for vascular anastomoses using shear wave elastography," *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, no. 7, 2019, doi: 10.1088/1361-6560/ab055c.
- [27] N. Huebsch, M. Gilbert, and K. E. Healy, "Analysis of sterilization protocols for peptide-modified hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 74, no. 1, pp. 440–447, 2005, doi: 10.1002/jbm.b.30155.
- [28] G. A. Mensah, G. A. Roth, and V. Fuster, "The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 74, no. 20, pp. 2529–2532, 2019, doi: 10.1016/j.jacc.2019.10.009.
- [29] DANE, "Estadísticas Vitales (EEVV)," 2022. [Online]. Available: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/bt_estadisticasvitales_defunciones_ltrim_2022pr.pdf.
- [30] F. Montini Ballarin, "Estructuras poliméricas nanofibrasas biorreabsorbibles para ingeniería de tejidos vasculares," Universidad Nacional de Mar del Plata, 2015.

- [31] S. Venkatraman, F. Boey, and L. L. Lao, "Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 853–874, 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.001.
- [32] M. H. Glickman et al., "Multicenter evaluation of a polyurethane urea vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications," *J. Vasc. Surg.*, vol. 34, no. 3, pp. 465–473, 2001, doi: 10.1067/mva.2001.117330.
- [33] K. K. Lau, D. P. Jones, O. Garber, and N. Nezakatgoo, "Use of a 'composite' vascular access graft in a young child on hemodialysis," *Hemodial. Int.*, vol. 11, no. 2, pp. 190–192, 2007, [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1542-4758.2007.00167.x>.
- [34] I. D. Maya, J. Weatherspoon, C. J. Young, J. Barker, and M. Allon, "Increased Risk of Infection Associated with Polyurethane Dialysis Grafts," *Semin. Dial.*, vol. 20, no. 6, pp. 616–620, 2007, [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1525-139X.2007.00372.x>.
- [35] D. B. Camasão et al., "Increasing cell seeding density improves elastin expression and mechanical properties in collagen gel-based scaffolds cellularized with smooth muscle cells," *Biotechnol. J.*, pp. 1–23, 2018.
- [36] R. R. Bradham, "The importance of porosity in vascular prostheses," *Am. J. Surg.*, vol. 100, no. 4, pp. 557–560, 1960, doi: 10.1016/0002-9610(60)90321-4.
- [37] J. Negishi, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, and A. Kishida, "High-hydrostatic pressure technique is an effective method for the preparation of PVA-heparin hybrid gel," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 5, pp. 617–622, 2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.001.
- [38] Y. Liu, B. Bolger, P. A. Cahill, and G. B. McGuinness, "Assembly of aligned polyvinyl alcohol-styrylpyridinium pendent group nanofibres for vascular tissue engineering applications," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part N J. Nanoeng. Nanosyst.*, vol. 223, no. 3, pp. 99–111, 2010, doi: 10.1243/17403499JNN177.
- [39] S. J. Najafi, A. A. Gharehaghaji, and S. M. Etrati, "Fabrication and characterization of elastic hollow nanofibrous PU yarn," *Mater. Des.*, vol. 99, pp. 328–334, 2016, doi: 10.1016/j.matdes.2016.02.111.
- [40] J. J. Hu, P. C. Lu, C. W. Lou, M. C. Lee, and J. H. Lin, "Small-diameter vascular grafts composed of polyester/spandex fibers: Manufacturing techniques and property evaluations," *Mater. Lett.*, vol. 171, no. 2016, pp. 42–45, 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2016.01.154.
- [41] J. H. Lin et al., "Tubular polyvinyl alcohol composites used as vascular grafts: Manufacturing techniques and property evaluations," *Mater. Lett.*, vol. 190, no. 2017, pp. 201–204, 2017, doi: 10.1016/j.matlet.2016.12.097.
- [42] M. F. A. Cutiongco, D. E. J. Anderson, M. T. Hinds, and E. K. F. Yim, "In vitro and ex vivo hemocompatibility of off-the-shelf modified poly(vinyl alcohol) vascular grafts," *Acta Biomater.*, vol. 25, pp. 97–108, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.039.
- [43] Y. Yao *et al.*, "In vivo evaluation of compliance mismatch on intimal hyperplasia formation in small diameter vascular grafts," *Biomater. Sci.*, 2023, [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2023/bm/d3bm00167a/unauth>.
- [44] N. Wakabayashi et al., "Polyvinyl alcohol coating prevents platelet adsorption and improves mechanical property of polycaprolactone-based small-caliber vascular graft," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 9, no. August, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.946899.
- [45] Development and evaluation of anisotropic and nonlinear aortic models made from clinical images for in vitro experimentation

- [46] G. Hu, G. Li, L. Chen, and F. F. Hong, "Production of novel elastic bacterial nanocellulose/polyvinyl alcohol conduits via mercerization and phase separation for small-caliber vascular grafts application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 239, no. May, p. 2023, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124221.
- [47] A. Estrada, O. Medina, R. Quispeb, and A. Martínez, "Caracterización de la fabricación de un andamio de alcohol polivinílico (PVA) para la sobrevivencia celular," in *VII Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud*, 2016, pp. 1–6.
- [48] B. Jensen, "Multilayer composite vascular access graft," 7297158 B2, 2007.
- [49] Y. Okano, "Blood vessel model comprising polyvinyl alcohol and silica particles," 9202389 B2, 2015.
- [50] T. Tanabe and M. Nambu, "Medical material of polyvinyl alcohol and process of making," 4734097, 1988.
- [51] H. T. Le, A. Mahara, T. Nagasaki, and T. Yamaoka, "Prevention of anastomotic stenosis for decellularized vascular grafts using rapamycin-loaded boronic acid-based hydrogels mimicking the perivascular tissue function," *Biomater. Adv.*, vol. 147, no. May, p. 2023, 2023, doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213324.
- [52] X. Liu et al., "Nitric oxide releasing poly(vinyl alcohol)/S-nitrosated keratin film as a potential vascular graft," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 111, no. 5, pp. 1015–1023, 2023, doi: 10.1002/jbm.b.35210.
- [53] C. Liu et al., "Decellularized Scaffold-Based Artificial Vascular Patch for Porcine Vascular Repair," *ACS Appl. Bio Mater.*, no. May, p. 2023, 2022, doi: 10.1021/acsbm.2c00957.
- [54] E. Roldán, N. D. Reeves, G. Cooper, and K. Andrews, "Towards the ideal vascular implant: Use of machine learning and statistical approaches to optimise manufacturing parameters," *Front. Phys.*, vol. 11, no. May, p. 2023, 2023, doi: 10.3389/fphy.2023.1112218.
- [55] H. Xu et al., "Rapid formation of ultrahigh strength vascular graft: Prolonging clotting time micro-dimension hollow vessels with interpenetrating polymer networks," *Compos. Part B Eng.*, vol. 250, no. May, p. 2023, 2023, doi: 10.1016/j.compositesb.2022.110456.

CAPÍTULO 2.

CONCEPTOS TEÓRICOS

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo, se presentan los conceptos teóricos más relevantes para la comprensión de los procesos y hallazgos experimentales desarrollados en esta tesis. Se inicia con la descripción del tejido arterial normal y patológico. Continúa con la descripción de los conceptos sobre la reparación biológica del tejido, y las intervenciones quirúrgicas que se realizan sobre las arterias. Una vez presentadas estas opciones e indicando las dificultades que presentan a nivel clínico, se exponen los biomateriales usados, especialmente el PVA, que se presenta como una opción de reemplazo vascular que suple las necesidades que exhiben las demás alternativas quirúrgicas. Junto con el PVA, se describen las propiedades de las moléculas que se usaron como aditivos en el desarrollo experimental del proyecto, como son el quitosano y el ácido oxálico.

2.2 LA ARTERIA

2.2.1 Estructura y composición

Las arterias en general son tubos elásticos y flexibles, cuyo calibre disminuye en función de su distancia con el corazón. Inician en un eje denominado aorta cuyas ramas se pueden dividir en arterias del sistema locomotor, destinadas a los músculos grandes consumidores de energía, pero cuyo gasto sanguíneo depende de la actividad, y en arterias del sistema visceral destinadas a nutrir los órganos [1].

La pared de un vaso sanguíneo consiste en tres capas, la túnica interna o íntima consiste en un revestimiento interno epitelial, que a su vez consiste en tres capas, la más interna es el endotelio y está constituido por una capa de células planas (endoteliales), la siguiente es la capa basal (fibras de colágeno) que provee soporte a las células endoteliales (CE) y la última es la lámina elástica interna que permite la difusión de sustancias de la túnica interna a la túnica media. La túnica media es una capa de tejido muscular y conectivo que si bien varía en los diferentes tipos de vasos, sus células (de músculo liso, CML) se encargan de la vasoconstricción y vasodilatación de los vasos sanguíneos (disminución y aumento del diámetro de la luz), cuenta además con una lámina elástica externa que consiste en una red de fibras elásticas ubicada entre la túnica media y la túnica externa. La túnica externa está formada por fibras elásticas y colágenas, posee inervación, vasos pequeños que irrigan los tejidos de los vasos (*vasa vasorum*) y permite el anclaje de los vasos que irrigan los tejidos circundantes [2]. En la *Figura 1*, se observan las capas de los vasos sanguíneos, en A) y en B) se presentan las tres capas, túnica interna, media y externa, se observa que las capas de las arterias tienen más subdivisiones y son más gruesas que en las venas debido a su función en la circulación sanguínea, adicionalmente las venas poseen válvulas para asegurar el retorno venoso ya que estas no

cuentan con la fuerza inicial del bombeo cardiaco para el movimiento de la sangre a través de estas, en las figuras C) y D) se pueden observar las mismas capas tanto en arterias como en venas pero en un corte transversal.

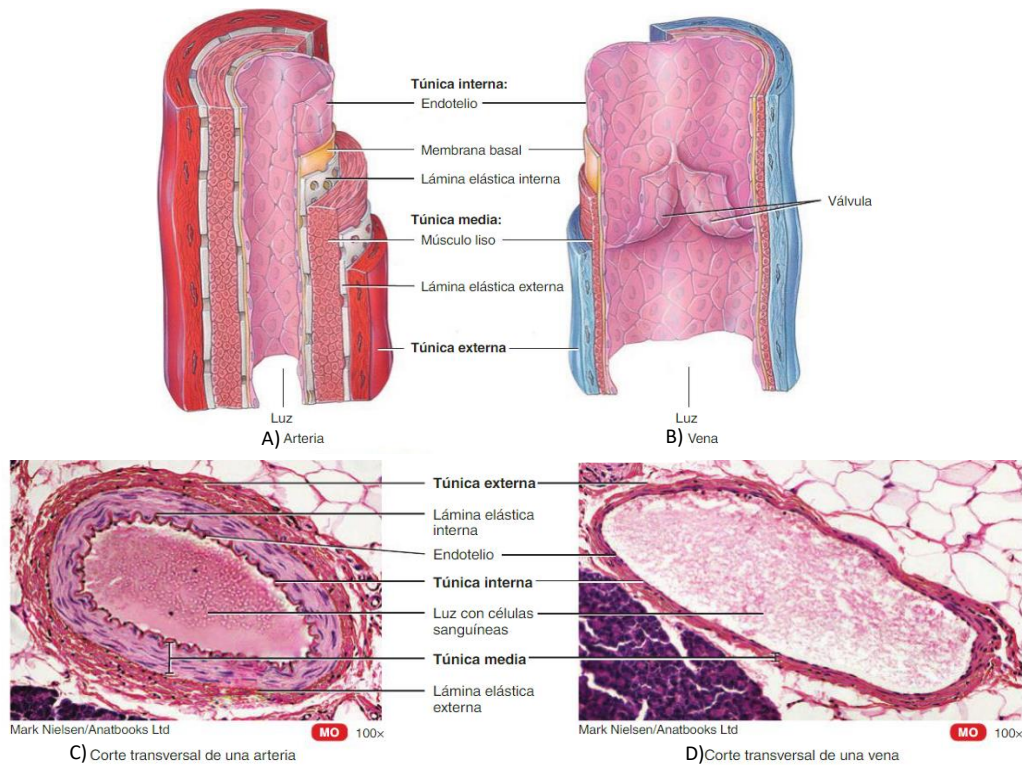


Figura 1. Estructuras comparadas de los vasos sanguíneos, modificada de [2].

2.2.2 Fisiología de la arteria

Las arterias proveen estructuras que permiten el flujo sanguíneo entre el corazón y los tejidos permitiendo el intercambio de nutrientes y desechos, contribuyendo a la homeostasis. También contribuyen con el ajuste de la velocidad y el volumen del flujo sanguíneo [2].

En general, las arterias tienen paredes más gruesas y fuertes, y las venas son de mayor calibre. La capa media de las arterias es más gruesa, muscular y elástica, debido a la cantidad de fibras elásticas que contiene, esto le provee gran distensibilidad. La elasticidad de las arterias cede a la presión del corazón, no obstante, logra soportarla. Tiene más nervios simpáticos para dilatar y contraer los vasos, de manera que su diámetro cambia fácilmente ante la presión, pero no se desgarran; por otro lado, las venas no soportan tanta presión, sus paredes son delgadas y fibrosas [2][3].

2.2.2.1 Células endoteliales

Las CE (ver Figura 2) forman una monocapa que recubre todo el interior del sistema vascular, por lo tanto, participan en el mantenimiento de los vasos sanguíneos y en la función circulatoria. Estas células ejercen un control sobre la permeabilidad del endotelio permitiendo el paso de moléculas a través de este. Basalmente tienen funciones de mantenimiento de la interfaz sangre-tejido evitando la formación de trombos y regulando la trombólisis, adherencia plaquetaria y el flujo sanguíneo.

Cuando son estimuladas por la trombina o la histamina, pueden ejercer actividad protrombótica, proliferativa y vasoconstrictora. También juegan un papel en la respuesta inflamatoria e inmune, ya que regulan el movimiento de linfocitos y leucocitos hacia los tejidos. A nivel de formación de vasos sanguíneos, cumplen un rol importante en la angiogénesis y vasculogénesis ya que en las primeras etapas de la vasculogénesis (etapa embrionaria) se requiere factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) y sus receptores específicos en las *CE* para la formación de vasos sanguíneos; la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio preexistente (la angiogénesis), también se ve afectada por el *factor VEGF* [4].

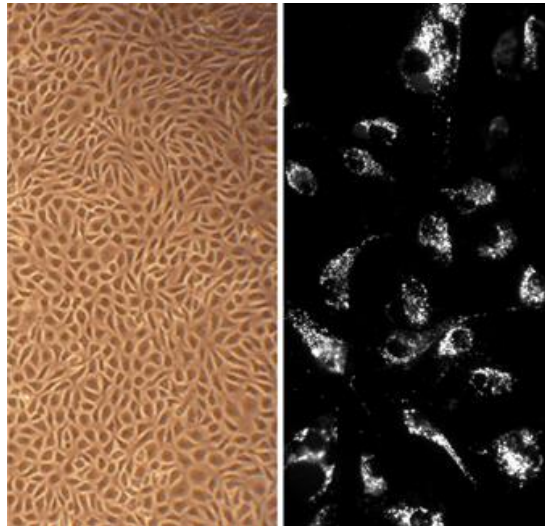


Figura 2. Células endoteliales de aorta bovina (BAOEC), sin modificar de [5].

2.2.2.2 Células de músculo liso

La función principal de las *CML* vasculares (ver *Figura 3*) es la contracción y regulación del tono del vaso sanguíneo, presión arterial y flujo sanguíneo, para ello expresan un repertorio único de proteínas contráctiles, canales iónicos y moléculas de señalización. Estas células tienen una alta plasticidad ya que pueden modular su fenotipo y diferenciarse (no terminalmente), de acuerdo con señales ambientales locales como factores bioquímicos, componentes de la matriz extracelular (*ME*) y factores físicos como el estrés por estiramiento y cizallamiento; al parecer también debido a programas genéticos innatos. Este contraste en la diferenciación, debido a la diversidad entre las *CML*, permite que los vasos sanguíneos alcancen la flexibilidad necesaria para funcionar de manera eficiente en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas [6][7].

Tras una lesión, como una angioplastia, la colocación de un *stent* o una cirugía de derivación, las *CML* vascular se desdiferencian y vuelven a entrar en el ciclo celular, demostrando una mayor tasa de proliferación, migración y síntesis de componentes de *ME* y al mismo tiempo, demuestran una disminución en la expresión de marcadores contráctiles específicos [6][7].

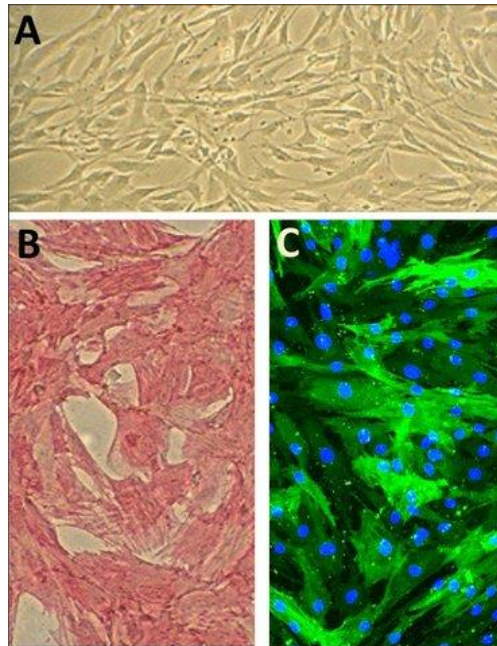


Figura 3. Células de músculo liso humano aórticas (HAOSMC). A) HAOSMC inmunomarcadas por alfa-actina de músculo liso B) por el método ABC y C) por inmunofluorescencia y DAPI, sin modificar de [8].

2.2.2.3 Fibroblastos

Son el tipo de células más abundantes en el tejido conectivo (ver *Figura 4*). De origen mesenquimatoso puede ser alargadas o en forma de estrella con múltiples proyecciones citoplasmáticas. Se caracterizan por tener una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso (*RER*) y un gran aparato de Golgi. Dentro de sus funciones se encuentra el mantenimiento de la *ME*, por ello producen colágeno tipo *I*, *III* y *IV*, proteoglicanos, fibronectina, lamininas, glucosaminoglicanos, metaloproteinasas y prostaglandinas entre otros.

Para cumplir con esta función, los fibroblastos están en constante comunicación con las células circundantes y responden a señales autocrinas y paracrinas. Los fibroblastos son un grupo de células diverso, incluso puede haber una gran variedad dentro de un mismo órgano cumpliendo funciones diversas. Tienen además una gran plasticidad ya que células con diferenciación terminal como adipocitos, pericitos, *CE* y células epiteliales pueden desdiferenciarse en fibroblastos, según las señales de su entorno. Estas células pueden generar tejido funcional ya que están involucrados en las etapas de la cicatrización de heridas: inflamación, proliferación celular, deposición de *ME* y remodelación [9].

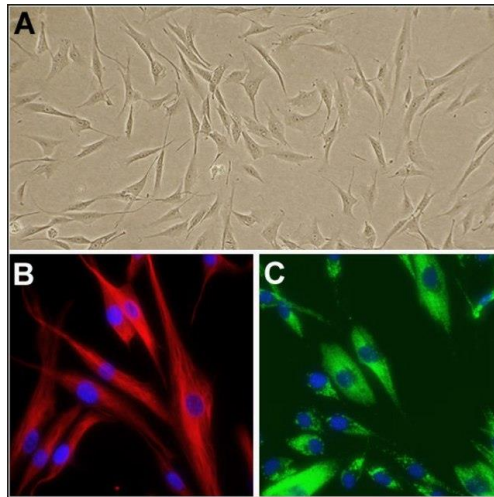


Figura 4. A) Fibroblastos humanos dermales (HDF), B) HDF inmunomarcado por vimentina, C) HDF teñido por FSP, sin modificar de [10].

2.3 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

2.3.1 Lesiones vasculares

Aterosclerosis

La aterosclerosis es la acumulación de grasas, colesterol y otras sustancias dentro de las arterias y en sus paredes denominada placa. Se ha demostrado que puede empezar a formarse en la primera infancia, pero no es hasta que la lesión está avanzada que la enfermedad se manifiesta. Cuando la lesión está avanzada se denomina fibroateroma o capa fibrosa, y se propicia la erosión de las CE superficiales, rotura de la cubierta fibrótica, erosión de un nódulo cálcico o hemorragia intraplaca. Suele componerse de un núcleo necrótico (lípidos amorfos y cristales de colesterol) en medio de la placa con CML y células inflamatorias alrededor como los macrófagos (ver Figura 5). En caso de que la placa continúe creciendo puede obstruir la vena con las consecuencias clínicas que esto conlleva, o bien si no genera obstrucción, induce una respuesta cicatrizante que estimulan la producción de colágeno y la migración de las CML que generan un agrandamiento del vaso y un estrechamiento luminal progresivo. La aterosclerosis puede provocar cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial periférica y aneurismas ateroscleróticos [11][12].

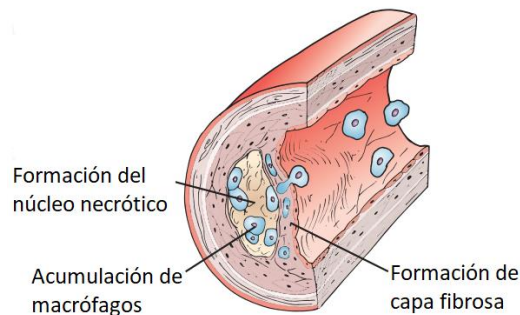


Figura 5. Formación de un fibroateroma. Modificado de [12].

Hipertensión

La hipertensión se define como un aumento crónico de la presión arterial por encima de 140/90 mmHg, afecta alrededor del 30 % de los adultos y es un factor de riesgo importante para las ECV. La presión arterial depende de la interacción del corazón, los vasos sanguíneos y los riñones en el bombeo y filtración de la sangre [13]. Dentro de los factores de riesgo están la edad, la raza y el origen étnico, ya que la presión arterial tiende a aumentar con la edad, y se ha encontrado mayor incidencia en personas negras no hispanas que en otras razas. Además, existen varios factores de riesgo modificables, como la ingesta alta de sodio, la ingesta baja de potasio, el consumo de alcohol, la obesidad, la falta de actividad física y la dieta poco saludable [14]. La hipertensión es causante de enfermedades como ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, enfermedad renal crónica, insuficiencia cardíaca, deterioro cognitivo y demencia [13].

2.3.2 Mecanismos biológicos de regeneración vascular

2.3.2.1 Angiogénesis

La angiogénesis se refiere al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (aumento de densidad capilar) que puede ocurrir antes o después del nacimiento, pero depende de la existencia de un vaso principal a partir del cual se inicia la formación del nuevo vaso. En la vida posnatal permite reconstruir vasos sanguíneos tras la formación de heridas y la reconstrucción de un nuevo revestimiento uterino tras la menstruación, entre otros [2].

La angiogénesis es inducida por la isquemia tisular y está mediada por *VEGF* y otros factores que estimulan la formación de vasos sanguíneos desde los vasos ya existentes. Este proceso ocurre en tres pasos (ver *Figura 6*) [15]:

- Disolución de la membrana basal del vaso principal en la zona de la lesión por enzimas proteolíticas que son liberadas por células inflamatorias como los neutrófilos.
- Migración y proliferación de *CE* a través del defecto gracias a las citoquinas liberadas por células inflamatorias y células dañadas en la lesión.
- Organización de la nueva rama capilar como una estructura tubular de *CE* que genera una membrana basal, que se alarga en el proceso de cicatrización.

2.3.2.2 Arteriogénesis

La arteriogénesis es la formación de una circulación colateral en respuesta a una estenosis arterial crónica y progresiva. Ocurre porque en la estenosis se genera un aumento en la tensión de cizallamiento, que activa el endotelio para liberar óxido nítrico. La liberación del óxido nítrico es el primer paso de una serie de eventos donde se liberan moléculas como el *VEGF*, moléculas de adhesión celular endotelial, la proteína quimiotáctica de monocitos (*MCP-1*) las cuales contribuyen con el reclutamiento de monocitos, que junto a las *CE* y los macrófagos conducen a la proliferación de arterias nativas colaterales. En una segunda fase, el estrés generado sobre la pared induce el crecimiento de las *CML* y por lo tanto aumenta el grosor del vaso formado (ver *Figura 7*). En la fase

final ocurre una regresión de los vasos colaterales más pequeños, permitiendo que solo se conserven unos pocos vasos colaterales más grandes [12].

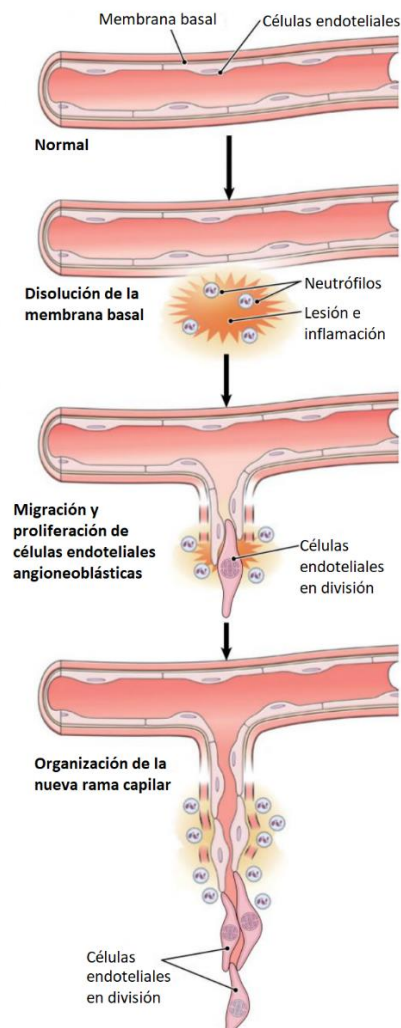


Figura 6. Proceso de angiogénesis tras la aparición de una herida. Modificado de [15].

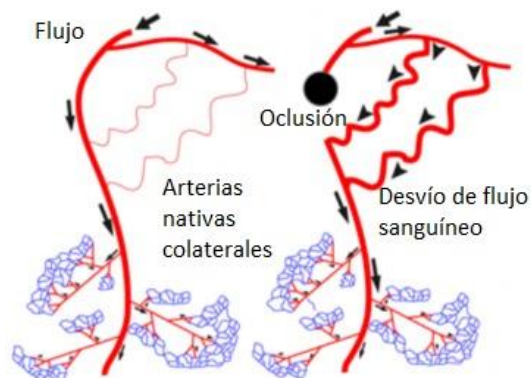


Figura 7. Proceso de la arteriogénesis. Modificado de [16].

2.4 TÉCNICAS USADAS EN REGENERACIÓN O REEMPLAZO VASCULAR

2.4.1 Características ideales de un implante vascular

Un injerto vascular ideal debería poseer cualidades específicas relacionadas con su comportamiento mecánico (incluyendo factores como la retención de suturas, flexibilidad longitudinal y circunferencial, resistencia a la tracción y compresión, entre otros aspectos), además de otras características relacionadas con su compatibilidad biológica tanto con las células como con la sangre, permeabilidad efectiva al flujo sanguíneo, capacidad de biodegradación, características morfológicas y estructurales distintivas, estabilidad confiable, procesamiento sencillo, métodos de esterilización confiables, empaque que garantice la integridad, condiciones de almacenamiento seguras y un rendimiento sólido durante el transporte [17].

La importancia de las propiedades mecánicas en el diseño de un injerto vascular radica en el hecho de que el implante debe tener la suficiente resistencia mecánica para soportar el flujo sanguíneo a presión y resistir la deformación [18]. La complejidad de este diseño se debe a la naturaleza viscoelástica de los vasos sanguíneos. La resistencia a la tracción longitudinal es una medida crucial de la resistencia del injerto a las tensiones internas después de la implantación, ya que el material del injerto experimenta fuerzas como tensiones longitudinales y axiales durante los ciclos sistólicos y diastólicos [18]. En cuanto a la distensibilidad, un desajuste entre el implante y el tejido nativo puede interrumpir los perfiles de flujo sanguíneo y llevar a una zona de separación en el flujo. Por lo tanto, la distensibilidad del injerto debe asemejarse estrechamente al tejido nativo, imitando el movimiento de la pared arterial, que depende de la presión debido a la elasticidad y del tiempo debido a la viscosidad [18]. Finalmente, otra característica mecánica importante es la presión de ruptura, donde los límites máximos de presión que el injerto puede soportar antes de la expansión del diámetro y, en última instancia, el fallo del injerto, deben ser iguales o mayores que los del tejido nativo [18].

2.4.2 Injertos

Autoinjerto

Los autoinjertos siguen siendo hoy día el “*standard*” en reemplazo vascular, sin embargo, se vuelven inviables si la enfermedad del paciente afecta todo el árbol vascular en general, sin contar con que la demanda de estos injertos supera la disponibilidad de estos [19]. Por esto en muchos casos donde se recurre a este tipo de injertos, la aparición repetida de la necesidad de intervenir quirúrgicamente debido a la enfermedad y la limitante disponibilidad del propio paciente hace que se vuelva “inoperable” [18] y se recurra a otras opciones como los implantes sintéticos [20].

Alloinjertos

Si bien el trasplante de injertos vasculares inició en los primeros años del siglo XX con injertos del propio paciente, en 1910 se empezaron a realizar trasplantes alogénicos y en 1951 se creó el primer banco de tejidos de vasos sanguíneos. Sin embargo, la aparición de múltiples complicaciones relacionadas principalmente con las respuestas inmunológicas de los pacientes, redujeron su aplicación en la práctica clínica e impulsaron el desarrollo de implantes sintéticos [21].

Actualmente, los avances en la donación y trasplante de órganos, la criobiología, la inmunobiología, las determinaciones de histocompatibilidad y la terapia inmunosupresora han permitido la reutilización de aloinjertos bajo indicaciones limitadas [21]. Finalizando el siglo XX se concluyó que la supervivencia de un aloinjerto a largo plazo depende de las respuestas inmunológicas, no obstante, en los últimos años las investigaciones siguen mostrando que los aloinjertos continúan presentando complicaciones como oclusiones, estenosis, degeneraciones aneurismáticas, entre otros [21].

Xenoinjertos

Respecto al uso de injertos vasculares de origen animal en trasplantes humanos, algunos autores han utilizado arteria carótida bovina para crear un acceso para hemodiálisis, pero los datos que se han obtenido son contradictorios, ya que algunos estudios han encontrado una ligera mejora en la permeabilidad secundaria (inducida por factores externos) de estos injertos comparados con injertos comerciales de *ePTFE*. Pero en realidad, no hay evidencia de que estos injertos ofrezcan buenos resultados cuando se usan en ámbitos diferentes al acceso de hemodiálisis [22].

Injertos aloplásticos

Posiblemente el injerto comercial sintético más popular de todos es el Dacron®, fabricado de fibras de *PET*; puede estar o no impregnado con colágeno. Sin embargo, no ofrece capacidad de regeneración tisular y está asociado a algunos problemas de trombogenicidad e infecciones [23]. El *ePTFE* es otro material utilizado en injertos vasculares y es comercializado como *Gore Tex*®. Tiene la capacidad de ser manipulado para fabricar vasos de diámetros pequeños y posee bajo coeficiente de fricción, pero es mucho más rígido que las venas o arterias; a nivel comercial se fabrica impregnado o no con carbono. El poliéster poliuretano (*PEEU* por sus siglas en inglés) ha sido también utilizado en implantes vasculares, su atractivo radica en su capacidad de degradarse *in vivo*, dicho implante fue fabricado por varias empresas pero ninguna logró que este fuera aprobado para implantes a largo plazo, *Mitrathane*® de la compañía *Mitral*, por ejemplo, tuvo resultados poco concluyentes en ensayos animales debido a que la porosidad del injerto era cerrada (buscaban generar porosidad) y *Vectra*® de *Thoratec Laboratories* fue aprobada por la FDA en 2000, pero sólo para el acceso vascular durante la hemodiálisis [24].

Estos materiales son biológicamente suficientes para reemplazar los vasos sanguíneos nativos. Además de la mejora constante del material, se han desarrollado modificaciones como la conjugación de heparina en una superficie luminal para agregar función anticoagulante o unión de anillo para prevenir el colapso de un injerto; estas mejoras también están contribuyendo a una permeabilidad a largo plazo en injertos de calibre medio (5-10 mm) [25]. Como resultado, los injertos vasculares sintéticos demuestran resultados satisfactorios en la reparación de vasculaturas grandes y de calibre medio [26]. Sin embargo, no es el mismo caso para los diámetros pequeños (< 6 mm), donde este tipo de implantes presenta problemas de permeabilidad [27][28], provocando trombosis, hiperplasia de la íntima, arterosclerosis o infección.

- **Aplicaciones clínicas**

Los injertos que se utilizan clínicamente para la revascularización de pequeño calibre (<5 mm), se basan exclusivamente en injertos autólogos porque actualmente ningún injerto sintético de pequeño calibre está aprobado para uso clínico debido a su tasa de permeabilidad mucho más baja que los injertos autólogos [26].

Amabili et al. probaron injertos de *Dacron* en un circuito circulatorio simulado y compararon los resultados con la aorta descendente torácica humana, encontraron que el cambio del diámetro cíclico del injerto de *Dacron* siempre está por debajo de 0,2 %, mientras que en las aortas de donantes jóvenes este valor es aproximadamente el 10 %, de esta misma manera encontraron que para el segmento aórtico el área dentro del asa de histéresis aumenta considerablemente con la frecuencia del pulso, pero para el injerto de *Dacron* esta área no está muy influenciada por la frecuencia cardíaca. Esta diferencia de rigidez entre el injerto de *Dacron* y la aorta humana hace que, en el injerto sintético, la impedancia aórtica se refleje en un aumento de la poscarga del ventrículo izquierdo, generando complicaciones en la población receptora [29].

Halbert et al. revisaron casos clínicos del uso de *ePTFE* como injerto arteriovenoso para hemodiálisis, y encontraron que si bien, los injertos han sufrido mejoras en los últimos años, la permeabilidad de estos sigue siendo deficiente, los autores encontraron que en los casos de 2007 a 2019 analizados, la permeabilidad primaria a los 6 meses de implantación fue de 56 % y para estudios más antiguos se encontraron permeabilidades de 58 % (1966-2001) [30].

2.4.3 Ingeniería de tejidos

Los injertos vasculares sintéticos surgieron como alternativa al uso de tejido autólogo o alogénico, debido a su poca disponibilidad, ya que pueden ser fabricados en cantidades suficientes para suplir la demanda. Actualmente, los implantes vasculares comerciales han suplido satisfactoriamente con los requerimientos del tejido que reemplazan, permitiendo una permeabilidad aceptable en vasos de grandes diámetros. A pesar de ellos, para vasos de calibre pequeño (<6 mm) existen problemas como hiperplasia de la íntima y formación de trombos que disminuyen la permeabilidad. Muchos autores han estado desarrollando implantes desde la ingeniería de tejidos, que puedan superar las dificultades que presentan los implantes sintéticos, mezclando células autólogas o células derivadas de células madre alogénicas con un scaffold, para replicar las propiedades mecánicas y biológicas nativas de los vasos a reemplazar [31][32].

Aunque los injertos basados en ingeniería de tejidos han permitido la regeneración de un nuevo vaso sanguíneo, a través de la producción de *ME* de las células que lo habitan, aun no se han realizado estudios clínicos que validen el uso de estos injertos [33].

2.4.4 Terapia celular

La terapia con células madre en los trastornos vasculares permiten la creación de un microambiente angiogénico y regenerativo que propicia la remodelación y reparación de tejidos. Con todo, el uso de

células madre embrionarias constituyen un desafío ético, ya que se derivan de la masa celular interna del blastocisto poniendo en debate el estado moral del embrión [34].

Existen otras alternativas a las células madre embrionarias para la terapia celular, como lo son las células madre/estromales mesenquimales (*MSC*), que en traumatismos graves o casos crónicos no logran recuperar el tejido. Es allí donde investigadores como Fierro et al. han desarrollado terapias celulares más potentes, usadas para el tratamiento de la isquemia crítica en las extremidades, modificando genéticamente *MSCs* para producir altos niveles del *VEGF*, aunque, aún no se cuenta con resultados clínicos [35].

2.5 BIOMATERIALES USADOS EN REGENERACIÓN VASCULAR

2.5.1 Generalidades

Los materiales utilizados en regeneración vascular pueden ser clasificados en degradables, biopolímeros, tejidos y sintéticos. Dentro de los polímeros degradables se tienen, por ejemplo, el ácido poliláctico (*PLA*) y la policaprolactona (*PCL*) que fueron utilizados por Li et al., quienes fabricaron injertos tubulares a partir del tejido de fibras de *PLA* que se asperjaron con una solución de *PCL*, con el objetivo de garantizar una respuesta a la compresión, torsión y presurización pulsátil adecuada; para evitar que el flujo sanguíneo provoque un colapso en los injertos. Compararon las propiedades del injerto con el injerto comercial *ePTFE* y lograron conservar la recuperación elástica y distensibilidad del *ePTFE*, además mejoraron la resistencia a la tracción, compresión, torsión y estallido [36].

En la utilización de tejidos para el reemplazo vascular, la descelularización de tejidos ha representado una alternativa atractiva debido a que su estructura tridimensional natural apoya la migración de las células huésped y la remodelación vascular, en esta línea Cai et al., descelularizaron arterias porcinas nativas e inmovilizaron heparina en su superficie para inhibir la trombogénesis, estas arterias fueron injertadas subcutáneamente en ratas *Wistar* adultas, y encontraron que su método conservó en gran medida las propiedades y estructura de la arteria; además la heparina inmovilizada en el andamio puede inhibir la trombogénesis de manera eficaz. La prueba de liberación *in vitro* mostró que la liberación de heparina se estabilizó después de 15 días y que se conserva hasta en un 32.4 % después de 4 semanas. Esto indicó que las estructuras vasculares reticuladas heparinizadas podrían prevenir la trombosis durante mucho tiempo [37].

Deepthi et al. utilizaron la técnica de electrohilado para fabricar una estructura tubular con tres capas que imitara las tres capas de los tejidos vasculares, para ello utilizaron poli(3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato) (*PHBV*), *PVA* y *VEGF* en la fabricación de la capa interna, para la capa media electrohilaron *PHBV* y elastina, finalmente para la capa más externa utilizaron *PHBV* y elastina para fibras alineadas, y concentrado de factor plaquetario, *PVA* y *PHBV* para fibras aleatorias. Adicionalmente sembraron *CE* de cordón umbilical en la capa interna, *CML* en la segunda y *MSC* en la capa más externa. Finalmente obtuvieron una estructura tubular con propiedades mecánicas similares a las de los vasos nativos de diámetro pequeño, con infiltración celular adecuada para su uso como implante vascular [38].

2.5.2 Hidrogeles

Las propiedades de los hidrogeles como su alto contenido de agua, buena biocompatibilidad y capacidad de degradación, los han hecho biomateriales de uso común en la ingeniería de tejidos [39]. Como implantes vasculares, los hidrogeles no suelen presentar por sí mismos las propiedades mecánicas necesarias para ser utilizados en este tipo de implante, por lo tanto, han sido fabricados de mezclas de materiales que se complementan o han sido utilizados con siembra celular [40]. En la producción de hidrogeles para implantes vasculares se han utilizado polímeros como el alginato, fibrina, colágeno, ácido hialurónico, polietilenglicol, polidimetilsiloxano, gelatina y PVA entre otros [41].

Li et al. fabricaron andamios de nanofibras de hidrogel de pectina, para utilizarlos como un soporte celular de MSC que permita su diferenciación en CE. Modificando la rigidez y la hidrofobicidad de los hidrogeles a través del ajuste de los niveles de oxidación de la pectina y la reticulación con dihidrazida de ácido adípico, pudieron verificar que en los hidrogeles más rígidos (módulo de Young de 25 kPa aproximadamente), encontraron mayor expresión génica para marcadores específicos de genes de CML vascular después de 14 días de haber sembrado las MSC; en cambio en los hidrogeles menos rígidos (módulo de Young de 5 kPa aproximadamente) prevalecían los marcadores específicos de genes de CE [42].

2.5.3 El polivinil alcohol (PVA)

2.5.3.1 Generalidades

El PVA es un polímero sintético semicristalino, que proviene de la hidrólisis controlada del poli(acetato de vinilo). Según la cantidad de grupos acetato del polímero que sean hidrolizados, el PVA se clasifica como de alta (~99%), media (~88%) y baja (~78%) hidrólisis, este valor define el porcentaje molar de unidades repetitivas con grupos hidroxilo dentro de las unidades de sus cadenas poliméricas; este grado de hidrólisis define algunas características como la solubilidad en soluciones acuosas y su actividad superficial [43]. El PVA es soluble en agua [44], parcialmente soluble en etanol e insoluble en otros solventes orgánicos [45].

2.5.3.2 Propiedades biológicas y físicas

Este material sintetizado por primera vez en 1924 tiene propiedades físico-químicas y mecánicas determinadas por el número de grupos hidroxilo presentes en su estructura [46]. En general es un material con bajo impacto ambiental y alta resistencia química, lo que lo hace apto para diversas aplicaciones como en la industria textil, en la producción de papel, en empaques de alimentos y en dispositivos médicos; en esta última aplicación son fundamentales sus propiedades como ser biocompatible, no tóxico, no cancerígeno, tener capacidad de hinchamiento y bioadhesividad. Por lo cual se ha usado en diversas aplicaciones como reemplazo del menisco de la rodilla [47], membrana de hemodiálisis [48] y válvula cardíaca [49], entre otros.

El PVA no se obtiene polimerizando alcohol polivinilo debido a que este último es muy inestable, por lo tanto, se obtienen de la polimerización del acetato de vinilo y luego a través de una hidrólisis alcalina

parcial se intercambia el grupo éster del acetato de vinilo por un grupo hidroxilo [46]. Su estructura puede observarse en la *Figura 8*.

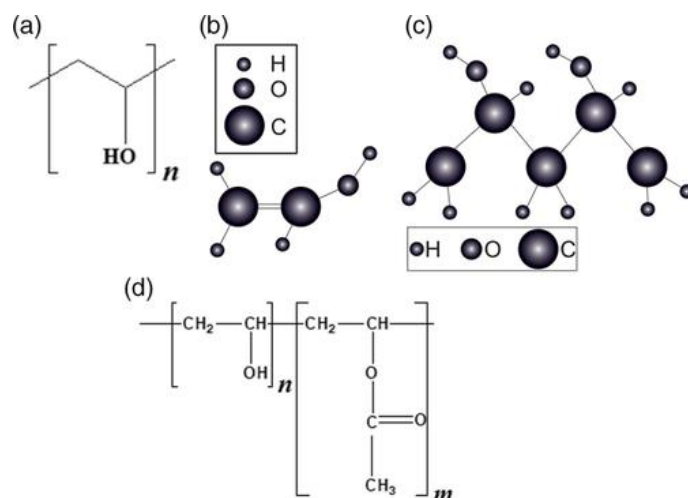


Figura 8. A) estructura monomérica de PVA completamente hidrolizado, B) estructura tridimensional de un monómero de PVA, C) estructura tridimensional de PVA, y D) PVA parcialmente hidrolizado [46].

2.5.3.3 Técnicas de fabricación

Debido a la alta solubilidad del *PVA* en el agua, este polímero necesita ser reticulado para formar hidrogeles que sean biofuncionales en diversas aplicaciones; dicha reticulación puede ser física o química y le proporciona al material la estabilidad estructural que se refleja en sus propiedades mecánicas, además también le proporciona las propiedades biológicas que necesita como biomaterial [50].

También se consigue preparar en forma de perlas esféricas, utilizando como reticulante una solución de ácido bórico y luego realizando una esterificación con fosfato para permitir la solidificación de estas, dichas perlas tienen aplicación en la eliminación de desechos tóxicos nitrogenados [46]. Es posible fabricar fibras de *PVA* implementando varias técnicas, una de las más populares en la industria médica es el electrohilado, ya que se obtienen fibras de tamaño nanométrico con posibilidad de interactuar con las células [38][51][52]. También se han fabricado películas de *PVA* como dispositivos o sensores ópticos gracias a sus propiedades ópticas, o como membranas de separación puesto que logran ser usadas para separación sin el uso de temperatura [46].

2.5.4. Polímeros naturales

Los polímeros naturales o biopolímeros se definen como las sustancias orgánicas presentes en fuentes naturales (ver *Figura 9*) y comprenden los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos entre otros. Estos suelen ser biocompatibles y biodegradables, lo que los hace útiles en aplicaciones médicas y alimentarias [53].



Figura 9. Fuentes de polímeros naturales. Modificada de [52].

Quitosano

El quitosano es un polímero obtenido de la desacetilación parcial de la quitina [54], es catiónico en medios ácidos y esto le confiere propiedades como ser antifúngico, antibacteriano, depurante y antioxidante, es curativo, tiene capacidad de formar fibras y películas [55], biocompatible, biodegradable [56][57][58], reductor del dolor en heridas, controlador de la inflamación y mejora la construcción de *ME* generando proliferación de fibroblastos, entre otros [54].

El ácido acético ha sido ampliamente utilizado en la disolución del quitosano, debido a que este necesita un pH ácido (< 6) para disolverse mientras no degrade al polímero [59], aunque en este proceso también son importantes otros factores como el grado de desacetilación, la distribución de los grupos aminos y acetilos en la cadena polimérica y el grado de ionización. Las soluciones ácidas con pH inferior a 6 (excepto ácido sulfúrico) permiten que los grupos aminos libres se protonen, solubilizando el polímero de manera que el quitosano se convierte en un polímero catiónico soluble con alta densidad de carga [60].

Chen et al. fabricaron esferas de *PVA* y quitosano para reducir el riesgo tromboembólico en el control de hemorragias, el efecto hemostático de las esferas se evaluó tanto *in vitro* como *in vivo* midiendo el tiempo de la coagulación sanguínea y en un modelo de hemorragia hepática en ratas respectivamente. Las esferas fabricadas con 50 % de quitosano y 50 % de *PVA* (porcentaje de sólidos) mostraron la mejor

capacidad hemostática evaluada en este estudio, acortaron el tiempo de coagulación de la sangre en un 38 % y el tiempo de hemorragia hepática en un 37 % con respecto al control, estas esferas también redujeron significativamente la formación de tromboembolias [56].

Escobar y Perea fabricaron hidrogeles de quitosano, *PVA* y aloe vera para aplicaciones cutáneas. Obtuvieron un hidrogel que impidió el crecimiento bacteriano durante 8 horas y que presentó mayor flexibilidad y capacidad de absorción que los hidrogeles de solo *PVA* [57].

El descenso del pH en las soluciones de *PVA* podría permitir la disolución del quitosano en estas sin el uso de ácido acético. Así lo presentaron algunos autores, Luo et al. fabricaron hidrogeles de *PVA*-quitosano y citrato de sodio para su aplicación en la ingeniería de tejidos, prepararon el hidrogel mezclando *PVA* y quitosano en agua a 90 °C en agitación magnética hasta la completa disolución de ambos polímeros, tras esto el proceso continuó con ciclos de *C/D* y exposición a citrato de sodio [61], los autores aseguran haber obtenido una solución homogénea, sin embargo, otros autores afirman que la exposición del quitosano a altas temperaturas dificulta su disolución, ya que a pesar de que el primer indicio de degradación se presenta a 180 °C y de que teóricamente es posible llevar al polímero a temperaturas por debajo de su temperatura de transición vítrea (depende del peso molecular) sin afectar sus propiedades y de que en la preparación de vehículos farmacéuticos y dispositivos médicos, el quitosano se ha llevado hasta 100 °C, su calentamiento en una solución ácida cambia sus propiedades reológicas y ralentiza la velocidad de su disolución [62]. Además, a alta presión (en el caso de autoclavar la solución) disminuye el peso molecular del polímero y se generan fluctuaciones en su índice de polidispersidad [59].

Colágeno y gelatina

La gelatina es un grupo de proteínas desnaturalizadas obtenidas de la hidrólisis parcial del colágeno (proteína fibrosa) [63][64], es muy utilizada en aplicaciones biomédicas debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, interacción celular, no inmunogenicidad y disponibilidad comercial. Durante el proceso de gelificación, las moléculas de gelatina se agregan y sufren cambios conformacionales, pasan de una espiral aleatoria a una de triple hélice, de manera que se generan enlaces de hidrógeno intermoleculares, no obstante, estos se funden fácilmente por encima de los 30 – 35 °C, por ello algunos autores utilizan glutaraldehído o carbodiimidas para generar enlaces covalentes entre las cadenas de la gelatina [63].

Los hidrogeles de *PVA* tienen estabilidad mecánica, son biocompatibles y fáciles de procesar, pero no tienen buena adherencia celular. La gelatina se ha utilizado para incrementar la adhesión y propagación celular sobre el *PVA* gracias a las abundantes secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico (*RGD*) que posee y que permiten su unión con sitios de reconocimientos de muchas integrinas [63].

Tal es el caso estudiado por Simsek et al., quienes fabricaron un hidrogel de *PVA* y gelatina para recubrir un implante de níquel-titanio en busca de mejorar su interfaz biológica, el *PVA* permitió construir un hidrogel con alta resistencia mecánica sin necesidad de usar reticulantes químicos y la gelatina propició la deposición de células *Balb/3T3* con mayor incidencia en las zonas ricas en gelatina [65]. Kim et al., biofuncionalizaron hidrogeles de *PVA* con gelatina para curación de heridas. El *PVA*

como sustrato del hidrogel le confirió propiedades físicas y mecánicas adecuadas para promover la curación de heridas y la gelatina le otorgó puntos de unión celular para células *L929*, mejorando la interacción biológica sin alterar las propiedades obtenidas por el *PVA* [66].

Otros autores optaron por una reticulación física, como Ren et al. quienes fabricaron hidrogeles de *PVA* y gelatina de pescado como apósito para heridas, y los reticularon con cuatro ciclos de *C/D*. Observaron que la cantidad de gelatina presente en el hidrogel determinaba la proporción de hinchamiento, la tasa de evaporación del agua y la cinética de hinchamiento del mismo, y concluyeron que el apósito tuvo excelentes propiedades físicas, que cumplían los requisitos esenciales para aplicaciones médicas [64]. Marella et al. crearon un hidrogel de *PVA* y gelatina para reemplazo de menisco utilizando partículas de alginato como porógenos, los hidrogeles exhibieron una alta porosidad (74 %), conservando el módulo de elasticidad (0.25 MPa) y el alto contenido de agua presentes en los hidrogeles de *PVA*. La validación del modelo animal *ex vivo* demostró que la adición de gelatina combinada con la microporosidad del hidrogel mejoró la integración del implante con el tejido del huésped [67].

Fibroína

Los capullos de gusano de seda *Bombyx mori* están compuestos principalmente de fibroína y sericina. La fibroína constituye el 75 % del capullo y está conformada por tres subunidades de la cadena molecular, una cadena pesada (*H*), una ligera (*L*) y una proteína *P25* en una relación 6:6.1, además tiene zonas cristalinas y zonas amorfas, estas estructuras le confieren a la fibroína resistencia mecánica y tenacidad, conjuntamente posee propiedades de biocompatibilidad, degradación controlable y facilidad de procesabilidad, lo cual la ha hecho una candidata para su utilización en la industria médica [68].

Hou et al. fabricaron hidrogeles de *PVA* biofuncionalizados con fibroína y reticulados con ciclos de *C/D*, la fibroína no modificó las propiedades mecánicas del *PVA*, el hecho de contener una secuencia de aminoácidos que facilita el crecimiento y la migración celular la hace prometedora para su uso en cultivo celular. No obstante, se destaca que obtuvieron resultados diferentes según el tipo de célula evaluado, mientras hubo inhibición de crecimiento de *MSC* de la médula ósea y *CML*, se promovió el crecimiento de células microgliales *BV2*, lo que permite el uso de fibroína como regulador del comportamiento celular [69].

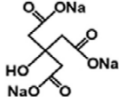
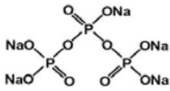
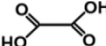
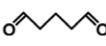
2.5.5 Entrecruzantes de quitosano

Ante soluciones de pH bajos ($\text{pH} < 4$), el quitosano se vuelve inestable, ya que la mayoría de sus grupos aminos sufren protonación, de manera que estas cadenas de polisacáridos con carga positiva se repelen al punto de disolver el quitosano. Para evitar esta disolución, sus cadenas pueden ser reticuladas covalente o iónicamente [70].

El reticulante covalente más común es el glutaraldehído, en este caso los grupos aldehídos reaccionan con los grupos amina primarios del quitosano formando un azometino irreversible. El entrecruzamiento iónico del quitosano ocurre en presencia de un entrecruzante con carga opuesta de manera que ocurre una atracción electrostática, de esta manera, cualquier compuesto químico que

posea al menos dos grupos funcionales que generen una carga negativa con el agua (ejemplo: $-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$) podrían reticular el quitosano. Algunos de estos entrecruzantes y sus características se observan en la *Tabla 1* [70].

Tabla 1. Características de algunos entrecruzantes de quitosano. Modificado de [70].

| Nombre | Fórmula estructural | Peso molecular (g/mol) | Carga iónica | pH óptimo de entrecruzamiento con el quitosano | Tipo de entrecruzamiento |
|-------------------------|---|------------------------|--------------------|--|--------------------------|
| Citrato trisódico |  | 258.07 | 3- | 4.75 | Iónico |
| Tripolifosfato de sodio |  | 367.86 | 5- | 7.22 | Iónico |
| Ácido oxálico |  | 90.03 | 2- | 6.72 | Iónico |
| Glutaraldehído |  | 92.52 | 2 grupos aldehídos | 7.18 | Covalente |

Lyn et al. [71], fabricaron películas de quitosano/grafeno, reticuladas con citrato trisódico o tripolifosfato de sodio, con posible aplicación como material de embalaje para comida y obtuvieron incrementos en la resistencia máxima de las películas sin grafeno y reticuladas con 3 % de citrato trisódico de 84.2 % y sin grafeno y reticuladas con tripolifosfato de sodio de 92.1 %. Frick et al. [72], produjeron películas biodegradables de quitosano para su aplicación como membranas o embalaje de alimentos, el quitosano fue disuelto en ácido acético o ácido láctico y entrecruzado con glutaraldehído y obtuvieron para las películas fabricadas con ácido acético y 2 % de glutaraldehído una disminución de la resistencia mecánica del 38.8 % contrario a lo que esperaban y parece que esto se debe a que el glutaraldehído es capaz de modificar la estructura del quitosano. Moghadas et al. [73], fabricaron apósitos de quitosano, para la curación de heridas, entrecruzados con ácido oxálico y obtuvieron un incremento de la resistencia mecánica del 21.8 %.

2.6 CONSIDERACIONES FINALES

Las estadísticas de las principales causas de muerte y de fallas en las intervenciones quirúrgicas de las ECV reflejan la necesidad de continuar investigando para abordar con mayor éxito el tratamiento y sobrevivencia de los pacientes. Los implantes vasculares comerciales disponibles presentan dificultades en su desempeño principalmente para vasos de menor calibre (<6 mm). Por ello muchos autores apuestan al uso de diversos polímeros para lograr mejorar las propiedades de los implantes existentes. En este capítulo se presentó la problemática existente y las alternativas de solución propuestas a través de conceptos teóricos que a su vez le brindan las herramientas necesarias al lector para desarrollar una perspectiva crítica de los procesos y fenómenos presentados en los siguientes capítulos.

2.7 REFERENCIAS

- [1] M. Latarjet and A. Ruiz Liard, "Parte XV-Vasos sanguíneos," in *Anatomía humana - Tomo II*, 5th ed., Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2019, pp. 905–919.
- [2] G. J. Tortora and B. Derrickson, "Capítulo 21. Aparato cardiovascular: Vasos sanguíneos y hemodinamia," in *Principios de Anatomía y Fisiología*, 15th ed., Mexico DC, Mexico: Editorial Médica Panamericana, 2018, pp. 737–808.
- [3] R. D. Lockhart, G. F. Hamilton, and F. W. Fyfe, *Anatomía humana*, 1st ed. McGraw-Hill, 2012.
- [4] K. Neubauer and B. Zieger, "Endothelial cells and coagulation," *Cell Tissue Res.*, vol. 387, no. 3, pp. 391–398, 2022, doi: 10.1007/s00441-021-03471-2.
- [5] Merck, "Bovine Aortic Endothelial Cells (BAOEC) Culture Protocol," Sigma-Aldrich, 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/sigma/b30405>.
- [6] G. L. Basatemur, H. F. Jørgensen, M. C. H. Clarke, M. R. Bennett, and Z. Mallat, "Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 16, no. 12, pp. 727–744, 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0227-9.
- [7] J. Shi, Y. Yang, A. Cheng, G. Xu, and F. He, "Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 319, no. 3, pp. H613–H631, 2020, doi: 10.1152/ajpheart.00220.2020.
- [8] Merck, "Human Aortic Smooth Muscle Cells: HAOSMC, fetal," Sigma-Aldrich, 2021. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/35405f?lang=en®ion=CO&cm_sp=I_nsite_-_caContent_prodMerch_gruCrossEntropy_-_prodMerch10-4.
- [9] M. K. Dick, J. H. Miao, and F. Limaiem, "Histology, Fibroblast," *Natl. Cent. Biotechnol. Inf.*, 2020, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/>.
- [10] Merck, "Human Dermal Fibroblasts: HDF," Sigma-Aldrich, 2021. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=hdf&interface=All&N=0&mode=match_partialmax&lang=en®ion=CO&focus=product.
- [11] G. Díaz-perera Fernández, C. Alemañy Díaz-perera, and E. Alemañy Pérez, "Enfermedades consecuentes de la aterosclerosis en población atendida por cuatro consultorios médicos," *Rev. Cubana Med.*, vol. 2022, no. 4, pp. 1–14, 2022.
- [12] A. Sidawy and B. Perler, *Rutherford's vascular surgery and endovascular therapy*. 2019.
- [13] G. R. Drummond, A. Vinh, T. J. Guzik, and C. G. Sobey, "Immune mechanisms of hypertension," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 8, pp. 517–532, 2019, doi: 10.1038/s41577-019-0160-5.

- [14] K. T. Mills, A. Stefanescu, and J. He, "The global epidemiology of hypertension," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 16, no. 4, pp. 223–237, 2020, doi: 10.1038/s41581-019-0244-2.
- [15] T. H. McConnell, "Chapter 2. Cellular Pathology: Injury, Inflammation, and Repair," in *The Nature of Disease. Pathology for the health professions*, Second Edi., 2014, pp. 16–42.
- [16] F. Le Noble and C. Kupatt, "Interdependence of Angiogenesis and Arteriogenesis in Development and Disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 7, 2022, doi: 10.3390/ijms23073879.
- [17] G. Guan *et al.*, "Hydrogel small-diameter vascular graft reinforced with a braided fiber strut with improved mechanical properties," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 5, 2019, doi: 10.3390/polym11050810.
- [18] F. O. Obiweluzor *et al.*, "Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review," *Cardiovasc. Eng. Technol.*, vol. 11, no. 5, pp. 495–521, 2020, doi: 10.1007/s13239-020-00482-y.
- [19] R. H. Liu, C. S. Ong, T. Fukunishi, K. Ong, and N. Hibino, "Review of Vascular Graft Studies in Large Animal Models," *Tissue Eng. Part B*, vol. 24, no. 2, 2018, [Online]. Available: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ten.teb.2017.0350>.
- [20] S.-G. Chen *et al.*, "Vascular Tissue Engineering: Advanced Techniques and Gene Editing in Stem Cells for Graft Generation," *Tissue Eng. Part B*, vol. 27, no. 1, 2021, [Online]. Available: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2019.0264>.
- [21] K. A. Guevara Noriega, A. Martinez Toiran, B. Álvarez Concejo, and J. L. Pomar, "Historical Overview of Vascular Allografts Transplantation," *Vasc. Endovasc. Rev.*, vol. 2, no. 1, 2019, [Online]. Available: <https://www.verjournal.com/articles/vascular-allografts-transplantation>.
- [22] J. H. Lawson, L. E. Niklason, and P. Roy-Chaudhury, "Challenges and novel therapies for vascular access in haemodialysis," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 16, no. 10, pp. 586–602, 2020, doi: 10.1038/s41581-020-0333-2.
- [23] F. Montini Ballarin, "Estructuras poliméricas nanofibrasas biorreabsorbibles para ingeniería de tejidos vasculares," Universidad Nacional de Mar del Plata, 2015.
- [24] S. Venkatraman, F. Boey, and L. L. Lao, "Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 853–874, 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.001.
- [25] J. Freeman, A. Chen, R. J. Weinberg, T. Okada, C. Chen, and P. H. Lin, "Sustained Thromboresistant Bioactivity with Reduced Intimal Hyperplasia of Heparin-Bonded Polytetrafluoroethylene Propaten Graft in a Chronic Canine Femoral Artery Bypass Model," *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 49, no. November 2017, pp. 295–303, 2018, doi: 10.1016/j.avsg.2017.09.017.
- [26] B. B. J. Leal, N. Wakabayashi, K. Oyama, H. Kamiya, D. I. Braghirolli, and P. Pranke, "Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, no. January, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2020.592361.
- [27] F. Hehrlein, M. Schleppe, F. Loskot, H. Scheld, P. Walter, and J. Mulch, "The use of expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts for myocardial revascularization," *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, vol. 25, no. 6, pp. 549–53, 1984.
- [28] I. E. Hadinata *et al.*, "Choice of Conduit for the Right Coronary System: 8-Year Analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes Trial," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 88, no. 5, pp. 1404–1409, 2009, doi: 10.1016/j.athoracsur.2009.06.010.
- [29] M. Amabili, P. Balasubramanian, G. Ferrari, G. Franchini, F. Giovannello, and E. Tubaldi, "Identification of viscoelastic properties of Dacron aortic grafts subjected to physiological

- pulsatile flow," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 110, no. February, p. 103804, 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103804.
- [30] R. J. Halbert, G. Nicholson, R. J. Nordyke, A. Pilgrim, and L. Niklason, "Patency of ePTFE Arteriovenous Graft Placements in Hemodialysis Patients: Systematic Literature Review and Meta-Analysis," *Kidney360*, vol. 1, no. 12, pp. 1437–1446, 2020, doi: 10.34067/kid.0003502020.
- [31] C. S. Ong, X. Zhou, C. Y. Huang, T. Fukunishi, H. Zhang, and N. Hibino, "Tissue engineered vascular grafts: current state of the field," *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 14, no. 5, pp. 383–392, 2017, doi: 10.1080/17434440.2017.1324293.
- [32] A. Goins, A. R. Webb, and J. B. Allen, "Multi-layer approaches to scaffold-based small diameter vessel engineering: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, no. December 2018, pp. 896–912, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.12.067.
- [33] J. Wu, C. Hu, Z. Tang, Q. Yu, X. Liu, and H. Chen, "Tissue-engineered Vascular Grafts: Balance of the Four Major Requirements," *Colloids Interface Sci. Commun.*, vol. 23, no. February, pp. 34–44, 2018, doi: 10.1016/j.colcom.2018.01.005.
- [34] R. K. Batra, "The Ethical Challenges of Stem Cell Therapy in Vascular Disorders," in *Stem Cell Therapy for Vascular Diseases*, 2021, pp. 105–114.
- [35] F. A. Fierro et al., "Mesenchymal stem/stromal cells genetically engineered to produce vascular endothelial growth factor for revascularization in wound healing and ischemic conditions," *Transfusion*, vol. 59, no. February, pp. 893–897, 2019, doi: 10.1111/trf.14914.
- [36] C. Li, F. Wang, G. Douglas, Z. Zhang, R. Guidoin, and L. Wang, "Comprehensive mechanical characterization of PLA fabric combined with PCL to form a composite structure vascular graft," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 69, pp. 39–49, 2017, doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.11.005.
- [37] Z. Cai et al., "Decellularization, cross-linking and heparin immobilization of porcine carotid arteries for tissue engineering vascular grafts," *Cell Tissue Bank.*, vol. 20, no. 4, pp. 569–578, 2019, doi: 10.1007/s10561-019-09792-5.
- [38] S. Deepthi, M. Nivedhitha Sundaram, P. Vijayan, S. V. Nair, and R. Jayakumar, "Engineering poly(hydroxy butyrate-co-hydroxy valerate) based vascular scaffolds to mimic native artery," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, no. 2018, pp. 85–98, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.077.
- [39] J. Liu, H. Zheng, P. S. P. Poh, H. G. Machens, and A. F. Schilling, "Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 7, pp. 15997–16016, 2015, doi: 10.3390/ijms160715997.
- [40] Y. Matsuzaki, K. John, T. Shoji, and T. Shinoka, "The evolution of tissue engineered vascular graft technologies: From preclinical trials to advancing patient care," *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 7, 2019, doi: 10.3390/app9071274.
- [41] M. A. Abdul Sisak, F. Louis, and M. Matsusaki, "In vitro fabrication and application of engineered vascular hydrogels," *Polym. J.*, vol. 52, no. 8, pp. 871–881, 2020, doi: 10.1038/s41428-020-0331-z.
- [42] N. Li et al., "Fabrication and Characterization of Pectin Hydrogel Nanofiber Scaffolds for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Vascular Cells," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 12, pp. 6511–6519, 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01178.
- [43] J. E. Barrera, J. A. Rodríguez, J. E. Perilla, and N. A. Algecira, "Estudio de la degradación térmica de poli (alcohol vinílico) mediante termogravimetría y termogravimetría diferencial thermogravimetry and differential thermogravimetry," *Rev. Ing. e Investig.*, vol. 27, no. 2, pp. 100–105, 2007.

- [44] G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, C. Spagnoli, and M. K. Cowman, "Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, no. 8, pp. 687–691, 2003, doi: 10.1023/A:1024907615244.
- [45] E. Marin, J. Rojas, and Y. Ciro, "A review of polyvinyl alcohol derivatives: Promising materials for pharmaceutical and biomedical applications," *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 8, no. 24, pp. 674–684, 2014, doi: 10.5897/AJPP2013.3906.
- [46] M. Aslam, M. A. Kalyar, and Z. A. Raza, "Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 58, no. 12, pp. 2119–2132, 2018, doi: 10.1002/pen.24855.
- [47] L. Kluyskens, P. Debieux, K. L. Wong, A. J. Krych, and D. B. F. Saris, "Biomaterials for meniscus and cartilage in knee surgery: state of the art," *J. ISAKOS*, vol. 7, no. 2, pp. 67–77, 2022, doi: 10.1136/jisakos-2020-000600.
- [48] O. Azhar, Z. Jahan, F. Sher, M. B. K. Niazi, S. J. Kakar, and M. Shahid, "Cellulose acetate-polyvinyl alcohol blend hemodialysis membranes integrated with dialysis performance and high biocompatibility," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 126, no. April, p. 112127, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112127.
- [49] H. Mohammadi, D. Goode, and K. Mequanint, "Proposed percutaneous aortic valve prosthesis made of cryogel," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 233, no. 5, 2019.
- [50] M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz, and B. D. Boyan, "A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 100 B, no. 5, pp. 1451–1457, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32694.
- [51] S. J. Najafi, A. A. Gharehaghaji, and S. M. Etrati, "Fabrication and characterization of elastic hollow nanofibrous PU yarn," *Mater. Des.*, vol. 99, pp. 328–334, 2016, doi: 10.1016/j.matdes.2016.02.111.
- [52] Z. Tan, H. Wang, X. Gao, T. Liu, and Y. Tan, "Composite vascular grafts with high cell infiltration by co-electrospinning," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 369–377, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.067.
- [53] J. Baranwal, B. Barse, A. Fais, G. L. Delogu, and A. Kumar, "Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 5, pp. 1–22, 2022, doi: 10.3390/polym14050983.
- [54] A. Shamloo et al., "Fabrication and evaluation of chitosan/gelatin/PVA hydrogel incorporating honey for wound healing applications: An in vitro, in vivo study," *Int. J. Pharm.*, vol. 592, no. November 2020, p. 120068, 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120068.
- [55] M. P. Arulmoorthy, G. Anbarasi, M. Srinivasan, and B. Vishnupriya, "Biosynthesis and characterization of chitosan based hydrogel: A potential in vitro wound healing agent," *Mater. Today Proc.*, no. xxxx, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.07.186.
- [56] Q. Chen et al., "Chitosan-PVA monodisperse millimeter-sized spheres prepared by electrospinning reduce the thromboembolic risk in hemorrhage control," *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 20, pp. 3686–3696, 2017, doi: 10.1039/c7tb00032d.
- [57] D. M. Escobar-Sierra and Y. P. Perea-Mesa, "Manufacturing and evaluation of chitosan, PVA and aloe vera hydrogels for skin applications," *DYNA*, vol. 84, no. 203, pp. 134–142, 2017, doi: 10.15446/dyna.v84n203.62742.
- [58] J. H. Sung et al., "Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan," *Int. J. Pharm.*, vol. 392, no. 1–2, pp. 232–240, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.024.

- [59] E. Szymańska and K. Winnicka, "Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications," *Marine Drugs*, vol. 13, no. 4. pp. 1819–1846, 2015, doi: 10.3390/md13041819.
- [60] J. Giraldo, "Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano," *Univ. Concepc.*, no. MAY, 2015, doi: 10.13140/RG.2.1.3350.9287.
- [61] C. Luo, Y. Zhao, X. Sun, and B. Hu, "Developing high strength, antiseptic and swelling-resistant polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for tissue engineering material," *Mater. Lett.*, vol. 280, p. 128499, 2020, doi: 10.1016/j.matlet.2020.128499.
- [62] D. Khatayevich et al., "Biofunctionalization of materials for implants using engineered peptides," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 12, pp. 4634–41, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.06.004.
- [63] R. Rodríguez-Rodríguez, H. Espinosa-Andrews, C. Velasquillo-Martínez, and Z. Y. García-Carvajal, "Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1080/00914037.2019.1581780.
- [64] T. Ren, J. Gan, L. Zhou, and H. Chen, "Physically crosslinked hydrogels based on poly (vinyl alcohol) and fish gelatin for wound dressing application: Fabrication and characterization," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 8, 2020, doi: 10.3390/POLYM12081729.
- [65] G. M. Simsek, J. B. C. Muller, G. B. M. N. E. Vrana, and G. G. Yapici, "PVA / gelatin - based hydrogel coating of nickel - titanium alloy for improved tissue - implant interface," *Appl. Phys. A*, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1007/s00339-021-04542-5.
- [66] S. Kim, H. Lim, S. Kim, and D. Y. Lee, "Effect of PVA Concentration on Strength and Cell Growth Behavior of PVA/gelatin Hydrogels for Wound Dressing," *J. Biomed. Eng. Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–7, 2020.
- [67] A. Marella, A. Lagazzo, F. Barberis, T. Catelani, R. Quarto, and S. Scaglione, "Enhanced mechanical performances and bioactivity of cell laden-graphene oxide/alginate hydrogels open new scenario for articular tissue engineering applications," *Carbon N. Y.*, vol. 117, pp. 608–616, 2017.
- [68] H. Zheng and B. Zuo, "Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, no. 5, pp. 1238–1258, 2021, doi: 10.1039/d0tb02099k.
- [69] R. Hou et al., "Structure and properties of PVA/silk fibroin hydrogels and their effects on growth behavior of various cell types," *Mater. Res. Express*, vol. 7, no. 1, 2020, doi: 10.1088/2053-1591/ab69c4.
- [70] T. Józwiak, U. Filipkowska, P. Szymczyk, J. Rodziewicz, and A. Mielcarek, "Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye," *React. Funct. Polym.*, vol. 114, pp. 58–74, 2017, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007.
- [71] F. H. Lyn, C. P. Tan, R. M. Zawawi, and Z. A. Nur Hanani, "Enhancing the mechanical and barrier properties of chitosan/graphene oxide composite films using trisodium citrate and sodium tripolyphosphate crosslinkers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 138, no. 26, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1002/app.50618.
- [72] J. M. Frick Pavoni, N. Z. dos Santos, I. C. May, L. D. Pollo, and I. C. Tessaro, "Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 2, pp. 981–1000, 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03140-4.

- [73] B. Moghadas, A. Solouk, and D. Sadeghi, "Development of chitosan membrane using non-toxic crosslinkers for potential wound dressing applications," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 9, pp. 4919–4929, 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03352-8.

CAPÍTULO 3.

FORMULACIONES DE LOS IMPLANTES DE PVA

3.1 INTRODUCCIÓN

Para el desarrollo del presente trabajo se eligió el polivinil alcohol (*PVA*) como materia prima para la producción de implantes celularizados, debido a sus propiedades es seguro para el cuerpo humano cuando se utiliza en la fabricación de dispositivos médicos, entre estas está no ser citotóxico, ni carcinogénico además de tener capacidad de hinchamiento y bioadhesividad lo que le permite adherirse a los tejidos biológicos [1].

Adicionalmente, es de fácil procesamiento ya que es soluble en agua y al formar hidrogeles puede ser reticulado mediante procesos físicos, sin la intervención de reactivos químicos que pongan en jaque sus propiedades biológicas [1].

Para la producción de los hidrogeles de *PVA* se seleccionaron tres factores principales: el peso molecular y el porcentaje de *PVA* w/v utilizado en la fabricación, además el número de ciclos de *C/D* a los que se somete el hidrogel para propiciar la reticulación física. Estos factores se eligieron con base en la literatura previa y se ajustaron a medida que se obtenían resultados experimentales. De esta manera, se logró una mejor comprensión de la relación entre los factores y las propiedades finales del hidrogel, permitiendo la optimización de las condiciones de fabricación.

Este capítulo plantea la hipótesis de que *es posible fabricar un hidrogel de PVA que pueda ser utilizado como sustrato para el desarrollo de un implante vascular*. En la sección de las pruebas exploratorias se determinó *cuáles eran las condiciones mínimas para fabricar un hidrogel de PVA como sustrato para el desarrollo de un implante vascular* a través de un primer acercamiento a la evaluación de la resistencia mecánica y a la determinación de la cinética de degradación de los hidrogeles de *PVA*. Los resultados obtenidos indicaron que además de ajustar los niveles de los factores para obtener propiedades más adecuadas para la aplicación deseada, también fue necesario replantear el proceso de fabricación de los hidrogeles, con el objetivo de mejorar sus características físicas.

En la segunda sección del capítulo se determinó *qué efecto tenía el porcentaje de PVA y el número de ciclos de C/D en el comportamiento del hidrogel de PVA*, implementado una serie de pruebas experimentales que abarca caracterización química, evaluación de la estabilidad y del comportamiento mecánico y biológico de los hidrogeles de *PVA*. Si bien, en general, los niveles de los factores no mostraron una diferencia significativa en los resultados obtenidos, se logró obtener propiedades mecánicas y de estabilidad adecuadas para su aplicación en el ámbito vascular respecto a la literatura. Sin embargo, se observó una limitación en cuanto a las propiedades biológicas de los hidrogeles, lo que se abordará en el siguiente capítulo.

De manera final, se presentan las conclusiones obtenidas en esta parte del trabajo, indicando que la resistencia mecánica máxima, la cinética de degradación y la capacidad de absorción no varió significativamente entre los tratamientos evaluados, pero al no permitir la adhesión celular se hizo necesario realizar una modificación de los hidrogeles.

3.2 PRUEBAS EXPLORATORIAS

Determinación del peso molecular del PVA

Se realizaron pruebas para determinar el peso molecular adecuado de PVA para la fabricación de hidrogeles. Se evaluaron disoluciones de PVA con tres pesos moleculares diferentes, con la variación de las condiciones de disolución como temperatura, tiempo y velocidad de agitación. Se usó PVA de grado analítico de marca Merck, los pesos moleculares evaluados fueron 13-23 KDa, 89-98 KDa y 130 KDa. La elección se basó en un criterio cualitativo, observando el proceso de disolución y reticulación del hidrogel. Los hidrogeles fabricados con PVA de menor peso molecular presentaron dificultades de gelificación tras varios ciclos de C/D, lo que limitaba su manipulación sin afectar su integridad. Los hidrogeles de mayor peso molecular no permitieron establecer un protocolo adecuado de disolución, ya que en ocasiones no se disolvían correctamente y formaban fases en la solución. Las variables están resumidas en la Tabla 1.

Se concluyó que *el PVA con peso molecular de 89-98 KDa era el más adecuado para la fabricación de los hidrogeles* y se decidió continuar utilizando PVA con ese peso molecular en el proceso de producción.

Tabla 1. Factores, niveles y variables respuesta involucrados en las pruebas exploratorias

| Factor inicial | Niveles | Variable respuesta | Conclusión |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Peso molecular | 13-23 KDa | Consistencia y facilidad de procesamiento (cualitativas) | Para las demás pruebas solo se utilizó el PVA de 89-98 KDa |
| | 89-98 KDa | | |
| | 130 KDa | | |
| Factor (Porcentaje de PVA) | Nivel (Número de ciclos de congelamiento/ descongelamiento) | | Código |
| 5 | 3 | | 5 – 3 |
| | 7 | | 5 – 7 |
| 10 | 3 | | 10 – 3 |
| | 7 | | 10 – 7 |
| Prueba | Variable respuesta | | Número de muestras |
| Tracción mecánica | Resistencia mecánica máxima | | 5 por tratamiento |
| Degradación hidrolítica | % de pérdida de masa | | 5 por tratamiento, por tiempo de exposición |

Determinación del porcentaje de PVA

Para determinar el porcentaje mínimo de PVA que puede generar diferencias significativas en las propiedades del hidrogel, se fabricaron probetas de PVA al 5 y 10 % w/v con respecto al agua destilada. Las variables están resumidas en la Tabla 1. El 10 % se eligió con base en los trabajos realizados por Bernal et al. [2] [3], y respecto a este se eligió un valor menor (5 %), con el objetivo de encontrar diferencias significativas. Se evaluaron la resistencia mecánica máxima con un ensayo de tracción y la cinética de degradación con un ensayo de degradación hidrolítica.

Las curvas promedio de esfuerzo vs deformación obtenidas en el ensayo de tracción son presentadas en la *Figura 1*, con las desviaciones estándar agrupadas cada 1 % de deformación de los dos porcentajes de PVA propuestos (5 y 10 %), cada uno con diferentes ciclos de C/D. Se observa que los mayores valores de esfuerzo a 16 % de deformación, se presentaron en las muestras con 10 % de PVA (líneas negras) con 9.8 y 4.4 kPa. El 16 % de deformación se elige para graficar las curvas con desviación estándar, porque es la deformación máxima de la probeta con menor valor de deformación, es decir, de todas las probetas evaluadas, se toma la que menor porcentaje de deformación final obtuvo y todas las curvas se promedian hasta este valor. El efecto del porcentaje de PVA en la resistencia mecánica máxima del hidrogel es estadísticamente significativo, con un 95 % de confianza.

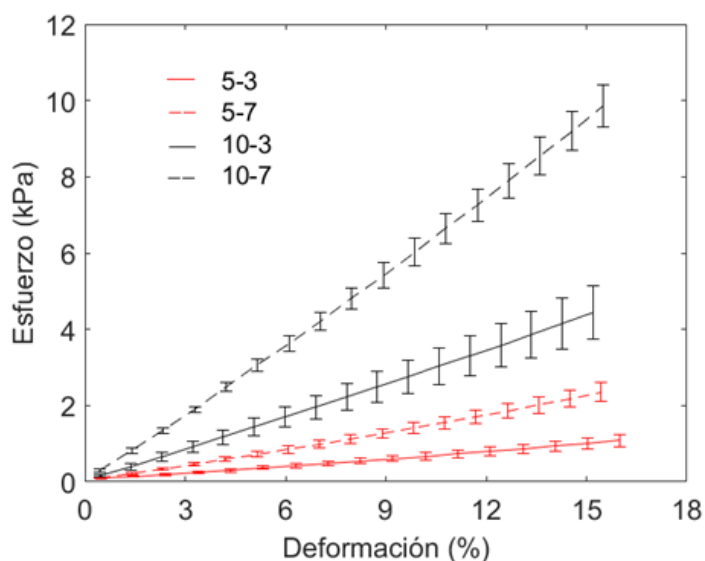


Figura 1. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error de desviación estándar promediadas cada uno por ciento de deformación. N=5

Las curvas de cinética de degradación obtenidas en el ensayo de degradación hidrolítica con desviaciones estándar son presentadas en la *Figura 2*, para muestras con los dos porcentajes de PVA propuestos (5 y 10 %), cada uno con diferentes ciclos de C/D. No se observan diferencias significativas en la cinética de degradación para ambos porcentajes de PVA, esto se confirmó con un análisis no paramétrico de Wilcoxon.

Se puede concluir, que existen diferencias significativas entre los porcentajes de PVA 5 % y 10 % en términos de la resistencia mecánica máxima del hidrogel, siendo mejor el comportamiento para el material 10-3 y 10-7; pero no en cuanto a la cinética de degradación. Con base en estos resultados, se

determinó que el porcentaje mínimo adecuado de PVA para la fabricación de un sustrato para el desarrollo de un implante vascular es del 10 %.

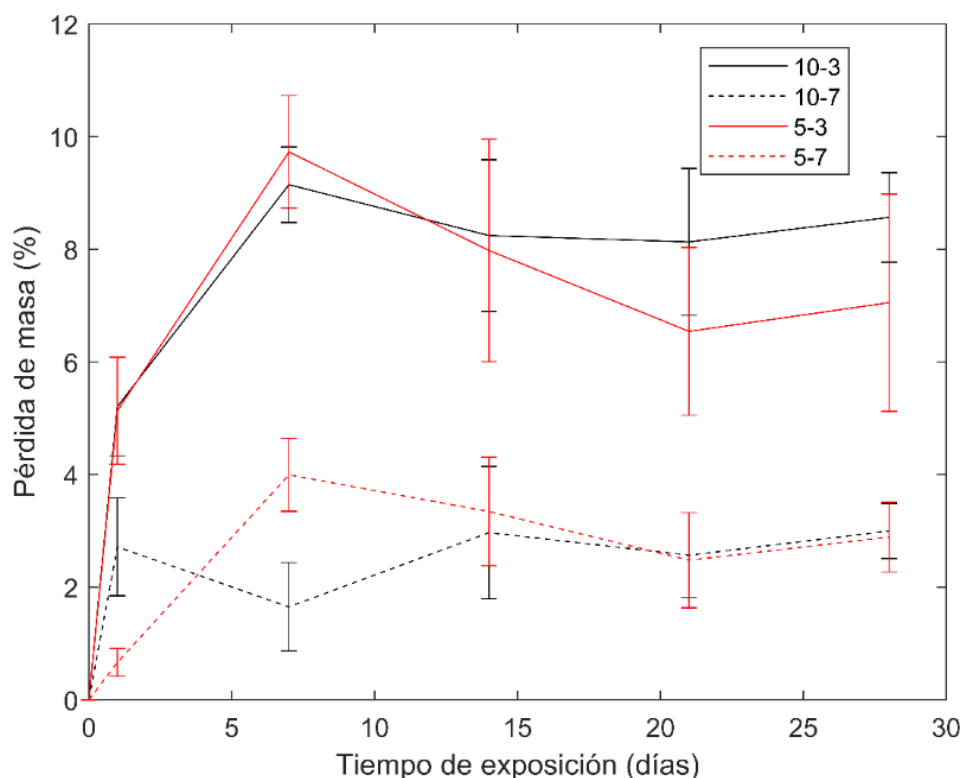


Figura 2. Gráfica de degradación hidrolítica de las muestras de PVA con 5 o 10 % de PVA y 3 o 7 ciclos de C/D. Las barras de error representan la desviación estándar. N=5

Determinación del número de ciclos de C/D

Para determinar el número de ciclos de C/D máximo que puede generar diferencias significativas en las propiedades del hidrogel, se realizaron probetas de PVA con 3 y 7 ciclos de C/D. Las variables están resumidas en la Tabla 1. Ambos valores se eligieron con el mismo criterio que los porcentajes de PVA presentados en el texto anterior y con las mismas curvas. Por lo tanto, y utilizando los mismos análisis se concluye que el mayor valor de esfuerzo a 16 % de deformación se presentaron en las muestras con 7 ciclos de C/D (líneas discontinuas) 9.8 y 2.3 kPa. El efecto del número de ciclos de C/D en la resistencia máxima del hidrogel es estadísticamente significativo con un 95 % de confianza. Mas no es significativo en las curvas de la cinética de degradación. Debido a esto, se eligió 7 ciclos de C/D como nivel mínimo de este factor en las siguientes etapas experimentales.

CONSIDERACIONES FINALES

El proceso de disolución y gelación permitió establecer que el peso molecular más adecuado del PVA para fabricar un hidrogel es de 89-98 KDa. Se observó que un peso molecular menor no permite una reticulación adecuada del hidrogel, mientras que un peso molecular mayor no se disuelve correctamente. En vista de estos resultados, se decidió continuar utilizando el peso molecular de 89-98 KDa para la fabricación del hidrogel que servirá como sustrato para el desarrollo de un implante vascular.

Los resultados de los ensayos mecánicos y de degradación de las pruebas exploratorias, permitieron determinar que el número de ciclos de *C/D* y el porcentaje de *PVA* tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la resistencia mecánica. Basándose en estos resultados, se decidió elegir un porcentaje de *PVA* del 10 % y 7 ciclos de *C/D* como los niveles mínimos necesarios para llevar a cabo las siguientes etapas experimentales en el desarrollo del hidrogel.

3.3 EFECTO DEL PORCENTAJE DE PVA Y EL NÚMERO DE CICLOS DE CONGELACIÓN EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL

3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Polivinil alcohol Mw 89 a 98 kDa, 99+% hidrolizado CAS 9002-89-5. Sigma-Aldrich, USA

Reactivos para fabricar PBS:

- Fosfato de sodio dibásico, anhidro, Na_2HPO_4 , CAS 7558-79-4, J.T.Baker™
- Cloruro de sodio cristal, NaCl , CAS 7647-14-5, J.T.Baker™
- Fosfato de potasio monobásico, cristal, H_2KPO_4 , CAS 7778-77-0, J.T.Baker™
- Cloruro de potasio, KCl , CAS 7447-40-7, Panreac™

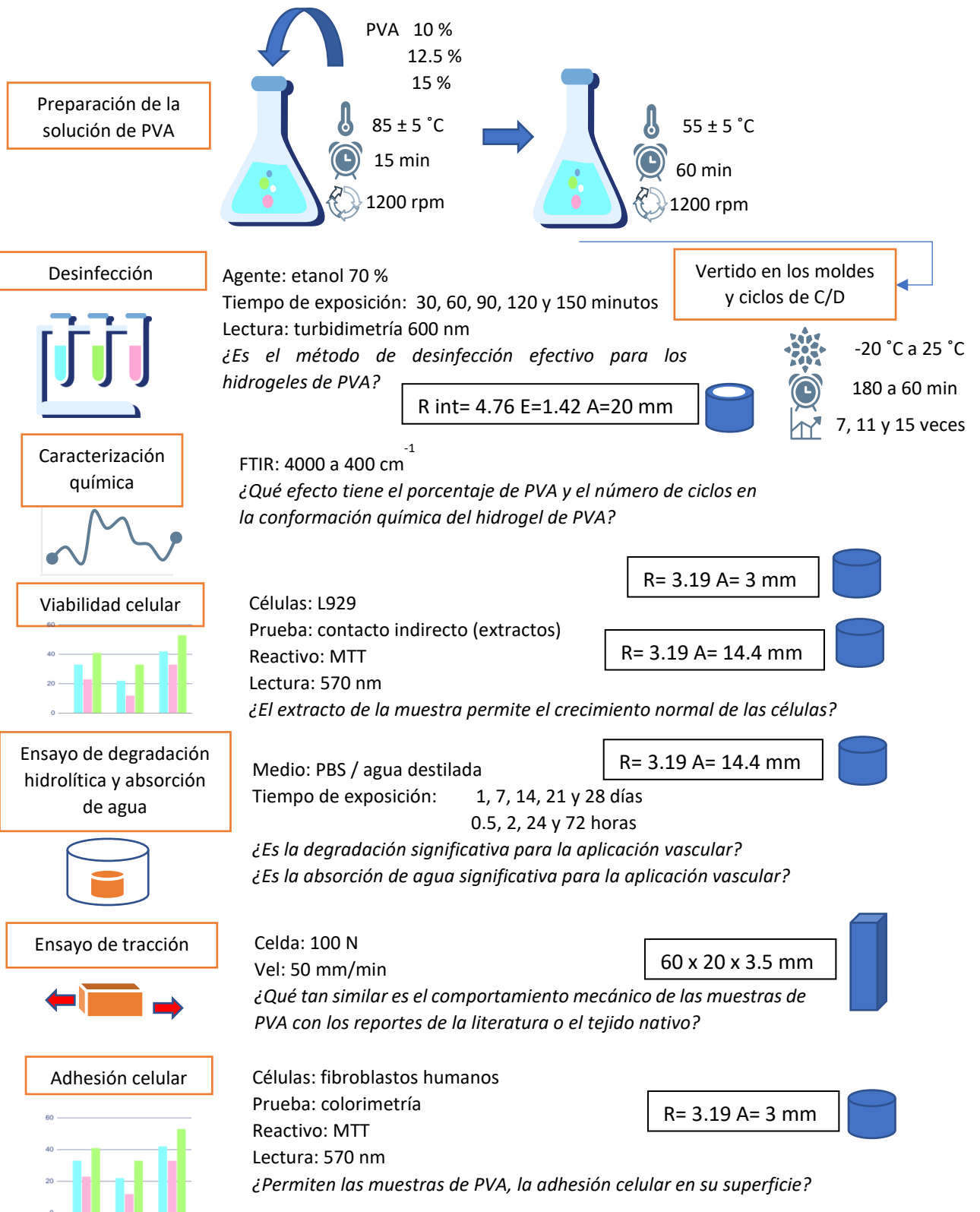
El resumen esquemático de la metodología se presenta en la *Figura 3*.

Preparación de las muestras

Las muestras de *PVA* se obtuvieron disolviendo *PVA* en agua para fabricar hidrogeles por el método *C/D* [4], se agregó 10, 12.5 o 15 % w/v de *PVA* con respecto al agua destilada, la solución fue llevada a baño termostático hasta alcanzar una temperatura externa de 85 ± 5 °C a 1200 rpm por 15 minutos y a una temperatura interna 50 ± 5 °C (de la solución de agua y *PVA*) por una hora. La solución fue vertida en un molde donde se dejó por aproximadamente 30 minutos hasta que las burbujas de aire desaparecieron y se empacó herméticamente para evitar la desecación de las muestras. Luego las muestras fueron sometidas a 7, 11 o 15 ciclos de *C/D*, donde un ciclo correspondió a permanecer -15 °C por tres horas y 25 °C por una hora. Una vez listas, las muestras se desmoldaron y se almacenaron en un ambiente sellado 4 °C.

Para las pruebas de la variación de los factores “*PVA*” y “ciclos”, se realizó un diseño factorial general de 3^2 , los niveles del factor “*PVA*” fueron 10 %, 12.5 % y 15 % w/v de *PVA* y los niveles del factor “ciclos” fueron 7, 11 y 15 ciclos de *C/D*, cada muestra recibió una marca de dos números, el primero correspondió al porcentaje de *PVA* y el segundo al número de ciclos de *C/D*. El *valor-n* depende del ensayo y está especificado en cada uno.

Las muestras utilizadas en las secciones de la 3.3.1.2 a la 3.3.1.6 fueron previamente desinfectadas como se describe en la sección 3.3.1.1



¿En qué medida tiene el porcentaje de PVA y el número de ciclos de C/D efecto en estas variables respuesta?

Figura 3. Esquema de la metodología del capítulo 3

3.3.1.1 Desinfección

El ensayo de desinfección se plantea como una alternativa a la esterilización (requerimiento de todo dispositivo médico implantable) que no afecta la integridad del hidrogel. Este ensayo se basó en la norma *MGA 0381* [5] y en el trabajo reportado por Huebsch [6]. Se utilizaron moldes tubulares de diámetro interno 4.76 mm, 1.42 mm de espesor y aproximadamente 20 mm de largo, con cinco muestras por tratamiento. Para realizar el ensayo se preparó un medio de cultivo *Luria-Bertani (LB)* con 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona en 1 L de agua destilada.

Las muestras (de un solo tratamiento: 10-7) se sometieron a un proceso de desinfección que consistió en sumergirlas en una solución de etanol grado analítico al 30 % por 15 minutos, luego la solución se incrementó a etanol al 50 % por 15 minutos y se repitió para 70 %, en 70 % las muestras se sometieron a diferentes tiempos de exposición: 30 – 60 – 90 – 120 minutos, y luego se inició un proceso de dilución del etanol, de manera que las muestras se sometieron a 15 minutos en etanol a 50 %, 15 minutos en etanol al 30 % y luego tres lavados con agua estéril durante 15 minutos en agitación. Una vez las muestras se desinfectaron se introdujeron cada una en 4 mL de medio *LB* y se incubaron a 250 rpm y 30 °C por 14 días. El medio fue revisado por inspección visual cada 24 horas hasta observar turbidez, una vez se observaba dicha turbidez, se leía la absorbancia del medio *LB* en un espectrofotómetro UV-vis a 600 nm.

Como segunda fase del experimento, se eligió un tiempo fijo de exposición a la solución de etanol al 70 % y se repitió el mismo proceso experimental para los nueve tratamientos establecidos en esta sección. Como controles se realizaron medidas de absorbancia del medio *LB* sin muestra (control -) y de medio *LB* con muestras sin desinfectar (control +).

Para el procesamiento de datos, se registraron los valores de absorbancia del medio *LB* de cada muestra, se determinó el porcentaje de turbidez con respecto al control positivo utilizando *la Ecuación 1* y se aceptaron las muestras dentro del límite instrumental de cuantificación (este es 10 veces la desviación estándar del control negativo), como muestras desinfectadas.

$$\text{Turbidez (\%)} = \frac{\text{Absorbancia muestra (nm)}}{\text{Promedio de la absorbancia del control positivo (nm)}} \times 100 \%$$

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de turbidez en la prueba de turbidimetría

Para trazar el histograma del porcentaje de turbidez se utilizó el software Matlab® con los datos de desviación estándar porcentual.

3.3.1.2 Caracterización química

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron para identificar los grupos funcionales del hidrogel de PVA producto del procesamiento, estos se realizaron con un equipo IR-Tracer 100 Shimadzu de los tratamientos esquina (estos corresponden a los niveles más bajos y altos de cada factor) y del polvo de *PVA*, en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹, para el

ensayo las muestras se prepararon extrayendo el exceso de agua con un paño y alcohol isopropílico (excepto para el polvo de PVA). Para el procesamiento de los datos se definió como línea base el mayor valor de transmitancia obtenidos en cada curva, finalmente los datos se normalizaron con respecto a la banda 3260 cm^{-1} y se graficaron en una curva intensidad vs número de onda.

3.3.1.3 Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular fue realizado para identificar si los hidrogeles de PVA inducen o no una respuesta citotóxica, para ello, el ensayo se realizó según la norma *ISO-10993* [7]. Se utilizaron muestras cilíndricas con un peso aproximado de 0.2 g cada una. El ensayo se hizo durante tres días, como sigue.

Día 1

Siembra de células: el ensayo inicia con un cultivo celular de células *L929* con confluencia del 80 % y un pase inferior a 14, cultivadas en un medio de cultivo DMEM-F12, suplementado con 10 % de SBF, 1 % de glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina, las células fueron retiradas del cultivo y sembradas en una concentración de 1×10^4 células por pozo en una placa de 96 pozos con 100 μL de DMEM-F12 suplementado (cada tratamiento por triplicado). Se agregaron tres pozos adicionales de solo DMEM-F12 suplementado como blanco. Los platos se incubaron 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de los extractos: para preparar los extractos se sumergieron las muestras en DMEM-F12 suplementado en relación 0.2 g de muestra / mL y se incubaron 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Adicionalmente se incubaron el control positivo C+ (polietileno) y el control negativo C- (caucho natural).

Día 2

Exposición de las células a los extractos: las células sembradas en los pozos fueron observadas en un microscopio óptico para verificar la adhesión y morfología de estas, luego el medio de cultivo celular fue retirado de los pozos y reemplazado por 100 μL de extracto de los controles o de las muestras a cuatro concentraciones diferentes (100, 75, 50 y 25 %), como se observa en la *Figura 4*. Los platos se incubaron por 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

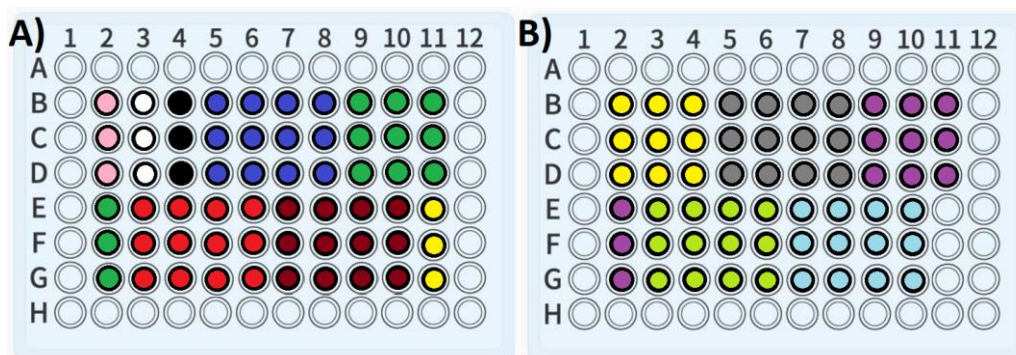


Figura 4. Esquema de deposición de los extractos. En rosa están los pozos "blanco", en blanco el C+, en negro el C- y los demás colores corresponden a las cuatro columnas de cada uno de los nueve tratamientos, estos tratamientos fueron: azul oscuro: 10-7, verde oscuro: 10-11, rojo: 10-15, magenta: 12.5-7, amarillo: 12.5-11, gris: 12.5-15, morado: 15-7, verde claro: 15-11 y azul claro: 15-15. Modificado del BLOG BALLYA

Día 3

Lectura de absorbancia: los extractos fueron retirados de los pozos y reemplazados por 50 μL de solución de MTT (1 mg/mL). Los platos fueron incubados en oscuridad a 37 °C por dos horas. Una vez incubados, se retiró el MTT y se realizó un lavado suave de cada pozo con 100 μL de lactato de Ringer, luego se depositaron 100 μL de isopropanol en cada pozo y fueron agitados en oscuridad a 75 rpm por 20 minutos, luego fueron leídas las absorbancias en un espectrofotómetro a 570 nm.

Para procesar los datos se promediaron los pozos “blanco” y este valor fue restado de cada uno de los demás pozos para eliminar el efecto del isopropanol en la lectura. Si la resta daba negativa se asumió cero. Se determinó el promedio de la absorbancia del control positivo y a partir de este valor se determinó el porcentaje de absorbancia de cada pozo, utilizando la absorbancia del C+ como el 100 % en la *Ecuación 2*. Estos resultados se graficaron en una gráfica de barras con su respectiva desviación estándar en Matlab®.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia del pozo}}{C +} \times 100 \%$$

Ecuación 2. Ecuación para determinar el porcentaje de viabilidad celular en la prueba de contacto indirecto por extractos

3.3.1.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua

Degradación hidrolítica

Este ensayo se realizó para determinar la cinética de degradación de los hidrogeles de PVA en un ambiente biológico simulado y por tanto determinar su grado de estabilidad, para ello se utilizó la norma ASTM F1635 [8]. Se utilizaron moldes cilíndricos con radio 3.19 mm y altura 14.4 mm. Se tomaron 20 muestras de cada tratamiento y se ordenaron en cuatro grupos de cinco muestras ($n=5$ debido a la variabilidad de la prueba) para cada uno de los tiempos de la prueba (1, 7, 14 y 21 días). Antes de iniciar el ensayo las muestras se secaron a 60 °C por 24 horas, luego se pesaron y se registró el dato como peso inicial. Para la prueba, se sumergieron las muestras en 10 mL de PBS y se incubaron a 37 °C, el PBS fue reemplazado cada 3 días. Una vez las muestras cumplieron con su tiempo de ensayo, se retiraron de la incubadora, el PBS se intercambió por agua destilada, y las muestras se sometieron a una agitación a 250 rpm por una hora para eliminar las sales, luego se retiró el agua, las muestras se secaron y pesaron en las mismas condiciones que al inicio del experimento, este peso se registró como peso final. Para el procesamiento de datos se halló el porcentaje de pérdida de peso con la *Ecuación 3*.

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100\%$$

Ecuación 3. Ecuación para determinar el porcentaje de pérdida de peso de las probetas

Para trazar la curva de porcentaje de pérdida de peso vs tiempo de exposición al PBS, se utilizó el software Matlab®, graficando también la desviación estándar porcentual.

Absorción de agua

Este ensayo se realizó para determinar la capacidad del hidrogel para conservar sus dimensiones geométricas en un ambiente acuoso, el ensayo se basó en la norma *ASTM D570* [9]. La fabricación de las muestras corresponde a la descrita en la sección 3.3.1 con un *valor-n* de 3. Se utilizaron moldes cilíndricos con radio 3.19 mm y altura 14.4 mm. Las muestras se pesaron antes del ensayo y fueron sometidas a un proceso de incubación a 25 °C en 15 mL de agua destilada y estéril, retiradas y pesadas a las 0.5, 2, 24 y 72 horas. Antes de cada pesaje, el exceso de agua fue retirado de las muestras con un paño absorbente. Para el procesamiento de datos se registraron todos los pesos y se determinó el porcentaje de masa del hidrogel después de la exposición con respecto a la masa inicial, con la *Ecuación 4*.

$$\text{Masa (\%)} = \text{Peso inicial} + \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100\%$$

Ecuación 4. Ecuación para determinar el porcentaje de masa de las probetas

Para trazar la curva de absorción de agua vs tiempo de cada tratamiento, se utilizó el software Matlab®, trazando los datos promedios con barras de error correspondientes a la desviación estándar. También se presenta un gráfico con los valores de absorción de cada tratamiento a los 0.5 horas de exposición.

3.3.1.5 Comportamiento mecánico

Este ensayo se realizó para identificar las propiedades mecánicas de los hidrogeles como respuesta a la tensión, para ello el ensayo se basó en la norma *ASTM D638* [10]. Se utilizaron moldes rectangulares de 60 x 20 mm con un espesor de 3.5 mm. Los ensayos mecánicos se realizaron por tracción en una máquina de ensayos universales Shimadzu® EZ Test serie EZ-LX/EZ-SX con una celda de 100 N a 50 mm/min hasta llegar al fallo. Los extremos de las muestras fueron recubiertos con cinta de teflón y ubicados en las mordazas, se registró la distancia entre estas como longitud inicial. Los datos fueron corregidos eliminando aquellos que pertenecían al ajuste de las mordazas y se determinó la elongación en porcentaje y el esfuerzo en kilo-Pascales utilizando los datos dimensionales tomados antes de los ensayos, para ello se utilizaron las *Ecuaciones 5 y 6*.

$$\text{Desplazamiento (\%)} = \frac{\text{Longitud final} - \text{longitud inicial}}{\text{longitud inicial}} \times 100\%$$

Ecuación 5. Ecuación para determinar la elongación de la probeta

$$\text{Esfuerzo (kPa)} = \frac{\text{Fuerza (N)}}{\text{Área trasnversal de la probeta (mm}^2\text{)}} \times 1000$$

Ecuación 6. Ecuación para determinar el esfuerzo ejercido sobre la probeta

Para trazar las gráficas de esfuerzo vs deformación, se utilizó el software Matlab®, interpolando los datos menores de 100 % de elongación (valor superior a la elongación fisiológica de las arterias [11]) en cada conjunto de datos y así tener la misma longitud de datos para hacer promedios punto a punto

de las probetas del mismo tratamiento. Se trazaron entonces las curvas promedio con barras de error, correspondientes a la desviación estándar cada uno por ciento de deformación.

El cálculo del módulo de Young incremental se realizó con la misma interpolación de los datos de la curva esfuerzo-deformación. Se calculó la pendiente entre cada punto a lo largo de la curva, hasta el 100 % de la elongación y se trazó la curva del valor incremental que se obtuvo, cada pendiente se calculó con la *Ecuación 7*. Las barras de error del módulo de Young se determinaron de la misma forma que para la curva esfuerzo-deformación.

$$Pendiente_{i-j} = \frac{Punto_{jen\ y}(kPa) - Punto_{i\ en\ y}(kPa)}{\left(Punto_{jen\ x}(mm) - Punto_{i\ en\ x}(mm)\right) / longitud\ inicial\ (mm)}$$

Ecuación 7. Ecuación para el cálculo del módulo de Young entre dos puntos

3.3.1.6 Adhesión celular

Los ensayos colorimétricos permiten determinar el número de células usando lectores de absorbancia. En particular, los métodos basados en la reducción de sales de tretazolio, se basan en la capacidad de las células de metabolizar estas sales en formazán, el cual es un compuesto azul-violeta cuya absorbancia puede ser medida y correlacionada con el número de células presentes en el ensayo [12].

Este ensayo se realizó para determinar el grado de adhesión celular que permiten los hidrogeles de PVA en su superficie, para realizar el ensayo, se depositaron cinco muestras cilíndricas (más los controles: pozos A, B y C) con radio 3.19 mm y altura 3 mm en un plato de cultivo de 96 pozos, luego se sembraron 3×10^3 fibroblastos humanos de cultivo primario por muestra en 20 μ L de DMEM suplementado (para evitar el deslizamiento de las células al fondo del pozo) y el plato se incubó a 37 °C por cuatro horas, luego se agregó el medio restante para completar 100 μ L por pozo y se continuó la incubación hasta completar 24 horas. Una vez finalizado este tiempo, el medio se retiró del pozo (D), luego las muestras se retiraron de los pozos y se depositaron en pozos nuevos (E) (para verificar que las células no hubieran migrado al fondo del pozo), finalmente todos los pozos (con o sin muestra) se lavaron suavemente con 100 μ L de Lactato de Ringer (para aclaración de este proceso ver *Figura 5*). Después se realizó la exposición a MTT (1 mg/mL), agregando 50 μ L en todos los pozos del experimento. El plato se agitó a 75 rpm por dos horas, luego se retiró la solución de MTT y se agregaron 100 μ L de isopropanol y se continuó con la agitación por 30 minutos. El esquema de la ubicación de las muestras en los pozos del experimento se presenta en la *Figura 6*.

Adicionalmente se utilizaron tres tipos de controles, los pozos “blanco” (A) sin muestras y sin células, el control positivo que consistió en la siembra de las células en el fondo de un pozo sin presencia de PVA (B) y los controles de las muestras consistieron en probetas de PVA expuestas al medio de cultivo y a todo el proceso de MTT sin presencia de células (C). Finalmente se retiraron las muestras de PVA y se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm.

Para procesar los datos se realizó el mismo proceso descrito en la sección 3.3.1.3 y la *Ecuación 2*.

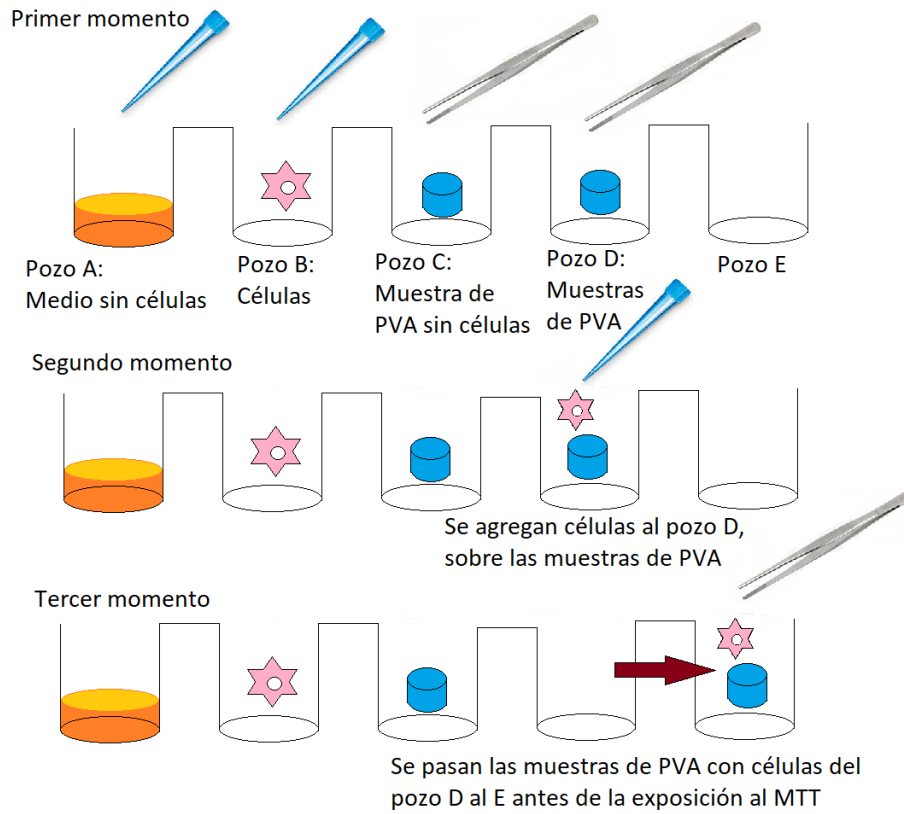


Figura 5. Preparación del plato de 96 pozos en el experimento de adhesión celular por colorimetría, sintetizado en tres momentos

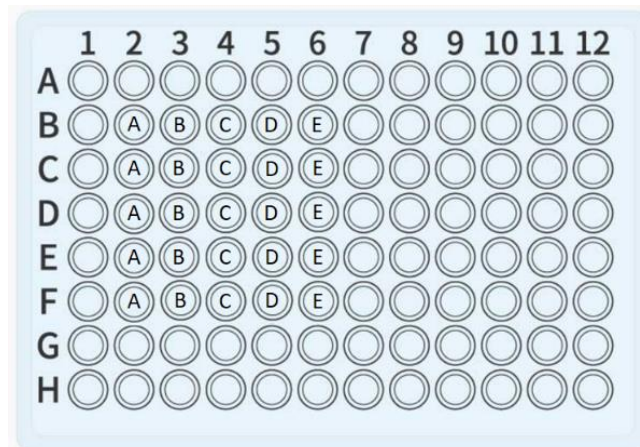
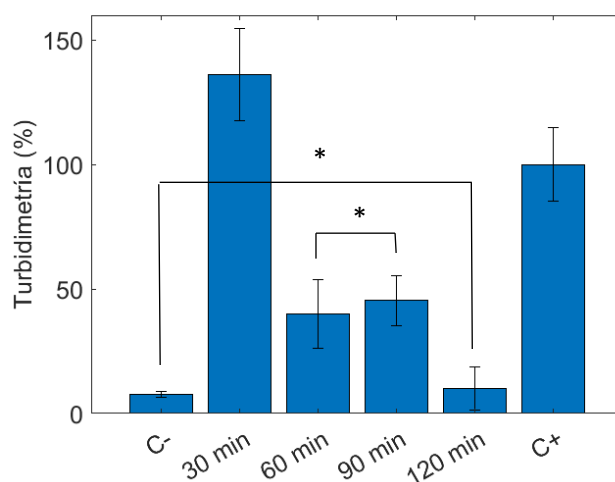


Figura 6. Esquema de la ubicación de las variaciones experimentales en la prueba de adhesión celular por colorimetría

3.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.2.1 Desinfección

En la *Figura 7* se presenta la gráfica de barras del porcentaje de turbidimetría de un solo tratamiento (10-7), sometido a diferentes tiempos de desinfección, se utilizó un solo tratamiento para definir el tiempo necesario para la desinfección efectiva antes de realizar la desinfección en todos los tratamientos. Se observa que para 30 minutos de exposición el porcentaje de turbidimetría es el más alto, para los tiempos mayores el porcentaje de turbidimetría desciende. Solo para el tiempo de exposición de 120 minutos a la concentración del 70 % se obtuvo valores de turbidimetría por debajo de 10 veces la desviación estándar del control negativo.



*Figura 7. Porcentaje de turbidimetría del medio LB en contacto con muestras de PVA 10-7 desinfectadas con diferentes tiempos de exposición. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.*

Una vez obtenidos estos resultados y dado que no se conoce el comportamiento de la variable respuesta entre 90 y 120 minutos de exposición a la solución de etanol al 70 %, en la segunda fase del experimento se fijó un tiempo de 150 minutos para asegurar que todos los puntos experimentales sean efectivos en el proceso de desinfección.

En la *Figura 8* se presenta la gráfica de barras del porcentaje de turbidimetría de todos los tratamientos de esta sección experimental, expuestos a un proceso de desinfección con 150 minutos en etanol al 70 %, se observa que todos los tratamientos presentan porcentajes de turbidimetría inferiores al valor de 10 veces la desviación estándar del control negativo, *probando la eficacia del método de desinfección para estos tipos de hidrogeles.*

Debido a la naturaleza del hidrogel, este no puede ser sometido a procesos de esterilidad que involucren gas o calor [13][14], por ello, algunos investigadores [13][14][15] han preferido el uso de etanol para realizar una desinfección eficiente del hidrogel, entre ellos Huebsch et al. [6], cuyo protocolo fue utilizado como base para el desarrollo del proceso de desinfección del presente trabajo.

Huebsch et al. [6], realizaron un análisis de protocolos de desinfección a hidrogeles modificados con péptidos, utilizando como métodos de esterilización etanol al 70 % y radiación UV. Para ello inocularon los hidrogeles con *E. coli* previo al proceso de esterilización y posteriormente midieron el crecimiento del microorganismo con turbidimetría. En los resultados hallaron que la radiación UV no es suficiente para evitar el crecimiento microbiano, además de generar procesos de degradación en los péptidos que inmovilizaron en los hidrogeles, contrario a esto, la exposición a etanol al 70 % no generó daños en el hidrogel y evitó el crecimiento microbiano.

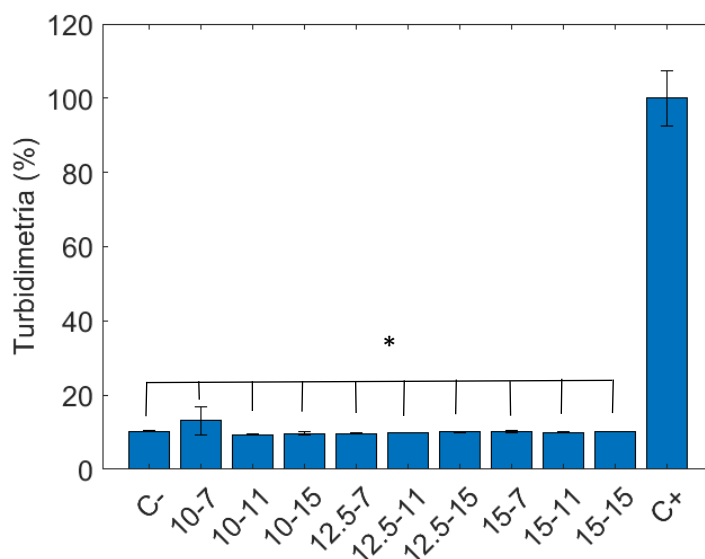


Figura 8. Porcentaje de turbidimetría del medio LB en contacto con muestras de PVA 10-7 desinfectadas con diferentes tiempos de exposición. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.

3.3.2.2 Caracterización química

En la *Figura 9* se observa el espectro de FTIR del hidrogel de PVA 10-7 y del polvo de PVA, se utilizó un solo tratamiento para comparar la naturaleza química del PVA en polvo (antes del procesamiento) y en hidrogel (después del procesamiento). La gran banda alrededor 3300 cm^{-1} corresponde al estiramiento de la molécula O-H [16]. La banda alrededor de los 2900 cm^{-1} se asocia con el enlace C-H presente en las cadenas poliméricas y los puentes de hidrógeno formados en los hidrogeles. Sin embargo, las curvas no demuestran que el hidrogel tenga más puentes de hidrógeno que el polvo [17]. No obstante, se puede observar una banda distintiva en los hidrogeles de PVA en 1100 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento de C-O. *Esta banda es un indicativo del nivel de cristalinidad presente en el hidrogel, generado por la formación de puentes de hidrógeno, que es significativamente mayor en el hidrogel [17], lo cual es esperado ya que en la formación del hidrogel ocurren procesos de entrecruzamiento que aumentan el grado de cristalinidad.* Se observan también dos bandas entre 1300 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} correspondientes a la flexión de CH_2 .

En la *Figura 10* se observan los espectros correspondientes a los cuatro tratamientos esquina, para observar el efecto de los niveles extremos de cada factor, donde se confirma la presencia de las mismas bandas en todos los tratamientos, la banda ubicada alrededor de 1100 cm^{-1} da cuenta de la cristalinidad del hidrogel y como se observa en la *Figura 10* no se ve una tendencia clara de los ciclos

de C/D o el porcentaje de PVA en esta cristalinidad. Parece ser que no hay un efecto de los niveles de los factores en estas propiedades del hidrogel.

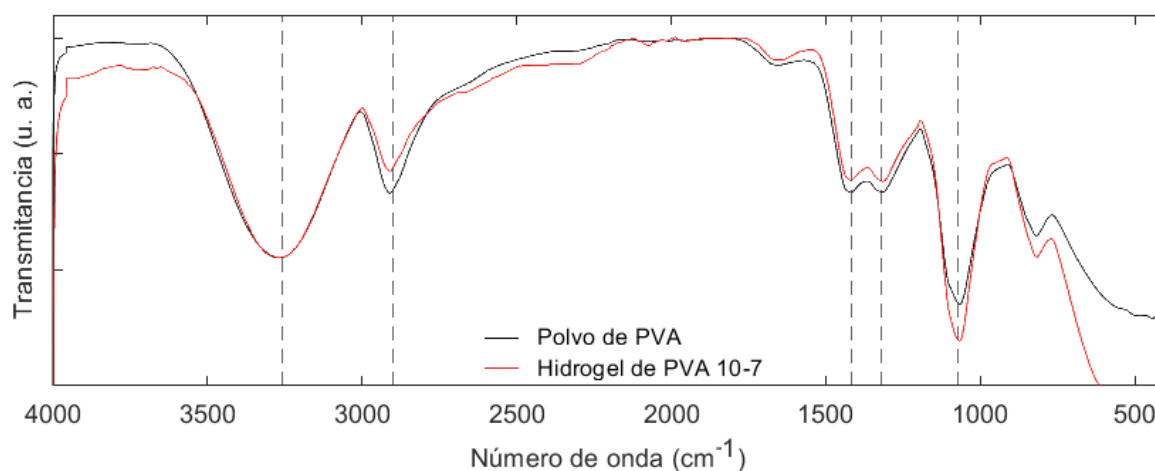


Figura 9. Espectro FTIR de PVA en polvo y procesado como hidrogel del tratamiento 10-7. N=1.

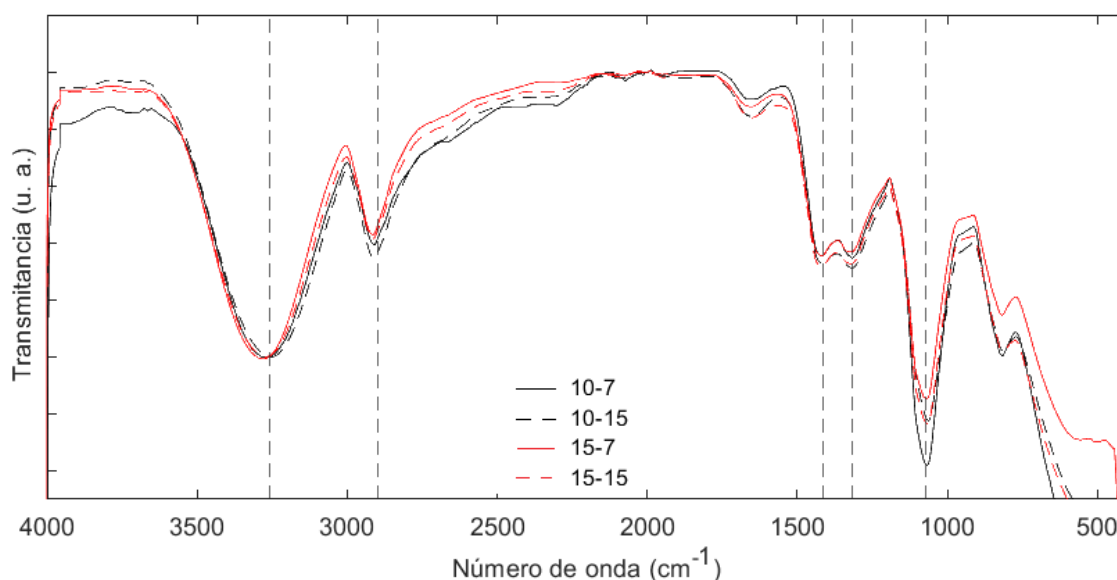


Figura 10. Espectro FTIR de PVA procesado como hidrogel de los tratamientos esquina. N=1.

3.3.2.3 Viabilidad celular

En la *Figura 11* se muestra el porcentaje de viabilidad de las células *L929* después de ser expuestas durante 24 horas a los extractos de los hidrogeles. Se observa que las muestras que contienen 7 ciclos de C/D presentan una viabilidad celular superior al 70 %.

La tendencia de la viabilidad celular no es clara, sin embargo, parece que a mayor porcentaje de PVA y mayor número de ciclos de C/D se presenta una mayor respuesta citotóxica. Durante el experimento se observó acidificación de los extractos en presencia del PVA, esto puede deberse al proceso de hidrólisis que ocurre en las moléculas de acetato de vinilo presentes en el PVA parcialmente hidrolizado, esta hidrólisis libera moléculas ácidas en una reacción reversible que pueden acidificar el pH del medio de cultivo del extracto de PVA [18]. Sin embargo, el PVA fue aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)* para producir dispositivos médicos debido a su propiedad bioinerte, por

ello muchos investigadores asumen que el PVA es citocompatible y no suelen realizar pruebas de citotoxicidad [18][19][20][21].

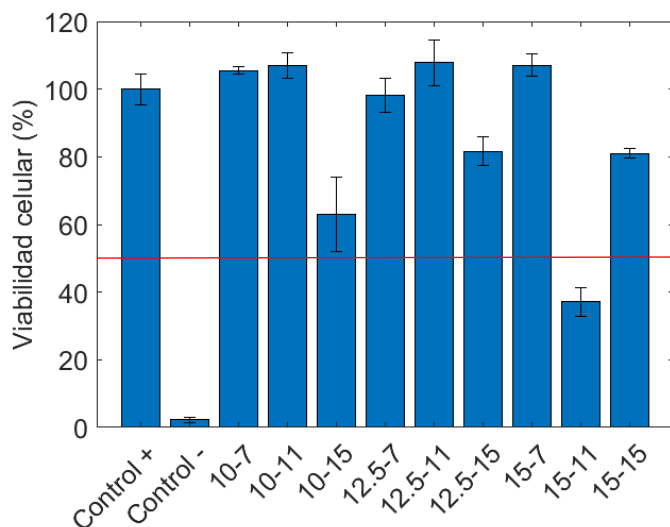


Figura 11. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, se compararon las medias de los factores con Wilcoxon sin evidencia de diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, no hay comparación de tratamiento a tratamiento.

Se observó que la variable respuesta no sigue una distribución normal, lo cual impide realizar un análisis de ANOVA. Por lo tanto, se optó por utilizar la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar las medianas de una hipotética viabilidad celular inicial del 100 % y la viabilidad final obtenida después de la prueba. La prueba arrojó un *valor-p* mayor a 0.05 lo que indica que con una confianza de 95 % que no existen diferencias significativas entre las medias evaluadas. Sin embargo, en la Figura 12 al comparar la posición de las medias en el diagrama de cajas y bigotes, se observa que existe una tendencia de que a mayor porcentaje de PVA y mayor número de ciclos de C/D disminuye la viabilidad celular.

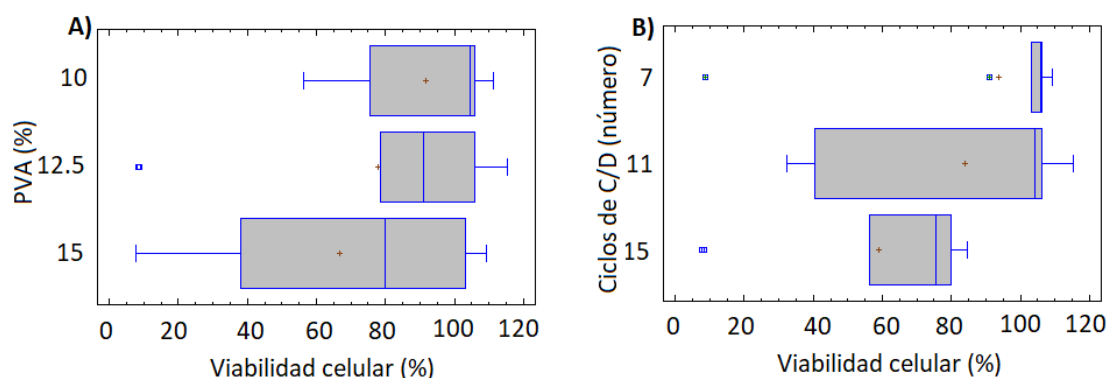


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución los datos de porcentaje de viabilidad celular con respecto a: A) porcentaje de PVA y B) número de ciclos de C/D

La disminución de la viabilidad celular con el incremento del porcentaje de PVA se puede explicar por la presencia de moléculas de acetato de vinilo, que al hidrolizarse acidifican el medio y afectan la viabilidad celular. Si bien se espera que a mayor número de ciclos ocurra menos liberación del material al medio y mayor estabilidad, se está presentando un efecto negativo del número de ciclos de C/D

sobre la viabilidad celular, Gupta et al. [16], indican que existen números de ciclos donde ocurren desestabilizaciones de la estructura cristalina, la cual está directamente relacionada con la estabilidad de la integridad del material, también mencionan que, a mayores valores de porcentaje de PVA, es más probable que ocurran enredos en las cadenas poliméricas que actúan como inhibidores del plegamiento de las cadenas, e impiden que ocurra el entrecruzamiento de las mismas en los ciclos de C/D. Esto podría explicar la relación inversa que se observa en la *Figura 12 B)* de la viabilidad celular vs el número de ciclos de C/D.

Después de analizar los resultados, se concluye que *no hay evidencia de que los factores evaluados afecten la viabilidad celular*. Sin embargo, es importante destacar que para esta prueba existe un umbral de aceptación de muestras con una viabilidad celular superior al 70 %. En consecuencia, *se descartaron las muestras 10-15 y 15-11 debido a que su viabilidad celular fue inferior al valor establecido*.

3.3.2.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua

A pesar de que las muestras 10-15 y 15-11 se descartaron en el ensayo anterior, fueron incluidas en este apartado, para determinar el efecto que tienen los factores en la cinética de degradación y la capacidad de absorción de agua de las muestras.

La pérdida de masa de los hidrogeles de PVA en soluciones acuosas se debe a dos mecanismos, el primero corresponde a un proceso de hidrólisis que ocurre en las moléculas de acetato de vinilo presentes en el PVA parcialmente hidrolizado como se observa en la *Figura 13*, sin embargo, el PVA utilizado en la investigación es + 99 % hidrolizado, por lo tanto, esta pérdida solo representa un pequeño porcentaje del fenómeno observado [18]. El segundo mecanismo puede corresponder con el desprendimiento del material, perteneciente a cadenas poliméricas pobremente o no-entrecruzadas, ya que la zona hidrolizada del PVA no es degradable en soluciones acuosas.

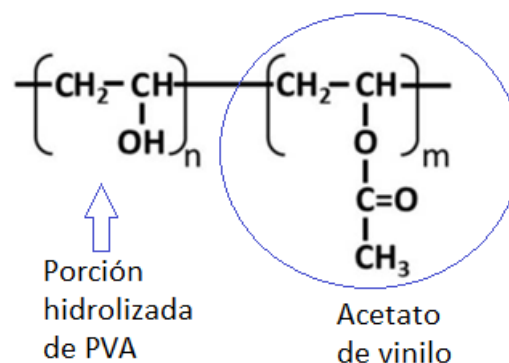


Figura 13. Formula química del PVA parcialmente hidrolizado, donde se observa una molécula de acetato de vinilo no hidrolizada. Modificado de [26].

Las curvas en la *Figura 14* muestran que, en la prueba de degradación, todos los hidrogeles experimentaron una pérdida significativa de masa cercana al 5 %, presentándose en un corto período al comienzo de la exposición al PBS. Esta pérdida de masa parece corresponder a la liberación de cadenas poliméricas que no se entrecruzaron en la red polimérica, durante los ciclos de C/D o a desprendimientos del material. Para los hidrogeles de PVA del 12.5 % y 15 %, se observa claramente

una "recuperación de masa", puesto que los valores descienden para el día 1. La "recuperación de masa" puede deberse a que los hidrogeles de *PVA* incorporan sales de PBS en su estructura en agua libre (por ejemplo, Negishi et al. [22], reporta gráficas con el mismo fenómeno). La incorporación de sal se debe a la difusión de las sales a través del hidrogel de *PVA*.

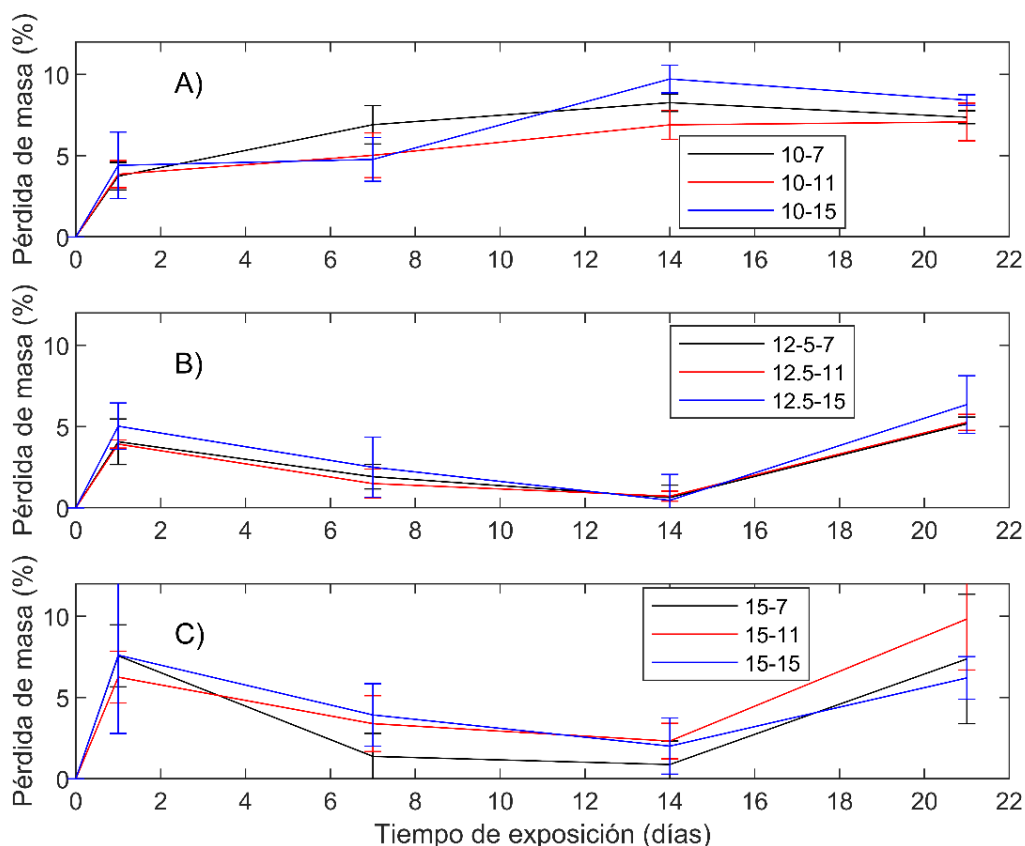


Figura 14. Gráfica de degradación hidrolítica de las muestras de *PVA* con 10, 11 o 15 % de *PVA* y 7, 11 o 15 ciclos de *C/D*. $N=5$, las barras de error representan la desviación estándar.

La estabilidad de los hidrogeles parece depender más del porcentaje de *PVA* que del número de ciclos de *C/D*. Para una mayor cantidad de *PVA* en el hidrogel, se dan más enlaces de hidrógeno en la red polimérica. Sin embargo, el entrecruzamiento depende de la formación de zonas pobres en polímeros durante los ciclos de *C/D*, que empujan una cadena polimérica contra la otra para inducir la formación de enlaces de hidrógeno [23]. Por lo tanto, los porcentajes más altos de *PVA* en los hidrogeles pueden generar áreas pobres en polímero pequeñas o pocas y, en consecuencia, menos enlaces de hidrógeno.

En el análisis ANOVA solo el porcentaje de *PVA* mostró un efecto significativo sobre la variable respuesta, donde el nivel 12.5 % fue el que presentó menor degradación, sin embargo, debido a los fenómenos de recuperación y pérdida de masa a lo largo del tiempo parecen indicar que no hay una diferencia significativa real entre los factores.

Autores como Negishi et al. [22], descubrieron que la pérdida de masa principal ocurrió en los primeros 10 minutos al utilizar hidrogeles de 12.6 % de *PVA* y 8 ciclos de *C/D*. En el ensayo actual, se obtuvo una pérdida de masa mayor en el primer periodo, que correspondió a 24 horas. Parece ser que en rangos de porcentaje de *PVA* y ciclos de *C/D* más amplios a los evaluados en esta sección, influyen en la estabilización de la pérdida de masa ya que, en las pruebas exploratorias, se trabajaron con

porcentajes de PVA de 5 y 10 % y ciclos de C/D de 3 y 7, y solo se observó estabilidad entre los días 7 y 14 del experimento [22].

Al igual que en el trabajo de Boran [24] no es apreciable un efecto del número de ciclos de C/D en la variable respuesta, podría pensarse que es necesario comparar mayores números de ciclos para observar el efecto, sin embargo, autores como Gupta et al. [16], han evaluado 15, 30 y 45 ciclos y tampoco encontraron una tendencia continua de este factor en la conformación del hidrogel.

En los mayores porcentajes de PVA evaluados (12.5 y 15 %) se observa una aparente recuperación de masa, hecho que no ocurrió en el trabajo de Ekasurya et al. [25] y solo es sutilmente apreciable en el trabajo de Negishi et al. [22] en el cual la recuperación de masa parece pertenecer a una variación estadística de los datos. Esta recuperación de masa posiblemente concuerda con el fenómeno de deposición de sales del medio en el hidrogel.

Absorción de agua

En la *Figura 15* se presentan las curvas de cambio de masa en porcentaje, para las muestras sometidas al ensayo de absorción de agua. Todas las muestras presentaron una pérdida de masa a partir de las 24 horas, debido a que los fenómenos de degradación ocurrieron en conjunto con la absorción de agua. Para observar el fenómeno de absorción a un tiempo fijo de 30 minutos se trazó la gráfica de la *Figura 16*.

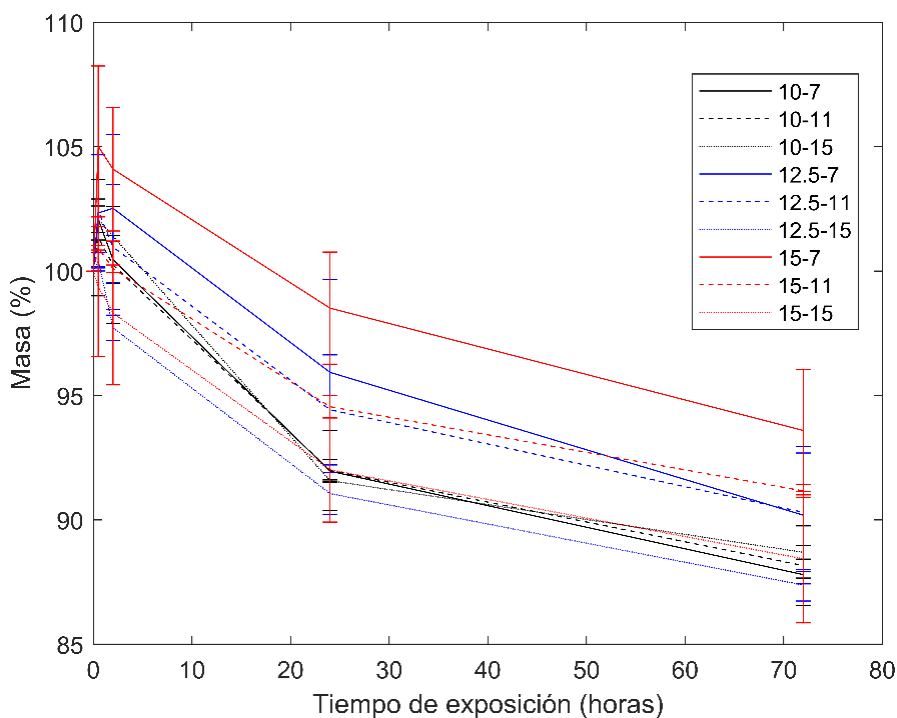


Figura 15. Gráfico de masa vs tiempo de exposición en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar.

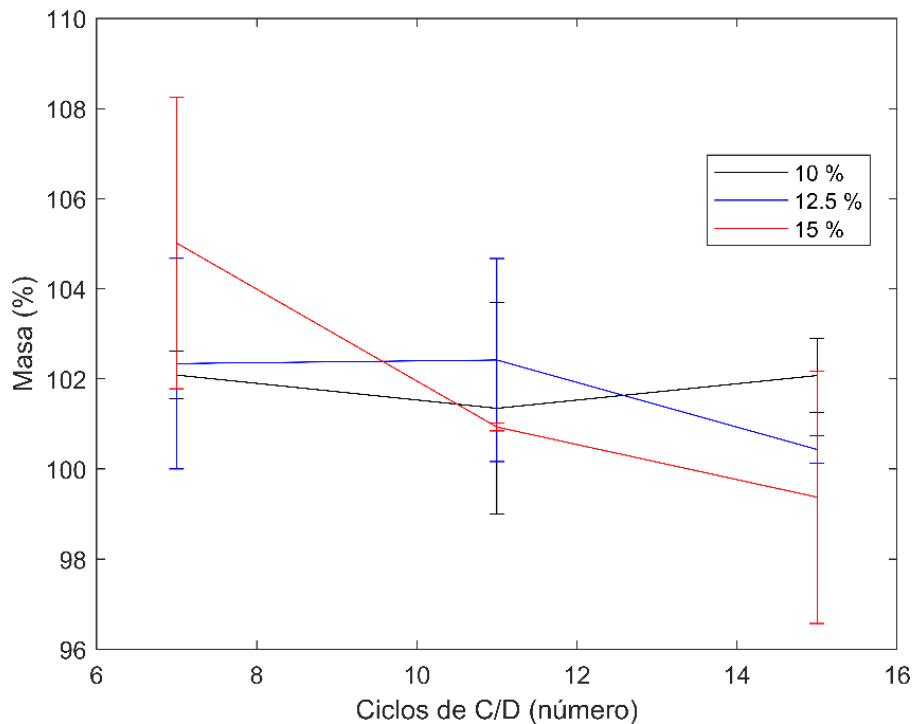


Figura 16. Porcentaje de masa de muestras con 30 minutos de exposición en el ensayo de absorción de agua. $N=3$, las barras de error representan la desviación estándar.

En la Figura 16 se observa que para las muestras de 12.5 y 15 % de PVA, el peso de la muestra fue mayor conforme tenía menos ciclos de C/D, los cuales corresponde a 100.43 ± 0.30 , 102.42 ± 2.25 y 102.34 ± 2.34 para 12.5 % de mayor a menor ciclo y 99.37 ± 2.80 , 100.93 ± 0.09 y 105.01 ± 2.23 para 15 %, este fenómeno ocurre porque un mayor número de ciclos de C/D incrementa la presencia de puentes de hidrógeno que entrecruzan las cadenas poliméricas del hidrogel y restringen el paso de agua libre [16]. Sin embargo, el ANOVA realizado con los datos recogidos a los 30 minutos arrojó que estadísticamente ningún factor tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta.

Gupta et al. [16], también midieron la capacidad de absorción de agua de sus hidrogeles, observaron que la capacidad de absorción decrece con el incremento del entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, el cual está asociado con un mayor porcentaje de PVA y mayor número de ciclos de C/D; esto debido a que el entrecruzamiento previene la entrada de moléculas de agua [16].

Las diferencias estadísticas en los datos de degradación parecen irrelevantes cuando se observa el fenómeno a lo largo del tiempo, esto sumado a los resultados obtenidos en la prueba de absorción permiten concluir que *los factores no tienen un efecto significativo en la degradación y absorción del material.*

3.3.2.5 Comportamiento mecánico

Para evaluar el efecto de los factores en el comportamiento mecánico, se incluyeron todas las muestras, incluso las que son citotóxicas (10-15 y 15-11).

En la Figura 17 se presentan las curvas de tracción de los tratamientos agrupados por número de ciclos de C/D y debajo de cada gráfica se presenta el módulo de Young incremental, hasta el 100 % de

elongación. Se observa que las muestras con 7 y 15 ciclos de C/D y 15 % de PVA presentan los mayores valores de resistencia mecánica al 100 % de elongación, pero no hay una diferencia clara entre las muestras de 10 y 12.5 %.

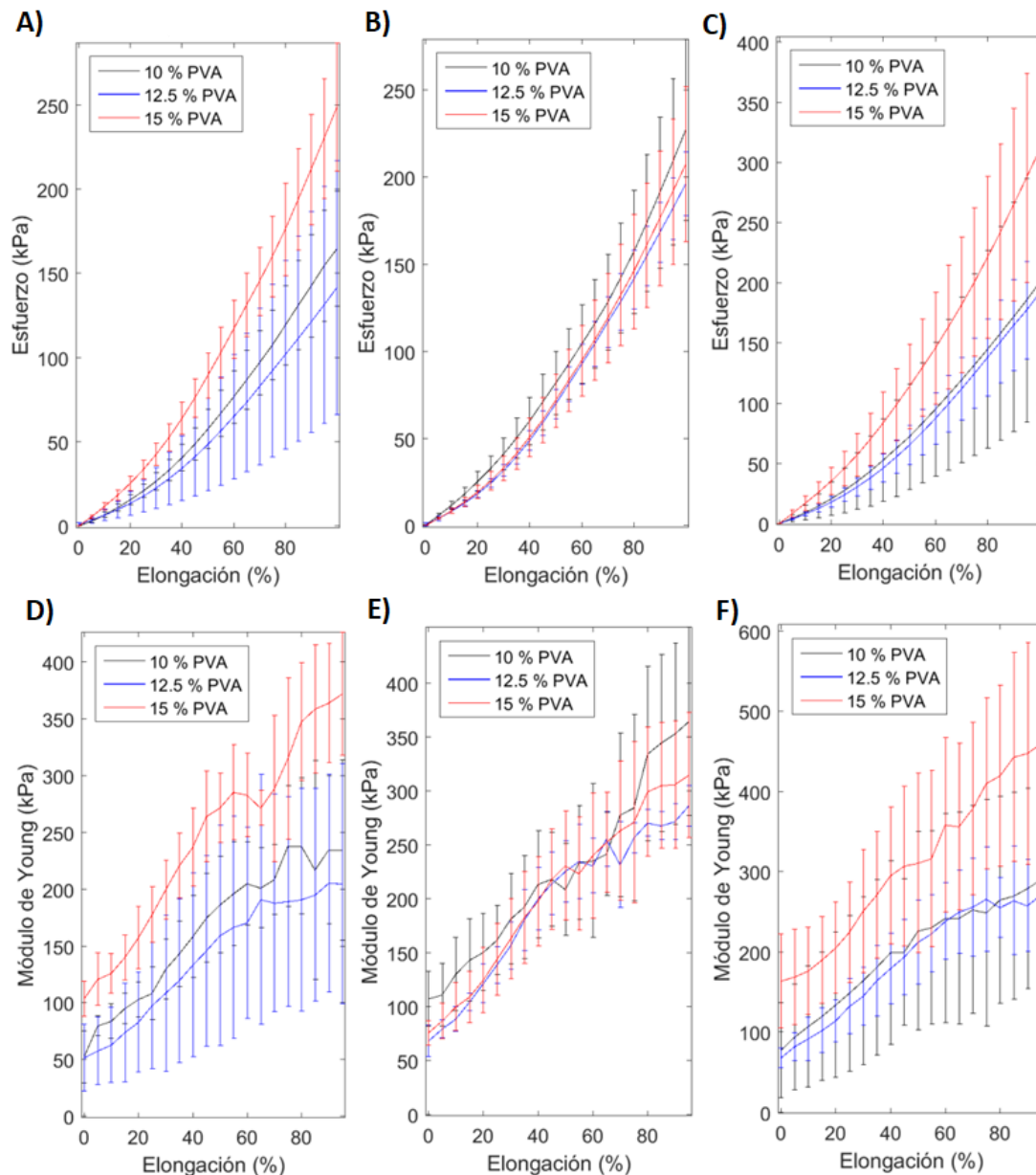


Figura 17. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error promediadas cada uno por ciento de deformación, A) muestras con 7 ciclos de C/D , B) muestras con 11 ciclos de C/D y C) muestras con 15 ciclos de C/D , D), E) y F) los módulos de Young incrementales de A), B) y C) respectivamente. $N=5$, las barras de error representan la desviación estándar.

Las Figuras 17 D), E) y F) presentan el módulo de Young a distintas deformaciones. Debido al comportamiento no lineal de las curvas esfuerzo-deformación, el módulo de Young de cada una varía en función de la deformación.

En las Figuras 17 A) y B) se observa que no hay una relación directa entre el incremento del esfuerzo y el porcentaje de PVA, ya que el esfuerzo más bajo pertenece al nivel medio del porcentaje de PVA (12.5 %). El mayor valor de esfuerzo fue obtenido por la probeta fabricada con 15 % de PVA, lo cual

no ocurre en las muestras de 11 ciclos de *C/D*. Estos resultados pueden explicarse ya que en probetas con un mayor porcentaje de *PVA* pueden presentarse regiones cristalinas más estables, ya que aumenta la superposición de las cadenas poliméricas. Sin embargo, este comportamiento no ocurre de igual forma en todos los ciclos de *C/D*, debido posiblemente a cadenas enredadas que actúan como inhibidores de la formación de estas zonas cristalinas [16].

La utilización de 15 % de *PVA* en la fabricación de las probetas representa un reto en la estandarización del protocolo. Estos altos porcentajes dificultan la producción de las probetas, ya que requiere una vigilancia constante del proceso de disolución de *PVA* para evitar el aglutinamiento de este. Por otro lado, debido a la alta viscosidad de la solución de *PVA* es difícil garantizar la homogeneidad de las probetas.

La *Figura 17 B)* presenta la menor variabilidad de las muestras, y la menor diferencia entre los tratamientos del proceso experimental. Existe una sutil tendencia entre los tratamientos que corrobora nuevamente que no existe una relación directa entre el incremento del porcentaje de *PVA* y el incremento del esfuerzo mecánico. El valor inferior de porcentaje de *PVA* presentó el esfuerzo más alto en las probetas con 11 ciclos de *C/D*, las mismas tendencias son observadas en el módulo de Young incremental.

El ANOVA de estos datos arrojó que solo el factor “*PVA*” presentó un efecto significativo en la resistencia mecánica, sin embargo, al no ser claro ese efecto en la *Figura 17* se realizó una diferencia de medias de Tukey que demostró que solo existen diferencias significativas entre los niveles 15 % y los otros dos niveles, pero no existe diferencias significativas entre 10 y 12.5 %.

Analizando los valores obtenidos para el tratamiento 10-7, se tiene que presentó valores de esfuerzo mecánico a 100 % de deformación de 171 ± 27 kPa. Los investigadores consultados por sus experimentos de resistencia mecánica de *PVA* para aplicaciones vasculares variaron condiciones experimentales como valores de deformación entre 30 % hasta la ruptura y el uso de arterias de diferentes diámetros. Estos investigadores obtuvieron datos de resistencia mecánica entre 100 y 1000 kPa [2][16][26]. Comparando los datos de este trabajo con los valores consultados en la literatura, podría considerarse que la resistencia mecánica obtenida es ligeramente baja para el tejido que se espera reemplazar.

El módulo de Young incremental para el tratamiento 10-7, varió en promedio entre 50 y 220 kPa, para deformaciones de 0 a 100 %. En la literatura consultada se reportó valores de módulo de Young para injertos de *PVA* entre 0.46 y 0.55 MPa a 25 % de deformación aproximadamente [26]. En estos niveles de deformación, el tratamiento 10-7 presentó un módulo de Young de aproximadamente 0.1 MPa. En otro estudio se reportaron datos de módulo de Young de una probeta longitudinal de una aorta de 1.2 MPa a 30 % de deformación.

Al retirar las probetas con un 15 % de *PVA* del análisis experimental, se observó que *no existen diferencias significativas entre los factores evaluados tanto para la resistencia mecánica como para el módulo de Young*. Considerando estos resultados junto con los obtenidos en los ensayos anteriores, *se decidió continuar con la muestra que presenta la menor relación costo/efectividad (10-7)*.

3.3.2.6 Adhesión celular

La adhesión celular se realizó solo con la muestra 10-7. En la *Figura 18*, se presenta la gráfica de barras de la viabilidad celular de los pozos denominados *B*, *D* y *E* correspondientes al control celular, los pozos donde se sembraron las células sobre el hidrogel del PVA y los pozos donde se agregó MTT a los hidrogeles.

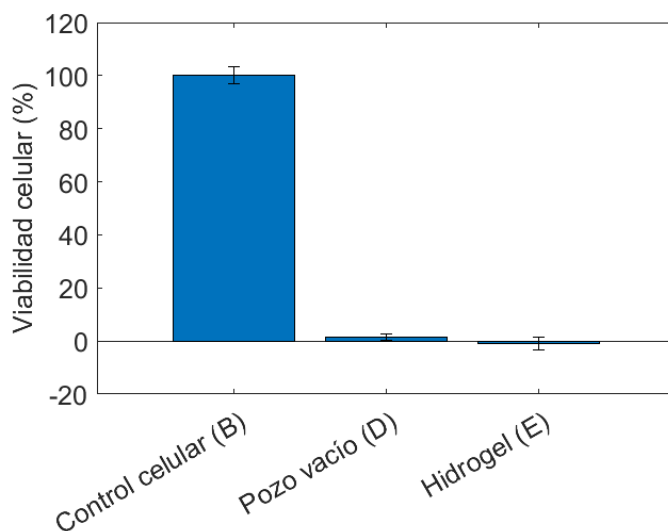


Figura 18. Viabilidad celular de fibroblastos sembrados sobre hidrogeles de PVA. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

En el ensayo de adhesión celular se observó que las células no migraron a través ni lateralmente por el hidrogel hacia el fondo de plato, confirmando que durante el ensayo estuvieron sobre el hidrogel, no obstante, se observa que no pudieron adherirse a este durante las 24 horas de exposición. Es claro que se dio poca o nula actividad metabólica, este hecho se puede interpretar de dos formas: las células están presentes, pero metabólicamente inactivas o hay pocas células presentes metabólicamente activas, *ambas interpretaciones indican un efecto adverso del PVA sobre las células.*

Las superficies superhidrofílicas al igual que las superhidrofóbicas no permiten la adsorción de proteínas y por consiguiente la adhesión celular [27], es así como la elevada hidrofiliidad de los hidrogeles de PVA provoca la supresión de la adherencia celular a los mismos [28]. En este caso las moléculas de agua próximas a la superficie del PVA (retenidas por su propiedad hidrofílica [29]) presentan una estructura muy ordenada y dificultan la adsorción de las proteínas de adhesión celular [27]. Adicionalmente es posible que las células no puedan adherirse al PVA ya que este no posee puntos de anclaje como proteínas, carbohidratos o péptidos.

Varios autores han reportado que la hidrofiliidad del PVA, si bien dificulta la adhesión celular no la evita por completo, como Conconi et al. [30] quienes presentaron resultados de baja adhesión celular sobre muestras de PVA en experimentos *in vitro*.

Los controles de las muestras de PVA permiten verificar si el polímero genera una reacción en el ensayo de MTT, adicional al metabolismo celular. Gracias a estos controles se evidenció que las probetas de PVA absorbían o intercambiaban solventes con el medio ya que presentaban la coloración

del reactivo que se estuviera utilizando. Este fenómeno explica los valores negativos encontrados en la barra de los pozos *E* en la *Figura 18*.

Los métodos colorimétricos no son de uso común para medir la adhesión celular, pero han sido utilizados por algunos autores con este fin. Tan et al. [31], fabricaron scaffolds tubulares por electrohilado con policaprolactona, gelatina y *PVA*, de manera que el *PVA* se degradaba más rápidamente y generaba poros de mayor tamaño. Adicionalmente inmovilizaron heparina en la superficie del scaffold y realizaron una prueba de adhesión de *CE* humanas de vena de cordón umbilical (*HUVEC*), con un ensayo de metabolismo mitocondrial (MTT); obtuvieron que las muestras heparinizadas presentaron mayor número de células adheridas que en las muestras no-heparinizadas, debido posiblemente a la segregación de *VEGF* por parte de las *CE*.

En un capítulo posterior se analizará una estrategia con el objetivo de propiciar una mejor adhesión celular, para abordar esta limitación. El enfoque más común de la literatura es la mezcla de polímeros naturales o incluso biomoléculas con *PVA* antes de la etapa de reticulación [27].

3.3.3 CONSIDERACIONES FINALES

El método de desinfección establecido para los hidrogeles de *PVA* fue eficaz para prevenir el crecimiento microbiano y fúngico en las probetas, este consistió en una solución de etanol al 70 % por un tiempo de 150 minutos.

La prueba de caracterización química no mostró que los factores tuvieran un efecto significativo sobre el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles. Por lo tanto, es posible que los niveles de los factores no sean lo suficientemente distantes para que, con la sensibilidad de estas técnicas, se encuentren diferencias significativas en las propiedades de los hidrogeles.

Durante el ensayo, se observó que los factores no afectaron significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, se encontraron respuestas citotóxicas que son relevantes en este tipo de aplicaciones. Se cree que estas respuestas citotóxicas pueden ser el resultado de la liberación de moléculas ácidas del *PVA* en el medio de cultivo; y ya que este proceso es reversible, puede explicar la tendencia errática encontrada en el ensayo. Además, se observó que la citotoxicidad aumentó con el porcentaje de *PVA*, lo que sugiere que una mayor liberación de estas moléculas podría estar relacionada con la cantidad de *PVA* presente. Sin embargo, la citotoxicidad también aumentó con el número de ciclos de *C/D*, lo que contradice la idea de que, a mayor entrecruzamiento, menor liberación de moléculas.

La estabilidad del hidrogel parece depender de los niveles de los factores, ya que se observó que, en los resultados de los experimentos exploratorios, con niveles más bajos del *capítulo 3*, se logró una estabilización en la pérdida de masa después de los 7 días. En cambio, en la segunda sección, esta estabilización ocurrió después de solo un día de exposición al PBS.

El porcentaje de masa perdida en la muestra común entre las dos secciones (10-7) fue muy similar entre sí. Sin embargo, en los niveles más altos de los factores, aunque no hubo una pérdida de masa

menor (comparada con los experimentos exploratorios) en el primer día, se observaron procesos de "recuperación" que se atribuyen al depósito de sales.

La absorción de agua no pudo ser claramente observada debido a los fenómenos de degradación que ocurren dentro de este ensayo, si bien se presenta una tendencia de que a mayor número de ciclos de *C/D* se da menos absorción de agua, debido a que una estructura más cristalina impide mejor el paso de agua libre [16], no existe un efecto significativo de los factores en este fenómeno.

En el comportamiento mecánico se observó que el único nivel que presentó diferencias significativas a nivel estadístico en el esfuerzo mecánico a 100 % de elongación, fue 15 % de PVA. Sin embargo, el comportamiento errático de este nivel, ocurrido probablemente por las dificultades que acarrea su procesamiento, que también fueron evidenciadas en otras pruebas como la degradación y la viabilidad celular, hizo que se retirara de la elección de la formulación que continúa en los siguientes capítulos.

La deformación y resistencia mecánica de los hidrogeles incrementó significativamente con respecto a los ensayos de los experimentos exploratorios del presente capítulo, esto no solo se debió a los cambios en los niveles de los factores sino también a los cambios en el procesamiento de los hidrogeles detallados en la sección 3.3.1; donde el empaqueo hermético de las muestras evitó la aparición de zonas débiles deshidratadas en el hidrogel. Los valores de módulo de Young obtenidos están dentro de los rangos encontrados en la literatura, pero la resistencia mecánica tiene valores ligeramente inferiores.

El ensayo de adhesión mostró claramente que el PVA no es un material que permita la adecuada adhesión celular, posiblemente debido a que su característica hidrofílica evita la adsorción de proteínas de adhesión en su superficie.

3.4 REFERENCIAS

- [1] M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz, and B. D. Boyan, "A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 100 B, no. 5, pp. 1451–1457, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32694.
- [2] M. Bernal, J. Saldarriaga, C. Cabeza, C. Negreira, J. Bustamante, and J. Brum, "Development and evaluation of anisotropic and nonlinear aortic models made from clinical images for in vitro experimentation," *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, no. 16, 2019, doi: 10.1088/1361-6560/ab2db5.
- [3] M. Bernal, I. Sen, and M. W. Urban, "Evaluation of materials used for vascular anastomoses using shear wave elastography," *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, no. 7, 2019, doi: 10.1088/1361-6560/ab055c.
- [4] H. Adelnia, R. Ensandoost, S. Shebbrin Moonshi, J. N. Gavvani, E. I. Vasafi, and H. T. Ta, "Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future," *Eur. Polym. J.*, vol. 164, no. December 2021, p. 110974, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110974.
- [5] E. L. Texto et al., "MGA 0381. Esterilidad," *Farm. los Estados Unidos Mex. Supl.*, pp. 136–137, 2017, [Online]. Available: <http://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/267.pdf>.
- [6] N. Huebsch, M. Gilbert, and K. E. Healy, "Analysis of sterilization protocols for peptide-modified hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 74, no. 1, pp. 440–447, 2005, doi: 10.1002/jbm.b.30155.

- [7] International Organization for Standardization (ISO), Biological evaluation of medical devices. 2009.
- [8] © ASTM International, Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. 2016, pp. 1–5.
- [9] © ASTM International, Standard Test Method for Water Absorption of Plastics. 2010, pp. 25–28.
- [10] © ASTM International, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. 2014, pp. 1–15.
- [11] H. Kanda, K. Oya, T. Irisawa, Wahyudiono, and M. Goto, “Tensile Strength of Porcine Aorta Decellularized with Liquefied Dimethyl Ether and DNase,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 38, pp. 34449–34453, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c04103.
- [12] Merck, “Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT.” 2023, [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.
- [13] A. Escudero-Castellanos, B. E. Ocampo-García, M. V. Domínguez-García, J. Flores-Estrada, and M. V. Flores-Merino, “Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: biocompatibility assessment and effect of the sterilization process,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 12, 2016, doi: 10.1007/s10856-016-5793-3.
- [14] R. Galante et al., “About the sterilization of chitosan hydrogel nanoparticles,” *PLoS One*, vol. 11, no. 12, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168862.
- [15] M. M. Ribeiro, V. A. Neumann, M. C. Padoveze, and K. U. Graziano, “Eficácia e efetividade do álcool na desinfecção de materiais semicríticos: Revisão sistemática,” *Rev. Lat. Am. Enfermagem*, vol. 23, no. 4, pp. 741–752, 2015, doi: 10.1590/0104-1169.0266.2611.
- [16] S. Gupta, S. Goswami, and A. Sinha, “A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels,” *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 1, 2012, doi: 10.1088/1748-6041/7/1/015006.
- [17] A. Arredondo, J. F. Patiño, M. E. Londoño, and C. E. Echeverri, “Matriz a partir de un hidrogel de alcohol polivinílico (pva) combinada con sulfadiazina de plata con potencial aplicacion en el manejo y control de la sepsis en heridas dérmicas,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 12, no. 4, pp. 178–187, 2011.
- [18] S. Aruldass, V. Mathivanan, A. R. Mohamed, and C. T. Tye, “Factors affecting hydrolysis of polyvinyl acetate to polyvinyl alcohol,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 7, no. 5, 2019, [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343719303616>.
- [19] M. Sirousazar and P. Khodamoradi, “Freeze-thawed humic acid/polyvinyl alcohol supramolecular hydrogels,” *Mater. Today Commun.*, vol. 22, p. 100719, 2020, doi: 10.1016/j.mtcomm.2019.100719.
- [20] M. Mandegari, L. Ghasemi-Mobarakeh, and M. Zamani, “Manipulating the degradation rate of PVA nanoparticles by a novel chemical-free method,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 30, no. 9, pp. 2381–2391, 2019, doi: 10.1002/pat.4683.
- [21] C. Rolsky and V. Kelkar, “Degradation of polyvinyl alcohol in us wastewater treatment plants and subsequent nationwide emission estimate,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 11, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3390/ijerph18116027.
- [22] J. Negishi, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, and A. Kishida, “High-hydrostatic pressure technique is an effective method for the preparation of PVA-heparin hybrid gel,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 5, pp. 617–622, 2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.001.

- [23] M. E. Londoño and J. M. Jaramillo, "Comportamiento dieléctrico de hidrogeles de alcohol polivinílico obtenidos por la técnica congelamiento/descongelamiento," *DYNA*, vol. 78, no. 165, pp. 132–137, 2011.
- [24] F. Boran, "The influence of freeze-thawing conditions on swelling and long-term stability properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels for controlled drug release," *Polym. Bull.*, vol. 78, pp. 7369–7387, 2021, doi: 10.1007/s00289-021-03902-8.
- [25] W. Ekasurya, J. Sebastian, D. Puspitasari, P. P. P. Asri, and L. A. T. W. Asri, "Synthesis and Degradation Properties of Sericin/PVA Hydrogels," *Gels*, vol. 9, no. 2, p. 76, 2023, doi: 10.3390/gels9020076.
- [26] D. T. Padavan, A. M. Hamilton, L. E. Millon, D. R. Boughner, and W. Wan, "Synthesis, characterization and in vitro cell compatibility study of a poly(amic acid) graft/cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 1, pp. 258–267, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.038.
- [27] M. Firoozi, M. Entezam, E. Masaeli, F. Ejeian, and M. H. Nasr-Esfahani, "Physical modification approaches to enhance cell supporting potential of poly (vinyl alcohol)-based hydrogels," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 139, no. 2, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1002/app.51485.
- [28] P. Chocholata, V. Kulda, J. Dvorakova, J. K. Dobra, and V. Babuska, "Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogels enriched by hyaluronic acid and hydroxyapatite," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 16, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3390/ijms21165719.
- [29] S. S., S. K. A., P. D. Nair, and L. V. Thomas, "A nonadherent chitosan-polyvinyl alcohol absorbent wound dressing prepared via controlled freeze-dry technology," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 150, pp. 129–140, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.292.
- [30] M. T. Conconi et al., "Evaluation of vascular grafts based on polyvinyl alcohol cryogels," *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 3, pp. 1329–1334, 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2348.
- [31] Z. Tan, H. Wang, X. Gao, T. Liu, and Y. Tan, "Composite vascular grafts with high cell infiltration by co-electrospinning," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 369–377, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.067.

CAPÍTULO 4.

SUPLEMENTACIÓN DE LOS IMPLANTES

4.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, se determinaron los parámetros para la fabricación de los implantes vasculares, el peso molecular del PVA de 89-98 KDa, el porcentaje de PVA de 10 % y el número de ciclos de C/D de 7 de los hidrogeles, con base en los resultados de esfuerzo mecánico, módulo de Young, degradabilidad, absorción de agua y viabilidad celular. Sin embargo, los hidrogeles fabricados no permitieron la adhesión celular.

Por esta razón, este capítulo plantea la hipótesis de que *es posible mejorar la capacidad de adhesión celular del hidrogel de PVA sin perder las propiedades ya alcanzadas*. Para ello el capítulo se dividió en dos secciones, en la primera de ellas se evaluó la capacidad de adhesión celular de los hidrogeles de PVA suplementados con cuatro tipos de macromoléculas con varios aditivos, estas fueron gelatina [1], colágeno [1], fibroína [2] y quitosano [3]; debido a que se ha reportado que estas macromoléculas ofrecen puntos de anclaje para la adhesión celular.

En esta sección se fijó el objetivo de *producir un material que generara adhesión celular sobre los hidrogeles de PVA* y se logró demostrar que si bien todas las macromoléculas favorecieron la adhesión celular, el quitosano fue quien mayor adhesión logró, por lo tanto, las siguientes pruebas se realizaron con dicha macromolécula, no obstante, en los ensayos de la degradación hidrolítica y absorción de agua, el hidrogel de *PVA-quitosano* demostró tener dificultades para mantener su integridad en soluciones acuosas, afectando las propiedades que ya se habían logrado en el capítulo 3.

Es así como en la segunda sección de este capítulo se planteó el objetivo de *incrementar la estabilidad en soluciones acuosas de los hidrogeles de PVA-quitosano*, para ello se evaluaron cuatro entrecruzantes reportados en la literatura como reticulantes del quitosano [4], se evaluó el glutaraldehído [5] como entrecruzante covalente y el citrato trisódico [6], el tripolifosfato de sodio [6] y el ácido oxálico [7] como entrecruzantes iónicos. Inicialmente se corroboró que estos entrecruzantes no comprometieran el desempeño biológico del hidrogel con una prueba de viabilidad celular, después de esto se eligió el ácido oxálico como entrecruzante por su desempeño en la adhesión celular. En consecuencia, la composición elegida para desarrollar el implante vascular es un hidrogel de *PVA -quitosano -ácido oxálico*. Adicionalmente, esta composición demostró mejorar las propiedades de degradación y absorción que se habían perdido.

Sección 1

4.2 EFECTO DE LAS MACROMOLÉCULAS EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL

4.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

PVA Polivinil alcohol Mw 89 a 98 kDa, 99+% hidrolizado, CAS 9002-89-5. Sigma-Aldrich®, USA
Colágeno hidrolizado sin marca.

Gelatina sin sabor. Frutiño™

Quitosano extraído de cáscara de camarón ≥ 75 % desacetilado, CAS 9012-76-4. Sigma-Aldrich®

Fibroína obtenida en el laboratorio de Biomateriales a partir de capullos de seda *Bombyx mori* de la empresa Corseda® con el protocolo descrito en [8].

Celulosa α microcristalina, CAS 9004-34-6. Sigma-Aldrich®

Ácido hidrocloclorhídrico fumante 37 %, CAS 7732-18-5. EMSURE®

Glutaraldehído 25 %, CAS 111-30-8. PanReac™

Ácido acético glacial 99, 5 %, CAS 64-19-7. BiopharChem®

Glicerol 87 %, CAS 56-81-5. PanReac™

Etanol absoluto 99 %, CAS 64-17-5. EMSURE®

Calceína-AM, CAS 148504-34-1 Invitrogen™

El resumen esquemático de la metodología de la sección 1 se presenta en la *Figura 1*.

Preparación de las muestras

Para la preparación de todas las muestras de PVA suplementadas con las macromoléculas, excepto las de fibroína, se elaboró una solución de PVA al 9 % w/v con respecto al agua destilada (con la adición de la macromolécula se llega a 10 % de sólidos), la solución fue llevada a baño termostático en las mismas condiciones descritas en la sección 3.3.1, modificando la temperatura por una medida externa de 87 ± 3 °C y un tiempo de 20 minutos. Una vez pasados estos 20 minutos, se bajó la temperatura a 60 °C en aproximadamente una hora, conservando la velocidad de agitación.

Colágeno y gelatina

Cuando la temperatura externa de la solución de PVA al 9 % w/v llegó a 60 °C, se agregó 1 % w/v de gelatina o de colágeno y se dejó agitando por una hora, luego se agregó o no (según la formulación) un entrecruzante que fue HCl (0.02 % v/v al 37 %) o glutaraldehído (0.1 % v/v) para la gelatina y ácido acético (1 % v/v) o glutaraldehído (0.1 % v/v) para el colágeno; dejando en agitación por 15 minutos. Las soluciones se vertieron en los moldes y se realizaron siete ciclos de C/D como se describen en la sección 3.3.1.

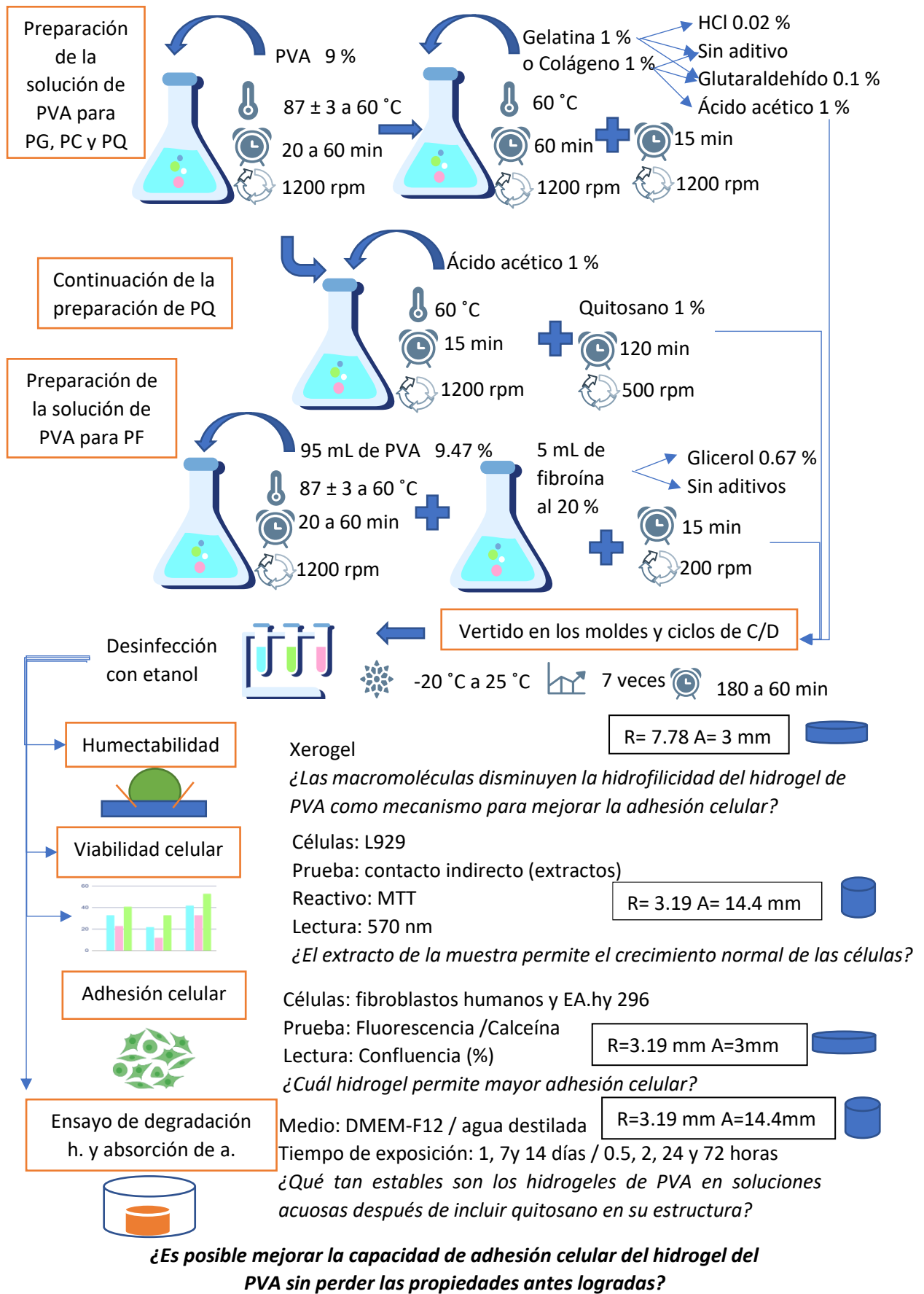


Figura 1. Esquema de la metodología de la sección 1 capítulo 4

Quitosano

Cuando la temperatura externa de la solución de PVA al 9 % w/v llegó a 60 °C, se agregó 1 % v/v de ácido acético seguido de 1 % w/v de quitosano el cual se dejó en agitación a 500 rpm por dos horas. La solución fue centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos para eliminar las burbujas y calentada a 70 °C para disminuir su viscosidad, antes de ser vertida en los moldes y sometida a siete ciclos de C/D como se describen en la sección 3.3.1.

Fibroína

Para la extracción de fibroína se siguió el protocolo establecido por el grupo de Investigación en Biomateriales (BioMat) [8], brevemente, se dejaron capullos de *Bombyx mori* cortados en una solución de carbonato de sodio a 70 °C a 60 rpm para su desgomado (separación de fibroína y sericina) hasta la formación de una madeja, luego la madeja fue disuelta depositándola en una solución de cloruro de calcio, agua y etanol a 70 °C, esta solución fue sometida a diálisis (para eliminar las sales) y finalmente concentrada hasta obtener una solución de fibroína al 20 %. Aparte se realizó una solución de PVA al 9.47 % w/v con las mismas condiciones de las descritas en esta sección. Ambas soluciones se mezclaron para obtener una solución final con 9 % w/v de PVA y 1 % w/v de fibroína. Los cálculos realizados para una solución de 100 mL se explican en la Figura 2.

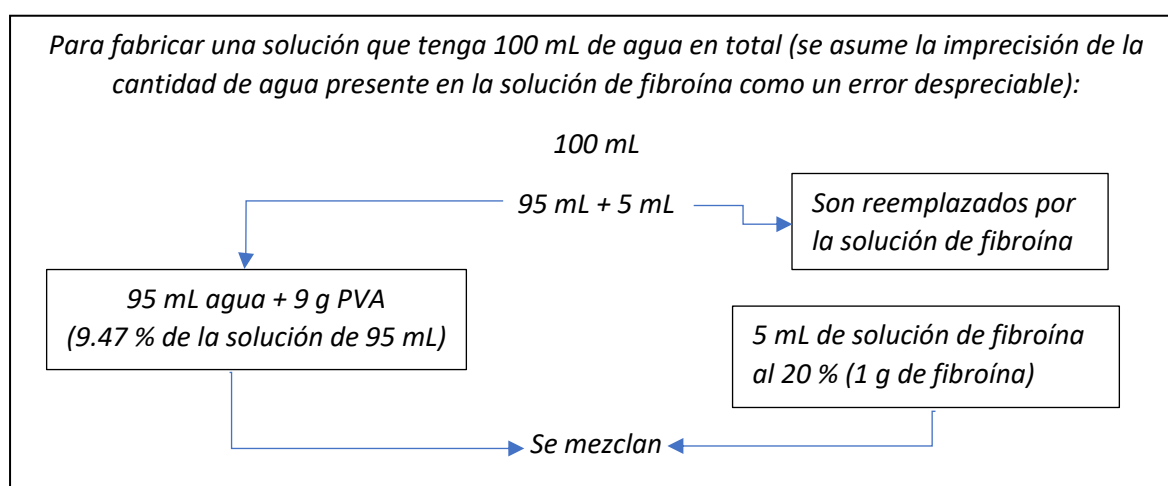


Figura 2. Esquema de los cálculos realizados para fabricar los hidrogeles de PVA suplementados con fibroína

Finalmente, se agregó o no (según el tratamiento) glicerol (0.67 % v/v) para mejorar la interfaz entre el PVA y la fibroína, y se dejó agitando 15 minutos más. La solución se vertió en los moldes y se realizaron siete ciclos de C/D como se describen en la sección 3.3.1.

Cada tratamiento recibió un código de dos letras mayúsculas, seguidas o no de tres letras minúsculas para denotar a cuál pertenecen, y están descritos en la Tabla 1.

Para los ensayos de esta sección, se realizó un diseño factorial general donde se asumió la presencia de macromoléculas como el factor, y cada tratamiento como un nivel categórico.

Tabla 1. Macromoléculas utilizadas para suplementar los hidrogeles de PVA

| Código | Macromolécula (1 %) | Aditivo | |
|--------|---------------------|-------------------|--------------|
| | | Nombre | Cantidad (%) |
| PG | | Ninguno | - |
| PG-glu | Gelatina | Glutaraldehído | 0.1 |
| PG-hcl | | Ácido clorhídrico | 0.02 |
| PC | | Ninguno | - |
| PC-glu | Colágeno | Glutaraldehído | 0.1 |
| PC-aac | | Ácido acético | 1 |
| PF | | Ninguno | - |
| PF-gli | Fibroína | Glicerol | 0.67 |
| PQ | | Quitosano | Ninguno |

Desinfección

Los hidrogeles suplementados con macromoléculas no desinfectaban correctamente con los tiempos establecidos en el procedimiento de la sección 3.3.1.1. Es así como se decidió aumentar el tiempo de exposición a la solución de etanol al 70 % de 150 minutos a 16 horas. Después de implementar esta modificación, se pudo confirmar que se había logrado una desinfección efectiva.

4.2.1.1 Humectabilidad

El ensayo de humectabilidad se realizó para determinar si la adición de macromoléculas en los hidrogeles de PVA modificaba el comportamiento químico del hidrogel como un mecanismo para mejorar la adhesión celular. Este ensayo se basó en la norma *ASTM D7334* [9]. Para la fabricación de las muestras se utilizaron moldes cilíndricos de radio 7.78 mm y 3 mm de altura. Se fabricaron tres muestras de cada tratamiento incluido un control de solo PVA. Una vez desinfectadas, se deshidrataron por 24 horas a 37 °C. Para la prueba de humectabilidad se utilizó un goniómetro DataPhysics OCA 15EC®. La prueba se realizó a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) y una humedad relativa de 35 %. Las muestras eran ubicadas bajo la aguja hipodérmica dispensadora y una vez esta dispensaba 1 µL de agua destilada a 0.5 µL/s, las muestras se ponían en contacto directo con la gota para evitar que esta cayera sobre las muestras. Se midió el ángulo de ambos lados de la gota con un software SCA20 y se realizaron tres medidas en cada muestra. Con los datos de ángulo de contacto se realizó un gráfico de barras en el software Matlab® con su respectiva desviación estándar y la significancia estadística fue evaluada con una comparación de rangos múltiples con el método LSD Fisher.

4.2.1.2 Viabilidad celular

Este ensayo se realizó según la norma *ISO-10993* [10]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.3. La significancia estadística fue evaluada con una comparación de rangos múltiples con el método LSD Fisher.

4.2.1.3 Adhesión celular

El ensayo de adhesión celular se realizó por microscopía de fluorescencia con calceína. Se utilizaron moldes cilíndricos con radio 3.19 mm y altura 3 mm, desinfectados como se describe en la sección 4.2.1. Se utilizaron seis muestras por cada tratamiento, tres para sembrar fibroblastos humanos **de cultivo primario** y tres de control (sin células), adicionalmente se agregaron como control del experimento muestras de PVA sin suplementar. Una vez desinfectadas, las muestras se sumergieron en DMEM-F12 suplementado por 24 horas a 37 °C, para que el hidrogel intercambiara el agua libre por el medio de cultivo. Luego se sembraron 1×10^4 células sobre cada hidrogel y se incubaron por 24 horas a 37 °C con DMEM-F12 suplementado, utilizando el método de siembra descrito en la sección 3.3.1.7. Para realizar la tinción de las células y los hidrogeles, se tomó un vial de 50 µg calceína-AM y se disolvió en 50 µL de DMSO. Luego, se tomaron 9.6 µL de la solución de calceína-AM resuspendida en DMSO y se mezclaron con 4790.4 µL de Lactato de Ringer, para obtener una solución de trabajo 2 µM. A las 24 horas de la siembra, el medio de cultivo fue retirado y reemplazado por 100 µL de la solución de trabajo que se incubó a 37 °C por 30 minutos, luego la solución de trabajo fue retirada, las muestras y los pozos fueron lavados gentilmente con 100 µL de lactato de Ringer. Finalmente, las muestras fueron vertidas en pozos limpios y observadas en un microscopio de fluorescencia con un filtro azul. Las fotografías obtenidas se segmentaron en Matlab y se determinó el área ocupada por la célula con respecto al área total de la imagen en porcentaje.

4.2.1.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua

Degradación hidrolítica

Este ensayo se basó en la norma *ASTM F1635* [11]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.4, con excepción del medio de degradación, que fue DMEM-F12 suplementado en lugar de PBS y los tiempos de exposición de las muestras al medio (1, 7 y 14 días). Adicionalmente, una vez las muestras cumplieron con su tiempo de ensayo, se retiraron de la incubadora, el medio se intercambió por agua estéril, y las muestras se almacenaron 24 horas a 4 °C, luego se retiró el agua y se registró el peso del hidrogel (saturado), luego se secaron en las mismas condiciones que antes del experimento, se atemperaron y pesaron nuevamente.

Para el procesamiento de datos, se utilizó el peso saturado que correspondió a pesar los hidrogeles en un medio acuoso, de manera que se pudiera pesar el hidrogel en el estado en que se emplearía en un sistema biológico, sin introducir errores en las medidas. Dichas medidas se definieron como *peso inicial* y *peso final*, correspondientes a los pesos antes y después del proceso de incubación respectivamente y se determinó el porcentaje de masa del hidrogel después de la exposición con respecto a la masa inicial, utilizando la *Ecuación 4* del *Capítulo 3*. Para trazar la curva de masa vs tiempo de exposición al medio, se utilizó el software Matlab®, donde se graficó también la desviación estándar porcentual.

Absorción de agua

Este ensayo se basó en la norma *ASTM D570* [12]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.4. Con tiempo de exposición de 0, 2 y 24 horas.

4.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.2.1 Humectabilidad

En la *Figura 3* se observan los valores de ángulo de contacto de los hidrogeles con las diferentes macromoléculas contrastados con hidrogeles de solo *PVA*.

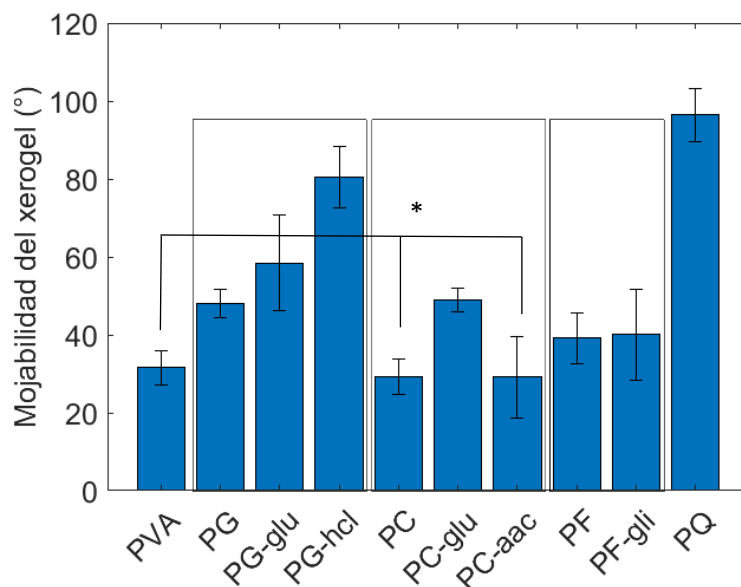


Figura 3. Gráfica de barras del ángulo de contacto medido en los tratamientos, los recuadros presentes separan las muestras que tienen la misma macromolécula. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.

La inclusión de macromoléculas de gelatina y quitosano en los hidrogeles resultó en un aumento en el ángulo de contacto de la superficie de los xerogeles, en comparación con el xerogel de solo *PVA*. Este aumento indica que la superficie se vuelve más hidrofóbica que la del *PVA*, lo que sugiere que la adhesión celular podría ser inducida en la superficie de estos hidrogeles [13].

A través de una prueba de comparación de rangos múltiples LSD Fisher, se determinó que el ángulo de contacto de los xerogeles *PC* y *PC-aac* no presenta diferencias significativas en comparación con el xerogel de *PVA*. Esto indica que estos xerogeles no aumentan la hidrofobicidad en relación con el *PVA*, por lo que, si generan adhesión en la prueba de adhesión celular, lo harán a través de otros mecanismos alternos a la reducción de la superhidrofiliidad del *PVA*, como a través de interacciones químicas. Por otro lado, los demás xerogeles presentaron diferencias significativas en comparación con el *PVA*, lo que sugiere una hidrofobicidad significativa. El que presenta mayor hidrofobicidad es el quitosano con un valor de ángulo de contacto de $96.37 \pm 6.69^\circ$ contra $31.54 \pm 4.37^\circ$ del *PVA*.

La hidrofobicidad del xerogel de *PQ* se debe que al quitosano tiene estructuras alifáticas poco polares en las cadenas laterales de los grupos amino. Este comportamiento ha sido reportado por Ling et al. [14], quienes midieron el ángulo de contacto de películas de quitosano y obtuvieron valores de $96.2 \pm 0.41^\circ$.

A pesar de que las macromoléculas PC y PC-aac no generaron diferencias significativas con respecto a la hidrofobicidad del hidrogel, todos los tratamientos evaluados continuaron con las siguientes pruebas para determinar si la hidrofobicidad es el único mecanismo que promueva la adhesión celular.

4.2.2.2 Viabilidad celular

En la *Figura 4*, se muestra el porcentaje de viabilidad de las células L929 después de ser expuestas durante 24 horas a extractos de los hidrogeles fabricados con las macromoléculas. Se observa que la única muestra que presenta menos de 70 % de viabilidad además del control es PVA-fibroína.

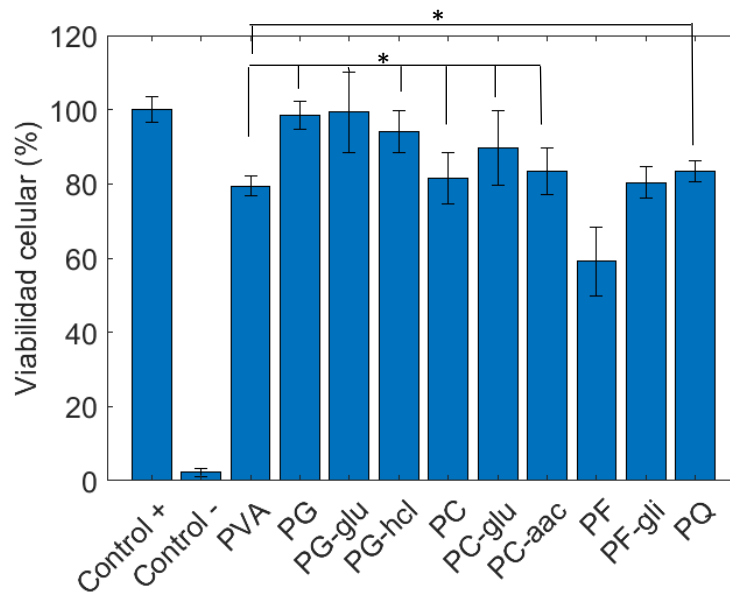


Figura 4. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher

Las medias de cada macromolécula tratada como un nivel de un único factor estadístico fueron comparadas con el método LSD de Fisher y se obtuvo que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos con fibroína, de hecho, el hidrogel con fibroína sin aditivos (el único con comportamiento citotóxico) tiene diferencias significativas con todos los niveles. En los demás niveles se encontró que entre los hidrogeles con gelatina o con colágeno no existen diferencias significativas, esto implica que los aditivos no modificaron el efecto de la macromolécula sobre la viabilidad celular. Los hidrogeles con quitosano tienen diferencias estadísticas significativas con los hidrogeles con fibroína como se había mencionado y con los hidrogeles con solo gelatina y gelatina con glutaraldehído, pero no están en un rango citotóxico. Finalmente, los hidrogeles de solo PVA tienen diferencias significativas con los hidrogeles de fibroína y todos los que contenían gelatina.

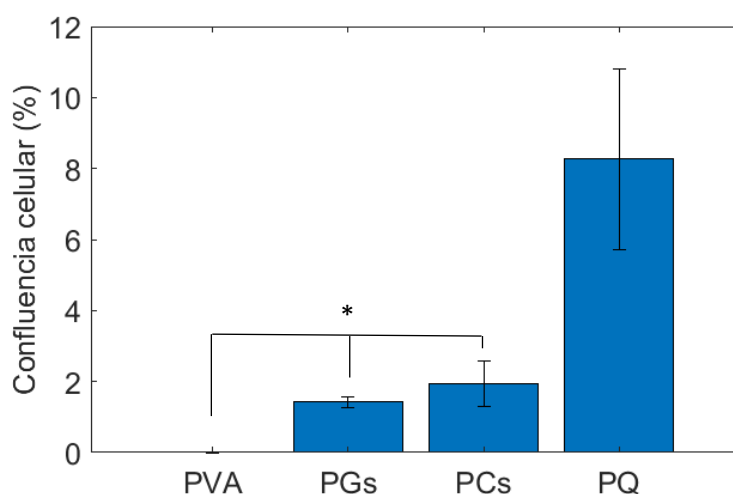
Todas las macromoléculas implementadas en este experimento han sido utilizadas en aplicaciones biológicas, debido a que proporcionan un medio estable para el crecimiento celular; el colágeno y la gelatina además proporcionan nutrientes a las células y esto se refleja en su alto porcentaje de viabilidad celular [15]. Sin embargo, la fibroína es una proteína que también puede proporcionar aminoácidos a las células [16], pero en esta investigación la mezcla de PVA y fibroína demostró ser citotóxica y como los hidrogeles con PVA-fibroína y glicerol no tuvieron el mismo comportamiento que

los hidrogeles con solo PVA-fibroína, no se puede adjudicar dicho efecto a sustancias tóxicas derivadas del procesamiento de la fibroína ni a la concentración del material. Es posible que este comportamiento citotóxico se deba a pequeñas partículas observadas en el extracto de los hidrogeles de fibroína, dichas partículas posiblemente pudieron deberse a desprendimientos del hidrogel que generaron un efecto citotóxico por aplastamiento de las células. Aunque la mayoría de los reportes de la literatura aseguran que la fibroína no es citotóxica, Coelho et al. [17], encontraron lo contrario. En su investigación desarrollaron membranas de fibroína / hidroxiapatita para aplicaciones médicas y encontraron que las membranas fabricadas de solo fibroína presentaron una viabilidad celular de menos del 20 %, ellos atribuyen este comportamiento a la degradación de estructuras de la *hélice- α* por acción enzimática que libera productos citotóxicos.

Debido a que la fibroína presentó un comportamiento citotóxico en uno de los tratamientos, esta macromolécula fue descartada en los siguientes experimentos.

4.2.2.3 Adhesión celular

En la *Figura 5*, se observan los porcentajes de confluencia de fibroblastos humanos después de 24 horas de sembrados sobre los hidrogeles, agrupados por el tipo de macromolécula utilizada. Todas las macromoléculas a diferencia del hidrogel de solo PVA permitieron la adhesión celular. El quitosano posibilitó la adhesión celular en un porcentaje significativamente mayor que las macromoléculas de gelatina y colágeno. Es posible que este comportamiento se deba en parte a la disminución de la hidrofiliidad superficial que esta macromolécula genera en los hidrogeles de PVA.



*Figura 5. Área ocupada por las células en porcentaje. Donde PGs y PCs corresponde a los hidrogeles con gelatina y colágeno respectivamente. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher*

Debido al efecto del quitosano en la adhesión celular, *se eligió el material PVA-quitosano para las siguientes etapas experimentales.*

La adhesión celular está afectada por muchas variables como el comportamiento mecánico del sustrato y la energía libre de superficie, este último fue analizado en el ensayo de humectabilidad y se obtuvo que el quitosano favoreció un ángulo de contacto más adecuado para la adhesión celular que las demás macromoléculas. La característica química de la macromolécula también influye en la

adhesión celular, el colágeno y la gelatina tienen secuencias de aminoácidos similares a la arginina-glicina-asparagina (RGD) en su estructura polimérica, estas secuencias son utilizadas por las células como puntos de anclaje y puntos para generar proliferación celular sobre el sustrato [1].

El quitosano no posee estos puntos de anclaje, pero su mecanismo para permitir la adhesión celular puede deberse en parte a la reducción de la hidrofiliidad del PVA y también a otros mecanismos como su des-polimerización, ya que en este proceso libera N-acetil-d-glucosamina que favorece la construcción de la ME que conduce a la proliferación de fibroblastos y a la deposición de colágeno [3].

4.2.2.4 Degradación hidrolítica y absorción de agua

Las curvas de la Figura 6 muestran que los hidrogeles de PVA-quitosano sufrieron una pérdida de masa de casi el 50 % a los 7 días de exposición en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado, mientras que los hidrogeles de solo PVA perdieron casi el 30 %.

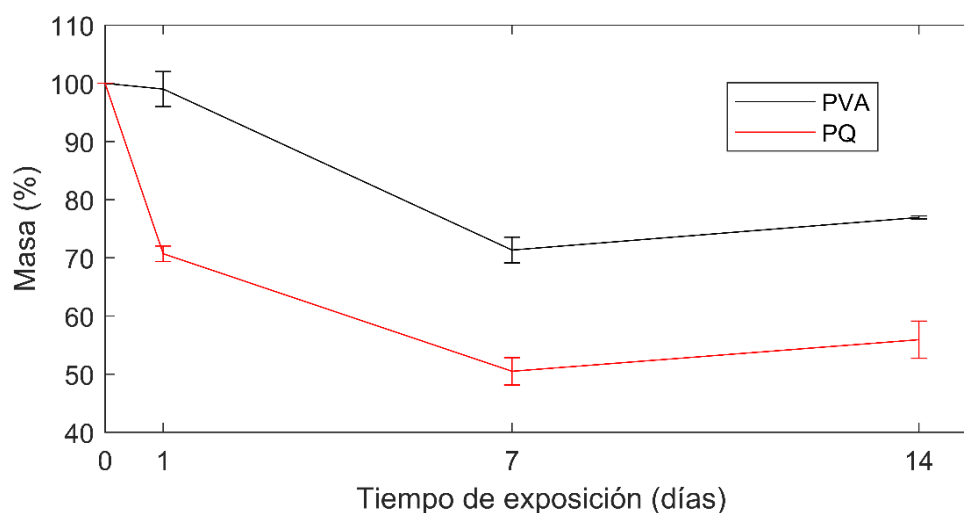


Figura 6. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA y PVA-quitosano en el ensayo de degradación hidrolítica. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

Las moléculas de quitosano se ionizan en soluciones acuosas con cargas positivas atrayendo los aniones presentes en el agua [4], formando enlaces débiles; como el PVA no tiene aniones, no puede formar enlaces con el quitosano, esto hace que las moléculas de quitosano estén “sueltas” en medio de las cadenas de PVA, obstruyendo, además, la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas durante la reticulación física. De manera que la integridad del hidrogel se vio comprometida.

Autores como Alhosseini et al. [18], reportan valores de degradación mayores en compuestos de PVA-quitosano que, en solo PVA, ellos por ejemplo presentan una degradación del 80 % a 7 días de inmersión en PBS de PVA-quitosano, contra 10 % de solo PVA en el mismo tiempo de exposición.

En la Figura 7, se observan las curvas del cambio en la masa de las muestras de PVA y PVA-quitosano sometidas al ensayo de absorción de agua. Al igual que se observó en el ensayo de degradación, la estabilidad de los hidrogeles con quitosano se vio comprometida debido al poco entrecruzamiento de las moléculas presentes [19]. Debido a esto el agua fluye más fácilmente hacia el interior de los hidrogeles de PVA-quitosano aumentando su peso y modificando su geometría.

Es así, como para mejorar la estabilidad del material PVA-quitosano, se considera que las moléculas de quitosano requieren de un agente que mejore su entrecruzamiento.

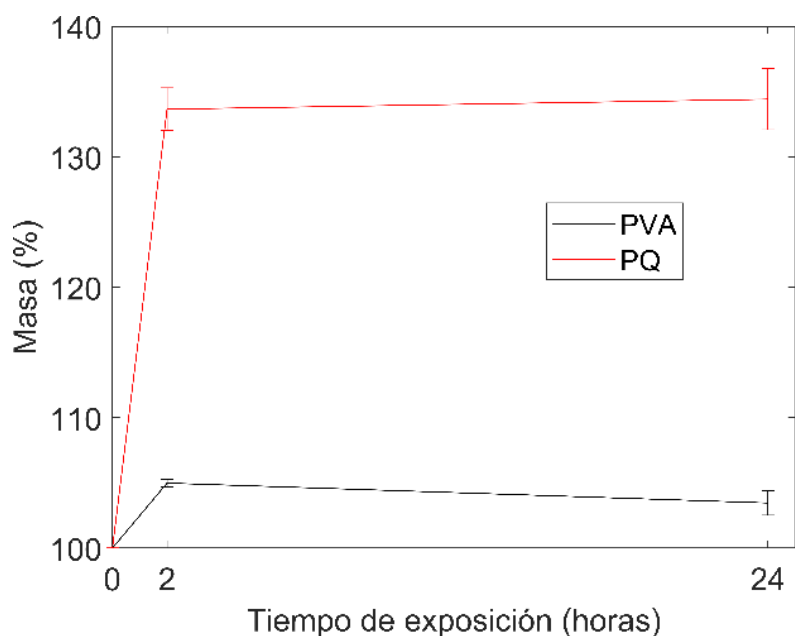


Figura 7. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA y PVA-quitosano en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar.

4.2.3 CONSIDERACIONES FINALES

Para cumplir el objetivo de generar adhesión celular en los hidrogeles de PVA, se incluyeron macromoléculas en su estructura reportadas en la literatura por proporcionar puntos de anclaje celular.

Para corroborar que las macromoléculas disminuían la hidrofiliidad de los hidrogeles de PVA, reconocida como una de las causantes de la incapacidad del hidrogel para permitir adhesión celular, se realizó una prueba de ángulo de contacto donde se verificó que la gelatina y el quitosano fueron las macromoléculas que generaron mayor hidrofobicidad en la superficie del xerogel. A pesar de ello, al no ser este el único mecanismo de la adhesión celular, todas las macromoléculas continuaron en el siguiente experimento.

Se llevó a cabo una prueba de viabilidad celular como primer paso para evaluar la capacidad de los hidrogeles para la adhesión celular. Los hidrogeles con fibroína exhibieron una respuesta citotóxica, que al parecer se debe a subproductos tóxicos derivados de la degradación, por lo tanto, este material se descartó para la prueba de adhesión celular.

Los hidrogeles con quitosano permitieron la mayor adhesión celular evaluada, con valores de porcentaje de confluencia de 8.27 ± 2.54 % frente a 1.42 ± 0.15 % de los hidrogeles con gelatina y 1.94 ± 0.65 % de los hidrogeles con colágeno. Este resultado parece no solo depender de los puntos de anclaje celular, sino que también coincide con los resultados de ángulo de contacto, así que es posible que la disminución de la hidrofiliidad sea parte del mecanismo de adhesión celular.

La cinética de degradación y la capacidad de absorción de agua de los hidrogeles de *PVA-quitosano* comprometen la integridad física de su estructura. Por lo tanto, estos hidrogeles necesitan una modificación que permita mejorar su estabilidad en soluciones acuosas, lo cual se abordará en la siguiente sección.

Sección 2

4.3 EFECTO DE LOS ENTRECruzANTES DEL QUITOSANO EN LAS PROPIEDADES DEL HIDROGEL

4.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

PVA Polivinil alcohol Mw 89 a 98 kDa, 99+% hidrolizado, CAS 9002-89-5. Sigma-Aldrich®, USA

Ácido oxálico, CAS 144-62-7. Químicos LM™

Glutaraldehído 25 %, CAS 111-30-8. PanReac™

Citrato trisódico, CAS 6132-04-3. Sigma-Aldrich®

Tripolifosfato de sodio, CAS 7758-29-4. Sigma-Aldrich®

Etanol absoluto 99 %, CAS 64-17-5. EMSURE®

Calceína-AM, CAS 148504-34-1 Invitrogen™

Reactivos para fabricar PBS:

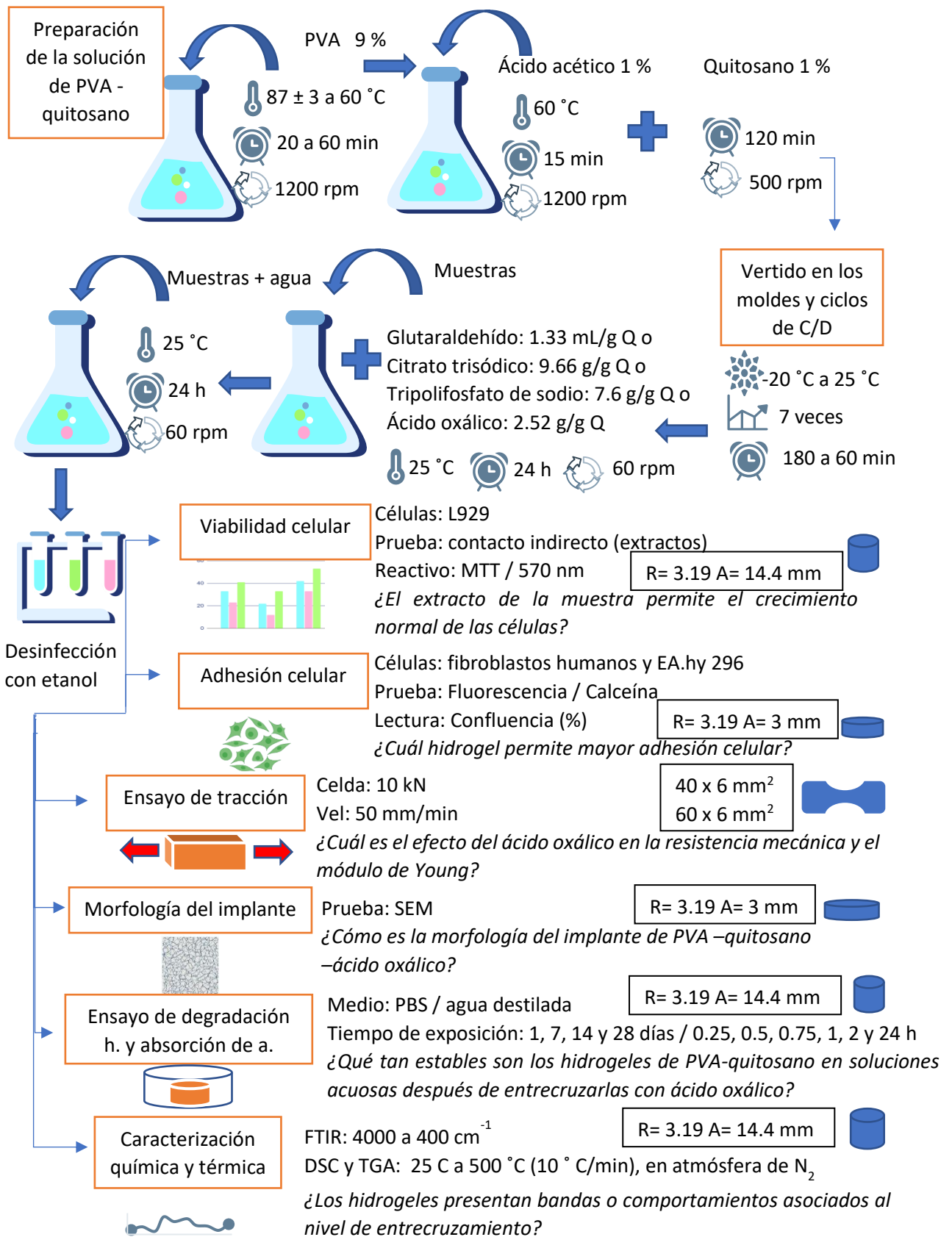
- Fosfato de sodio dibásico, anhidro, $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$, CAS 7558-79-4, J.T.Baker™
- Cloruro de sodio cristal, NaCl , CAS 7647-14-5, J.T.Baker™
- Fosfato de potasio monobásico, cristal, $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$, CAS 7778-77-0, J.T.Baker™
- Cloruro de potasio, KCl , CAS 7447-40-7, Panreac™

El resumen esquemático de la metodología de la sección 1 se presenta en la *Figura 8*.

Preparación de las muestras

Los hidrogeles de *PVA-quitosano* se prepararon como indica la sección 4.2.1 del presente capítulo. Una vez los hidrogeles finalizaron los ciclos de *C/D* se sumergieron en una solución del entrecruzante por 24 horas a 25 °C y 60 rpm, luego la solución se cambió por agua destilada para eliminar el exceso del entrecruzante y se dejó en agitación por 24 horas más. Finalmente, los hidrogeles se desinfectaron como lo indica la sección 4.2.1.

Las soluciones del entrecruzante se prepararon basados en el trabajo de Józwiak et al. [4], quienes encontraron la dosis mínima necesaria de cada reactivo para entrecruzar esferas de solo quitosano, teniendo en cuenta esto, el hecho de que los hidrogeles del presente estudio tienen 10 % de sólidos y experimentos previos de citotoxicidad, no presentados en el presente trabajo, se determinó que para el glutaraldehído se utilizaría 10 veces la dosis encontrada por Józwiak et al. [4], y para los demás entrecruzantes, 20 veces (ver *Tabla 2*).



¿Es posible incrementar la estabilidad de los hidrogeles de PVA -quitosano en soluciones acuosas?

Figura 8. Esquema de la metodología de la sección 2 capítulo 4

Para nombrar estas muestras se utilizó la marca para los hidrogeles de PVA-quitosano (PQ), seguido de un guion y una o dos letras mayúsculas indicando el entrecruzante como se observa en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Reactivos utilizados para entrecruzar los hidrogeles de PQ

| Código | Entrecruzante | Cantidad de entrecruzante por cada gramo de quitosano |
|---------------|-------------------------|--|
| PQ-G | Glutaraldehído | 1.30 mL |
| PQ-TP | Tripolifosfato de sodio | 2.76 g |
| PQ-AO | Ácido oxálico | 2.52 g |
| PQ-CT | Citrato trisódico | 9.66 g |

4.3.1.1 Viabilidad celular

Este ensayo se realizó según la norma *ISO-10993* [10]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.3.

4.3.1.2 Adhesión celular

El ensayo se realizó como indica la sección 4.2.1.4, sin las muestras de PVA como control. Con la adición de *CE EA.hy 926* en hidrogeles independientes a los sembrados con fibroblastos humanos.

4.3.1.3 Comportamiento mecánico

Este ensayo se basó en la norma *ASTM D638* [20]. Se utilizaron probetas de hidrogel de PVA con cuello para minimizar el fallo en la mordaza, con una zona estrecha de 40 mm de largo, que se reduce de 20 a 6 mm en una zona con 10 mm de largo en la sección más estrecha, el espesor de toda la probeta fue de 3.5 mm. Los ensayos mecánicos se realizaron por tracción en una máquina de ensayos universales Shimadzu® AG-X con una celda de 10 kN a 50 mm/min hasta llegar al fallo. El tratamiento de las muestras y el procesamiento de los datos se realizó como en la sección 3.3.1.5, con gráficas hasta 84 y 112 % de deformación para muestras PQ y PQ-AO respectivamente; de acuerdo con las deformaciones máximas que alcanzaron las probetas en conjunto. Para el módulo de Young, se registraron dos conjuntos de datos, uno entre 10 y 20 % de elongación y otro entre 50 y 80 %, los resultados son presentados en una gráfica de barras junto a la resistencia máxima obtenida. El *valor-n* fue de 10.

4.3.1.4 Morfología del implante

Esta prueba se realizó por microfotografía SEM en un equipo JEOL JSM-7100F, para identificar la morfología superficial del implante ya que este tiene relevancia con respecto a la interacción del implante con el ambiente biológico circundante. Las muestras se deshidrataron en una cámara de clima controlado Memmert® HPP 110, durante 6 horas a 30 °C y 10 % de humedad y se recubrieron con oro antes de observarlas en el SEM.

4.3.1.5 Degradación hidrolítica y absorción de agua

Degradación hidrolítica

Este ensayo se basó en la norma *ASTM F1635* [11]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.4, incluido el PBS como medio de degradación y tiempos de exposición al medio de 1, 7, 14 y 21 días. El tratamiento para retirar las sales de los hidrogeles fue como el descrito en la sección 4.2.1.5. Se realizaron y graficaron tanto medias de las masas saturadas como de las masas secas. El procesamiento de las muestras se realizó como indica la sección 4.2.1.5.

Absorción de agua

Este ensayo se basó en la norma *ASTM D570* [12]. Las muestras y las condiciones de la prueba utilizadas corresponden a lo descrito en la sección 3.3.1.4. A excepción del tiempo de exposición que fue de 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 24 horas.

4.3.1.6. Caracterización química y térmica

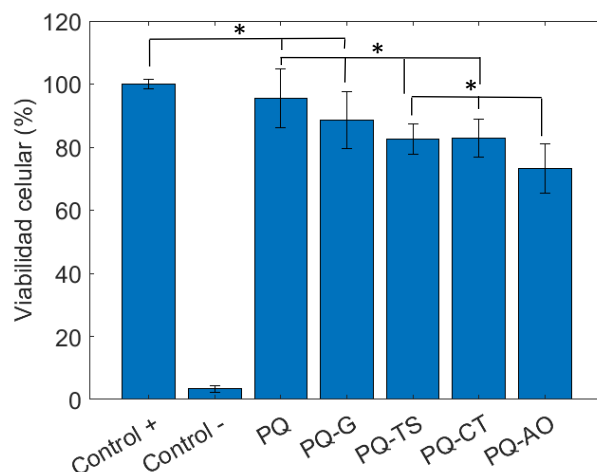
Se obtuvieron espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de hidrogeles de PVA, PQ y PQ-AO, en un rango de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , en un equipo IR-Tracer 100 Shimadzu®, para el ensayo los hidrogeles se prepararon extrayendo el exceso de agua en una cámara de clima controlado a 37 °C y 10 % de humedad relativa por 6 horas. Para el procesamiento de los datos se definió como línea base el mayor valor de transmitancia obtenido en cada curva, finalmente los datos se normalizaron con respecto a la banda 3260 cm^{-1} y se graficaron en una curva intensidad vs número de onda.

Los ensayos de DSC y TGA se realizaron en simultáneo en un equipo SDT Q600 TA Instruments™, en un intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, a 10 °C/min, con un periodo de estabilización de 30 minutos a 60 °C en una atmósfera de N₂. Los datos se graficaron en curvas de flujo de calor vs tiempo y porcentaje de peso vs temperatura. Estos ensayos se realizaron para identificar modificaciones químicas y físicas de los hidrogeles a través de cambios en la entalpía y fases de transición en el hidrogel, respectivamente.

4.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.2.1 Viabilidad celular

En la *Figura 9* se muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células *L929* después de ser expuestas durante 24 horas a extractos de hidrogeles de *PVA-quitosano* entrecruzados. Se observa que todas las muestras presentan una viabilidad celular superior al 70 %. Por lo tanto, todos los hidrogeles entrecruzados se utilizaron para el experimento de adhesión celular.



*Figura 9. Viabilidad celular de las células L929 expuestas 24 horas a extractos de hidrogeles de PVA-quitosano entrecruzados. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.*

Estos resultados confirman que los entrecruzantes utilizados para el quitosano, y el procesamiento realizado para dicho fin, no generan un efecto citotóxico del sustrato obtenido sobre las células, estos resultados eran los esperados con respecto a la literatura.

4.3.2.2 Adhesión celular

En la *Figura 10*, se observan los porcentajes de confluencia de fibroblastos humanos para todas las muestras y *CE EA.hy 926* para los hidrogeles entrecruzados, después de 24 horas de haber sido sembradas sobre los hidrogeles. Todos los hidrogeles permiten la adhesión celular, no obstante, solo el entrecruzante AO conserva un porcentaje de adhesión similar al hidrogel de PQ, que era de aproximadamente 8 %, llegando a valores de 14 % con la evaluación en fibroblastos.

El análisis ANOVA de estos datos reveló que la adhesión celular no mostró diferencias significativas entre los tipos de células sembradas, pero si en el tipo de entrecruzante utilizado. Esto sugiere que el efecto del ácido oxálico sobre la adhesión celular es significativamente mayor (y positivo para la aplicación médica) que los demás entrecruzantes. Además, no difiere del porcentaje de adhesión alcanzado con el quitosano sin entrecruzar. *Por lo tanto, el material de PVA- quitosano- ácido oxálico fue elegido para las siguientes secciones experimentales.*

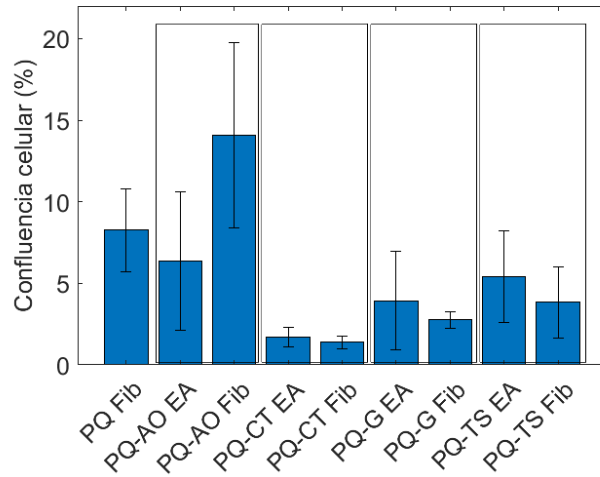


Figura 10. Área ocupada por las células en porcentaje, los recuadros presentes separan las muestras que tienen la misma macromolécula. Prueba realizada con 3 réplicas y 3 repeticiones, las barras de error representan la desviación estándar, no hay comparación de tratamiento a tratamiento.

Estos resultados se deben a que posiblemente el ácido oxálico logró un mayor grado de entrecruzamiento, haciendo que el quitosano esté de forma más estable en los hidrogeles de PVA y por lo tanto favoreciendo la adhesión celular.

4.3.2.3 Comportamiento mecánico

En la *Figura 11*, se presentan las curvas de tracción de las probetas de PQ y PQ-AO, hasta la máxima elongación obtenida en la probeta menos deformable evaluada. Se observa que las muestras PQ-AO tienen mayor capacidad de deformación y alcanzan valores mayores de resistencia mecánica que PQ, esto se debe a que el entrecruzamiento del AO mejoró la unión entre las moléculas [4] y por lo tanto la resistencia mecánica. Adicionalmente parece que el AO generó un efecto viscoelástico similar al tejido nativo, el cual puede observarse en la sección 5.2.4 del capítulo 5.

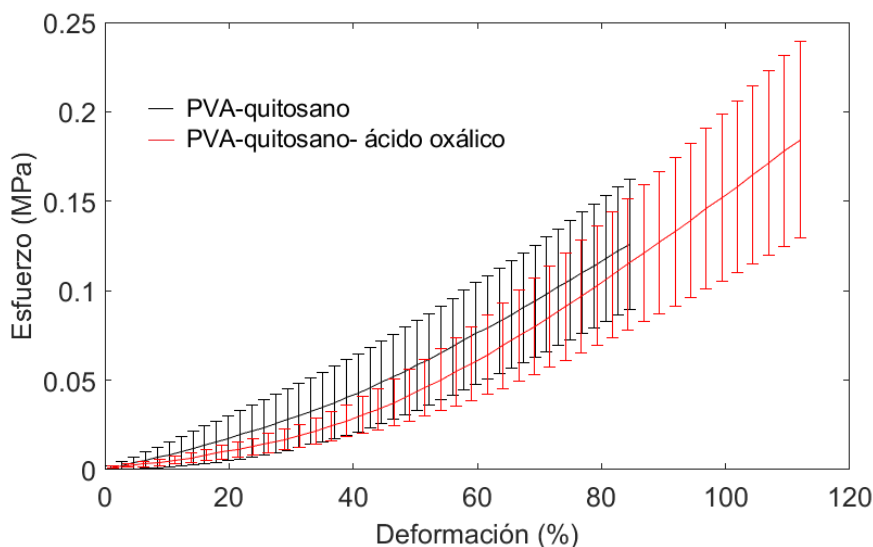


Figura 11. Curvas esfuerzo vs deformación promedio de los tratamientos experimentales con barras de error promediadas cada dos por ciento de deformación. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

En teoría, el quitosano puede ser entrecruzado iónicamente con cualquier compuesto químico que tenga al menos dos grupos funcionales que generen una carga negativa en el agua [4]. El ácido oxálico, al ionizarse en agua, forma iones oxalato que tienen una carga negativa de -2. Los grupos carboxilo (-COOH) se ionizan para formar iones carboxilato (-COO-) y protones (H+), lo que le da al ácido oxálico una carga neta negativa en agua, permitiendo el entrecruzamiento del quitosano [4].

En la *Figura 12* se observan los valores para la resistencia máxima obtenida en cada tratamiento sin el límite de deformación de la probeta menos deformable de la *Figura 11* y los módulos de Young 1 y 2 tomados entre 10 y 20 % de deformación para 1 y entre 50 y 80 % para 2, como las zonas *inicial* y *final* de la curva, definidas así por los puntos de inflexión encontrados en las curvas. En la resistencia máxima se observa que el efecto del entrecruzante generó un de 0.1 MPa, lo que indica un 150 % más respecto a las probetas sin entrecruzante. El efecto viscoelástico de las probetas PQ-AO se verifica nuevamente con el mayor cambio de valores entre los módulos de Young 1 y 2.

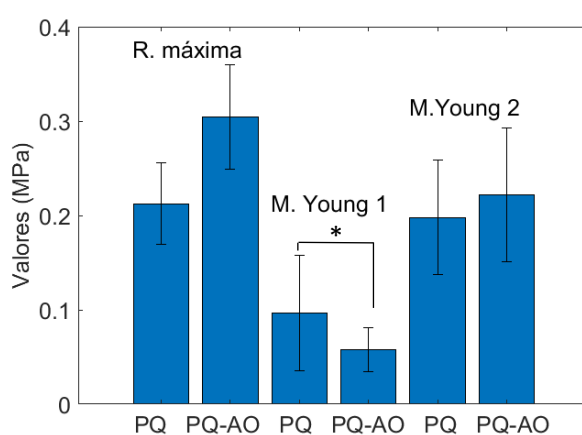


Figura 12. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región 1 y en la región 2 de las muestras de PVA-quitosano y PVA-quitosano ácido oxálico respectivamente. N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con ANOVA.

El análisis ANOVA de estos datos reveló que el módulo de Young en la zona 1 no mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos. Sin embargo, la resistencia máxima y el módulo de Young en la zona 2 sí presentaron diferencias significativas, lo que sugiere que el uso del entrecruzante mejora considerablemente la resistencia mecánica y, por lo tanto, potencia su uso en la aplicación médica. *Por lo tanto, el entrecruzamiento generado por el ácido oxálico mejoró la resistencia mecánica de las probetas.*

4.3.2.4 Morfología del implante

En la *Figura 13* se observan las microfotografías SEM de hidrogeles de PVA -quitosano -ácido oxálico a 3.000, 4.000 y 10.000 x, se observa una morfología relativamente lisa y homogénea sin poros observados a las magnificaciones evaluadas, no es posible distinguir el PVA del quitosano. Se observan líneas que pueden corresponder a grandes agrupaciones de cadenas poliméricas (señaladas con las flechas) que están en relieve, posiblemente al desplazamiento de estas que ocurrió en los ciclos de congelación.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Deepak et al. [21], en 2018. Sin embargo, la mayoría de los autores reportan películas de PVA-quitosano con porosidad, como el caso de Parparita

et al. [22], esta porosidad parece ser causada por la preparación de la muestra antes de su observación, ya que estos autores liofilizaron las muestras, lo que puede generar porosidad por el arrastre de agua que realiza el equipo.

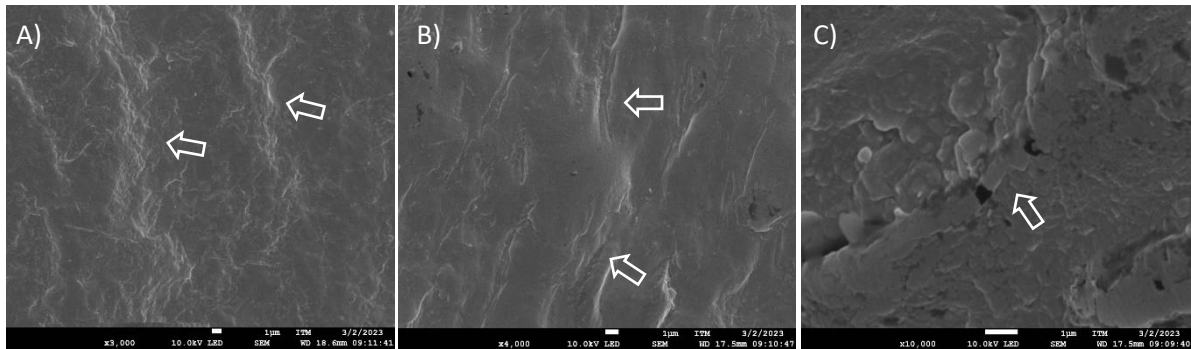


Figura 13. Fotografías SEM del implante PQ-AO a A) 3.000 x, B) 4.000 x y C) 10.000 x. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliificaciones.

Debido a la morfología es posible que las células no puedan penetrar el material sin que exista una degradación o erosión de este, se plantea que la rugosidad observada a 10.000 x propicie el anclaje de las células.

4.3.2.5 Degradación hidrolítica y absorción de agua

En la Figura 14 se presentan las curvas de cambio de masa de los hidrogeles de PQ y PQ-AO medidos con el método de saturación (hidratados) y con las muestras secas como indica la norma ASTM F1635, donde se observa que tanto en las muestras hidratadas como en las secas los hidrogeles de PVA-quitosano sufrieron una pérdida de masa mayor que la de los hidrogeles entrecruzados, que para el día 21 corresponden a 26.6 y 41.6 % para las muestras hidratadas y a 1.39 y 2.3 % para las muestras secas ; esto se debe a que el entrecruzamiento permite vincular mejor las moléculas a la estructura y por lo tanto no se desprenden en la misma medida que las no entrecruzadas. Dicho mecanismo de reticulación del quitosano en presencia del ácido oxálico está expuesto en la sección 4.3.2.3.

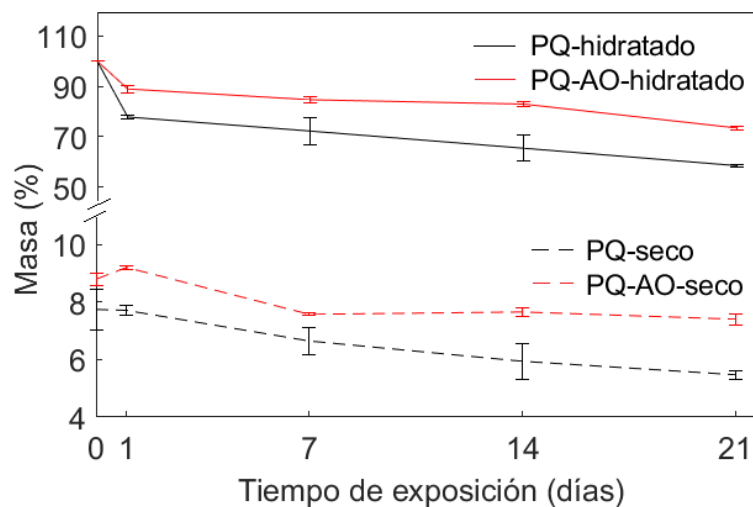


Figura 14. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA-quitosano y PVA-quitosano-ácido oxálico en el ensayo de degradación hidrolítica, tanto con muestras hidratadas como deshidratadas. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

El método de masa saturada no presentó diferencias en la tendencia de las curvas con respecto al método de la masa seca, validando los resultados del método de masa saturada ante la norma *ASTM F1635*. Adicionalmente se puede observar que la masa seca corresponde a 10 % o menos de la masa saturada, esto se debe a que el porcentaje de sólidos de los hidrogeles es de 10 % al momento de la fabricación, pero que disminuye debido a los procesos de absorción de agua que ocurren en el proceso de desinfección, de hecho, la muestra PQ, que absorbe mayor cantidad de agua debido a un grado de entrecruzamiento menor, presenta un porcentaje de masa menor en el peso seco, debido al fenómeno explicado.

En la *Figura 15* se muestran las curvas de cambio de masa en porcentaje de las muestras sometidas al ensayo de absorción de agua. Se observa que el entrecruzante logra evitar el cambio volumétrico de la probeta al solo permitir un incremento de masa de 3.05 ± 0.81 % comparado con 58.56 ± 8.91 % del hidrogel PQ sin entrecruzante a una hora de exposición.

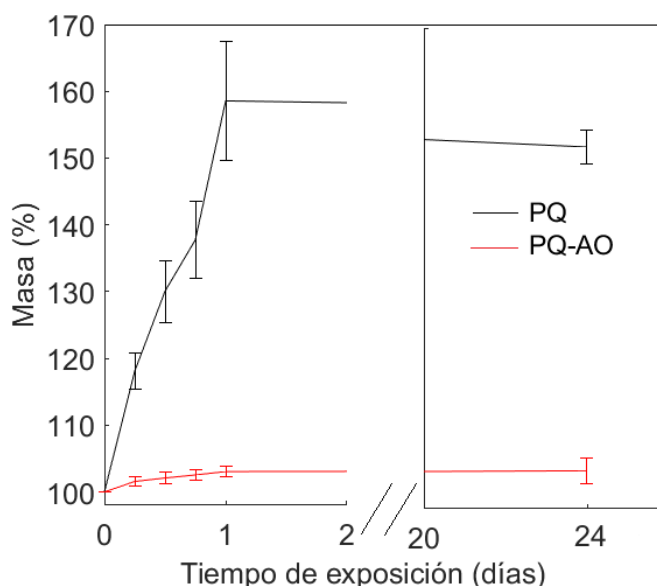


Figura 15. Gráfica de cambio de masa de las muestras de PVA -quitosano y PVA -quitosano -ácido oxálico en el ensayo de absorción de agua. N=3, las barras de error representan la desviación estándar.

Por lo tanto, el entrecruzante ácido oxálico logra recuperar las propiedades de estabilidad del hidrogel PVA-quitosano sin afectar la adhesión celular

4.3.2.6. Caracterización química y térmica

En la *Figura 16* se observa una banda en 3292 cm^{-1} que se atribuye tanto al estiramiento O-H de los tres hidrogeles como al estiramiento N-H del quitosano y a enlaces de hidrógeno [23][24]. La banda 2879 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-H de los grupos CH_2 y CH, presentes tanto en PVA como en quitosano [23][24], en 1365 cm^{-1} aparece una banda que corresponde a grupos de deformación CH_2 [23][24]. La banda en 1064 cm^{-1} pertenecen al anillo glicosídico C-O-C que implica el estiramiento C-O) [23][24].

En la banda de 1365 cm^{-1} se observan hombros que pueden sugerir la presencia de bandas solapadas que pueden ser: alrededor de 1660 cm^{-1} (estiramiento C=O del grupo C=O-NHR) y 1.598 cm^{-1} (deformación NH_2) del quitosano puro que deben desplazarse a regiones de número de onda inferior, debido a la interacción con los ácidos carboxílicos [24], las intensidades y posiciones de estas bandas dependen de las concentraciones y la masa de los ácidos orgánicos como el ácido oxálico [24], el cual se usó como agente entrecruzante. Sin embargo, estos hombros se observan en las tres curvas, incluida el PVA puro, no se observa el desplazamiento que debe generar el ácido oxálico, esto cuando se compara la banda del espectro azul con respecto al espectro rojo. No es claro porque no se observa un efecto evidente del entrecruzante, ya que en las pruebas como tracción y degradación queda claro que si existe un efecto de entrecruzamiento del polímero.

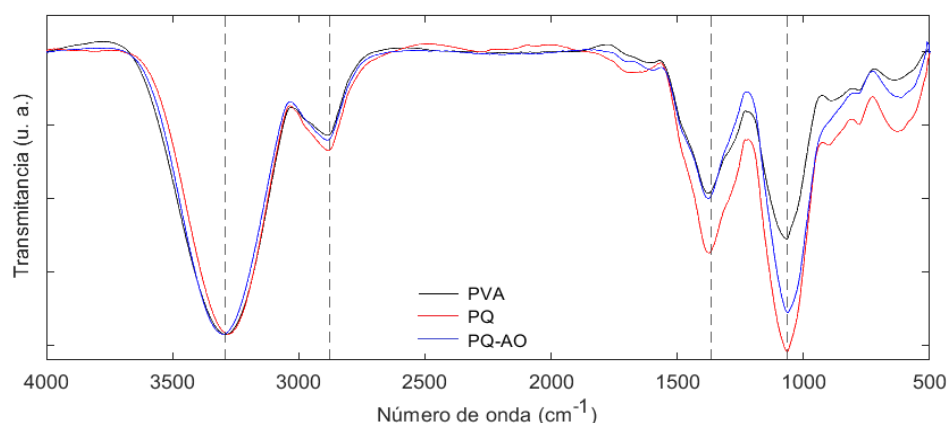


Figura 16. Espectro infrarrojo de hidrogeles deshidratados de PVA, PQ y PQ-AO. N=1.

En la Figura 17 se observan las curvas obtenidas en la caracterización térmica. En la Figura 17 A) se presenta el TGA de hidrogeles de solo PVA, PQ y PQ-AO. Se pueden observar tres pérdidas de masa denominadas 1, 2 y 3.

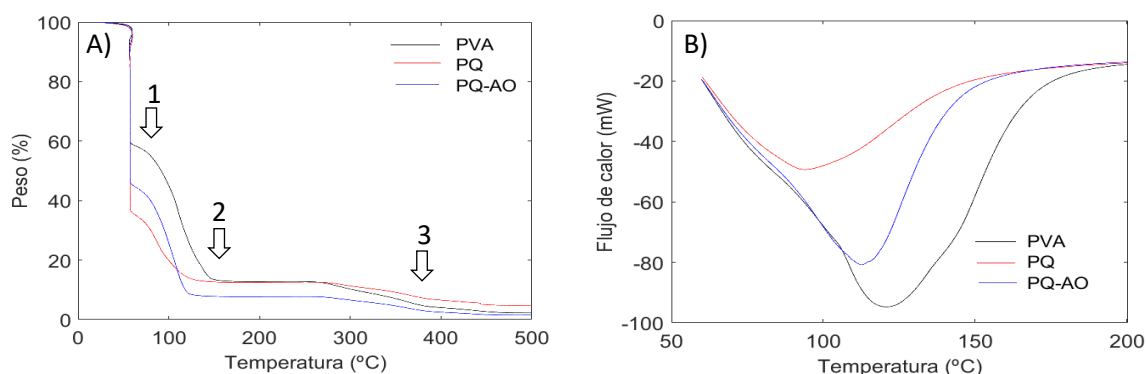


Figura 17. Curvas térmicas de las muestras PVA, PQ y PQ-AO. A) Análisis termogravimétrico y B) Calorimetría diferencial de barrido. N=1.

Según la literatura, estas tres pérdidas de masa características de los hidrogeles de PVA corresponden a una pérdida de agua libre o humedad, una descomposición de las cadenas laterales del polímero o reacción de deshidrolización y a la degradación de la cadena principal del polímero [25][26], respectivamente.

Todas las curvas de la Figura 17 A) tienen los tres momentos de pérdida de masa del PVA, probablemente porque es la molécula con mayor presencia en el volumen total de cada material. No obstante, la literatura indica que el quitosano se degrada a menor temperatura, de 250 °C a 320 °C en

vez de 250 °C a 500 °C como ocurre con el PVA [27] y esto podría explicar que los compuestos con quitosano empiecen procesos de degradación a menor temperatura que el hidrogel de PVA solo.

En la *Figura 17 B*) se presenta la curva DSC de los hidrogeles de PVA, PQ y PQ-AO. Se puede determinar que el punto de fusión ocurrió para PQ en 93.9 °C, para PQ-AO en 112.3 °C y para PVA en 120.3 °C; estos valores de temperatura no coinciden con la literatura [28][29]. De las temperaturas de fusión obtenidas se puede analizar que el ácido oxálico contribuyó con una mejora en la organización de las redes del hidrogel, es decir, entrecruzó cadenas poliméricas, aunque este entrecruzamiento sigue siendo inferior que en los hidrogeles sin quitosano.

4.4 CONSIDERACIONES FINALES

En la sección 1 se incluyeron cuatro macromoléculas en los hidrogeles de PVA para generar adhesión celular, la fibroína fue la primera en ser descartada por presentar citotoxicidad. Tanto en la hidrofobicidad como en la adhesión celular los hidrogeles con quitosano fueron los que mejores propiedades exhibieron. Sin embargo, dichos hidrogeles mostraron inestabilidad en soluciones acuosas, por lo tanto, la segunda sección se desarrolló incorporando agentes entrecruzantes en los hidrogeles de PVA-*quitosano* para incrementar su estabilidad.

Se corroboró que ninguno de los entrecruzantes exhibió comportamientos citotóxicos a través de una prueba de viabilidad celular. En la prueba de adhesión celular el ácido oxálico fue el único agente que permitió la adhesión de las células en igual medida que los hidrogeles de PVA-*quitosano*, en consecuencia, el tratamiento elegido para continuar con la experimentación fue PVA -*quitosano* -*ácido oxálico* ya que no afectó las propiedades biológicas adquiridas en la sección 1.

Antes de corroborar que el agente entrecruzante mejoraba la estabilidad de los hidrogeles en soluciones acuosas, se realizaron pruebas de resistencia mecánica a tracción para comparar el efecto del agente entrecruzante con la ausencia de este y pruebas morfológicas para conocer la superficie del hidrogel. En la prueba de tracción se corroboró que el entrecruzante reforzó la reticulación de las moléculas ya que incrementó de manera significativa la resistencia mecánica y el módulo de Young en la zona de mayor elongación, además permitió una mayor elongación de las probetas. En las pruebas morfológicas se determinó que la superficie brinda una rugosidad que puede favorecer el anclaje celular más no la migración de las células al interior del hidrogel.

En las pruebas de degradación hidrolítica y absorción de agua se pudo corroborar que el entrecruzante mejoró de forma significativa la estabilidad, ya que incrementó el porcentaje de masa respecto a los hidrogeles de PQ, además de conservar la masa en las pruebas de absorción.

Finalmente, en las pruebas térmicas se pudo corroborar que el sustrato PQ-AO tiene una mayor organización en las redes poliméricas que el hidrogel de PQ, pero no más que los hidrogeles de PVA solo.

En conclusión, *fue posible mejorar la capacidad de adherencia celular del hidrogel de PVA con quitosano, sin perder las propiedades alcanzadas, al utilizar el ácido oxálico como entrecruzante.*

4.5 REFERENCIAS

- [1] R. Rodríguez-Rodríguez, H. Espinosa-Andrews, C. Velasquillo-Martínez, and Z. Y. García-Carvajal, "Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1080/00914037.2019.1581780.
- [2] R. Hou et al., "Structure and properties of PVA/silk fibroin hydrogels and their effects on growth behavior of various cell types," *Mater. Res. Express*, vol. 7, no. 1, 2020, doi: 10.1088/2053-1591/ab69c4.
- [3] A. Shamloo et al., "Fabrication and evaluation of chitosan/gelatin/PVA hydrogel incorporating honey for wound healing applications: An in vitro, in vivo study," *Int. J. Pharm.*, vol. 592, no. November 2020, p. 120068, 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120068.
- [4] T. Józwiak, U. Filipkowska, P. Szymczyk, J. Rodziewicz, and A. Mielcarek, "Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye," *React. Funct. Polym.*, vol. 114, pp. 58–74, 2017, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007.
- [5] J. M. Frick Pavoni, N. Z. dos Santos, I. C. May, L. D. Pollo, and I. C. Tessaro, "Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 2, pp. 981–1000, 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03140-4.
- [6] F. H. Lyn, C. P. Tan, R. M. Zawawi, and Z. A. Nur Hanani, "Enhancing the mechanical and barrier properties of chitosan/graphene oxide composite films using trisodium citrate and sodium tripolyphosphate crosslinkers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 138, no. 26, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1002/app.50618.
- [7] B. Moghadas, A. Solouk, and D. Sadeghi, "Development of chitosan membrane using non-toxic crosslinkers for potential wound dressing applications," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 9, pp. 4919–4929, 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03352-8.
- [8] E. Echeverri, D. O. Grajales, S. Gutiérrez, and C. P. Ossa, "Effective sericin-fibroin separation from Bombyx mori silkworms fibers and low-cost salt removal from fibroin solution," *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, no. 94, pp. 97–101, 2020, [Online]. Available: <https://www.doi.org/10.17533/udea.redin.20190731>.
- [9] © ASTM International, "Standard Practice for Surface Wettability of Coatings, Substrates and Pigments by Advancing Contact Angle Measurement," *Annu. B. ASTM Stand.*, vol. 08, no. Reapproved 2013, pp. 1–3, 2008, doi: 10.1520/D7334-08R22.Copyright.
- [10] International Organization for Standardization (ISO), *Biological evaluation of medical devices*. 2009.
- [11] © ASTM International, *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*. 2016, pp. 1–5.
- [12] © ASTM International, *Standard Test Method for Water Absorption of Plastics*. 2010, pp. 25–28.
- [13] S. Cai, C. Wu, W. Yang, W. Liang, H. Yu, and L. Liu, "Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors," *Nanotechnol. Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 971–989, 2020, doi: 10.1515/ntrev-2020-0076.
- [14] Y. Luo, X. Pan, Y. Ling, X. Wang, and R. Sun, "Facile fabrication of chitosan active film with xylan via direct immersion," *Cellulose*, vol. 21, no. 3, pp. 1873–1883, 2014, doi: 10.1007/s10570-013-0156-4.

- [15] D. Liu, M. Nikoo, G. Boran, P. Zhou, and J. M. Regenstein, "Collagen and gelatin," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 6, pp. 527–557, 2015, doi: 10.1146/annurev-food-031414-111800.
- [16] S. Puspita, S. Sunarintyas, C. Anwar, E. Mulyawati, and M. HNE Soesatyo, "Amino acid identification of Bombyx mori fibroin cocoon as biomaterial using liquid chromatography/mass spectrometry," *BIO Web Conf.*, vol. 28, p. 02001, 2020, doi: 10.1051/bioconf/20202802001.
- [17] F. Coelho et al., "Silk fibroin/hydroxyapatite composite membranes: Production, characterization and toxicity evaluation," *Toxicol. Vitro.*, vol. 62, no. October 2019, 2020, doi: 10.1016/j.tiv.2019.104670.
- [18] M. Mozafari et al., "Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering," *Int. J. Nanomedicine*, no. May 2014, p. 25, 2012, doi: 10.2147/ijn.s25376.
- [19] S. Gupta, S. Goswami, and A. Sinha, "A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels," *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 1, 2012, doi: 10.1088/1748-6041/7/1/015006.
- [20] © ASTM International, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. 2014, pp. 1–15.
- [21] D. Kasai, R. Chougale, S. Masti, R. Chalannavar, R. B. Malabadi, and R. Gani, "Influence of Syzygium cumini leaves extract on morphological, thermal, mechanical, and antimicrobial properties of PVA and PVA/chitosan blend films," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 17, 2018, doi: 10.1002/app.46188.
- [22] E. Părpăriță, C. N. Cheaburu, S. F. Pațachia, and C. Vasile, "Polyvinyl alcohol/chitosan/montmorillonite nanocomposites preparation by freeze/thaw cycles and characterization," *Acta Chem. Iasi*, vol. 22, no. 2, pp. 75–96, 2014, doi: 10.2478/achi-2014-0008.
- [23] D. M. Suflet et al., "Dual cross-linked chitosan/pva hydrogels containing silver nanoparticles with antimicrobial properties," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091461.
- [24] A. Ghosh and M. A. Ali, "Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids," *J. Mater. Sci.*, vol. 47, no. 3, pp. 1196–1204, 2012, doi: 10.1007/s10853-011-5885-x.
- [25] B. Mahesh, D. Kathyayani, D. Channe Gowda, A. Sionkowska, and S. Ramakrishna, "Miscibility and thermal stability of synthetic glutamic acid comprising polypeptide with polyvinyl alcohol: Fabrication of nanofibrous electrospun membranes," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 281, no. February, p. 125847, 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2022.125847.
- [26] F. C. do Nascimento et al., "Formulation and characterization of crosslinked polyvinyl alcohol (PVA) membranes: effects of the crosslinking agents," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 2, pp. 917–929, 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03142-2.
- [27] P. Doondani, R. Jugade, V. Gomase, A. Shekhawat, A. Bambal, and S. Pandey, "Chitosan/Graphite/Polyvinyl Alcohol Magnetic Hydrogel Microspheres for Decontamination of Reactive Orange 16 Dye," *Water (Switzerland)*, vol. 14, no. 21, 2022, doi: 10.3390/w14213411.
- [28] S. Kumar, B. Krishnakumar, A. J. F. N. Sobral, and J. Koh, "Bio-based (chitosan/PVA/ZnO) nanocomposites film: Thermally stable and photoluminescence material for removal of organic dye," *Carbohydr. Polym.*, vol. 205, no. 1, pp. 559–564, 2019, [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861718313080>.
- [29] E. E. R. Gómez, J. H. M. Hernández, and J. E. D. Astaiza, "Development of a Chitosan/PVA/TiO2 nanocomposite for application as a solid polymeric electrolyte in fuel cells," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 8, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3390/POLYM12081691.

CAPÍTULO 5.

PROPIEDADES DE LOS IMPLANTES

5.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, el sustrato fabricado con *PVA-quitosano* y entrecruzado con ácido oxálico (PQ-AO) demostró una mayor capacidad de adhesión celular en comparación con otras combinaciones evaluadas, manteniendo las propiedades mecánicas obtenidas con el uso exclusivo de *PVA*.

En este capítulo se plantea la hipótesis de que *el sustrato PQ-AO tiene propiedades adecuadas para su uso en aplicaciones vasculares*. Para llevar a cabo dicho análisis, se realizó una comparación de las propiedades del sustrato con aortas porcinas y un implante comercial de *ePTFE*. Se comenzó evaluando la humectabilidad de los tres materiales, ya que se ha comprobado que esta propiedad se correlaciona con la adhesión celular. Los resultados arrojaron que los valores de humectabilidad del sustrato y las aortas porcinas eran similares entre sí.

Luego se evaluó la morfología superficial ya que esta propiedad también es determinante en la adhesión celular y todos los materiales evaluados presentaron superficies rugosas más no porosas, ideales para la adhesión y no migración de las células.

En el comportamiento mecánico se encontró que la rigidez del sustrato es menor y más cercana a las aortas porcinas que el implante comercial, el cual es significativamente rígido contribuyendo a una de las razones de fallo de dichos implantes comerciales por hiperplasia de la íntima, pero la resistencia mecánica máxima del sustrato es baja para la aplicación deseada y se hace necesario el uso de un mecanismo de refuerzo.

La morfología de las células adheridas al sustrato fueron acordes con su morfología natural en cultivo, indicando una buena respuesta a las señales que les suministra el sustrato, además su interacción con el sustrato incrementó la resistencia mecánica del mismo.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

PVA (Polivinil alcohol) Mw 89 a 98 kDa, 99+% hidrolizado, CAS 9002-89-5. Sigma-Aldrich®, USA

Quitosano de cáscara de camarón \geq 75 % desacetilado, CAS 9012-76-4. Sigma-Aldrich®

Ácido acético glacial 99, 5 %, CAS 64-19-7. BiopharChem®

Etanol absoluto 99 %, CAS 64-17-5. EMSURE®

Calceína-AM, CAS 148504-34-1 Invitrogen™

Implante vascular de ePTFE LifeSpan® de LeMaitre, referencia R06080C80

El resumen esquemático de la metodología de la sección 1 se presenta en la *Figura 1*.

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras del sustrato PQ-AO se realizó como se describe en la sección 4.2.1 del capítulo 4.

Preparación de las aortas porcinas

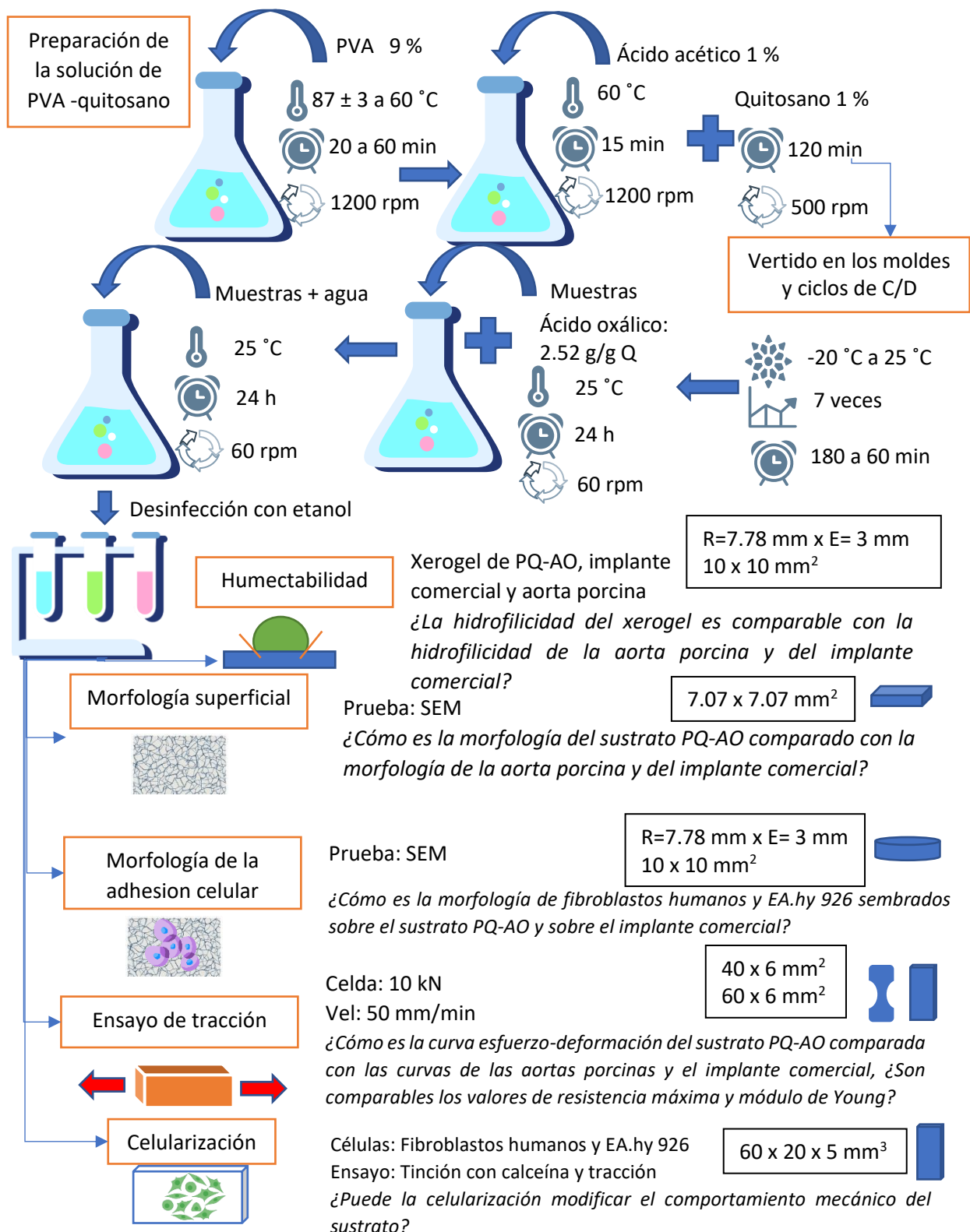
Las aortas porcinas fueron obtenidas de la Central Ganadera S.A. de la ciudad de Medellín. Las aortas fueron extraídas por personal especializado, cortando desde 0 a 20 cm en dirección distal desde el corazón de los cerdos y entregadas a los 20 minutos del sacrificio de los animales. Estas fueron depositadas en solución salina y transportadas inmediatamente al laboratorio de biomateriales en la Universidad de Antioquia donde se les retiró el tejido circundante y se recortaron de forma y tamaño según el ensayo a realizar, luego se almacenaron a 4 °C en solución salina durante toda la noche antes de realizar los ensayos de tracción, humectabilidad y micrografías SEM.

Preparación del implante vascular

El implante fue obtenido como sobrante de cirugía en el Hospital Alma Mater de Antioquia. Fabricado de ePTFE LifeSpan® de LeMaitre, referencia R06080C80

5.2.1 Humectabilidad

Para la preparación de las muestras se fabricaron cilindros de PQ-AO de radio 7.78 mm y 3 mm de altura y se sometieron al proceso de desinfección descrito en la sección 4.2.1, adicionalmente se cortaron secciones de 100 mm² de aortas porcinas e implantes comerciales de ePTFE. Se prepararon tres muestras de cada tratamiento. Todas las muestras se deshidrataron por 24 horas a 37 °C. Para la prueba de humectabilidad se utilizó un goniómetro DataPhysics® OCA 15 EC. La prueba se realizó a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) y una humedad relativa de 35 %. Las muestras eran ubicadas bajo la aguja hipodérmica dispensadora y una vez esta dispensaba 1 μ L de agua destilada a 0.5 μ L/s, las muestras se ponían en contacto directo con la gota para evitar que esta cayera sobre las muestras. Se midió el ángulo de ambos lados de la gota con un software SCA20 y se realizaron tres medidas en cada muestra.



¿Cómo son las propiedades del sustrato de PQ-AO como implante vascular frente a las aortas porcinas y a un implante comercial de ePTFE?

Figura 1. Esquema de la metodología del capítulo 5

Con los datos de ángulo de contacto se realizó un gráfico de barras en el software Matlab® con su respectiva desviación estándar y la significancia estadística fue evaluada con una comparación de rangos múltiples con el método LSD Fisher.

5.2.2 Morfología superficial

Se fabricaron o cortaron muestras de 50 mm² de área, las muestras fueron aortas porcinas frescas, implante comercial de *ePTFE* y sustrato de PQ-AO, las muestras fueron deshidratadas en una cámara de clima controlado Memmert® HPP 110, durante 6 horas a 30 °C y 10 % de humedad y se recubrieron con oro antes de observarlas en un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM-7100F.

5.2.3 Morfología de la adhesión celular

La morfología celular se observó como primer acercamiento a la funcionalidad de las células. Para la prueba se fabricaron muestras cilíndricas de 3.19 mm de radio y 3 mm de espesor del sustrato PQ-AO las cuales fueron desinfectadas con etanol como se describe en la sección 4.2.1 e incubadas con DMEM-F12 suplementado por 24 horas a 37 °C, adicionalmente se cortaron probetas de 100 mm² del implante comercial de *ePTFE*, las cuales fueron esterilizadas con óxido de etileno. Para la realización de la prueba, las muestras fueron depositadas en pozos de una caja de 24 pozos y sobre ellas se sembraron (no para los controles) 1×10^4 fibroblastos humanos o *EA.hy 926*, estas células fueron utilizadas para simular la túnica externa y la túnica íntima respectivamente, para la túnica media, ocupada principalmente por células de músculo liso, se dispuso de las propiedades del material desarrollado. Los tiempos utilizados para la exposición de las muestras a las células fueron de 24, 48 y 72 horas para el sustrato PQ-AO y de 24 horas para el implante comercial. Una vez pasado este tiempo, las muestras se sometieron a un proceso de fijación y deshidratación desarrollado en el Biobanco del Hospital Alma Mater, que consiste en sumergir las muestras en formol al 10 % durante 2 horas, lavar dos veces con lactato de Ringer antes de sumergirlas en glutaraldehído al 3 % durante 2 horas más; luego para la deshidratación las muestras se lavan dos veces en lactato de Ringer y se sumergen en etanol al 30 % durante 10 minutos, en los minutos 13 y 17 se cambia 1 mL de etanol al 30 % por 1 mL de etanol al 50 %, en los minutos 20, 23 y 27 se cambia 1 mL de la solución por 1 mL de etanol al 70 %, en los minutos 30, 33 y 37 el cambio se hace por etanol al 95 %, en los minutos 33, 37 y 40 por 99 % y finalmente a los 43 minutos se cambian 2 mL de la solución por 2 mL de etanol al 99 %. Una vez deshidratadas las muestras se llevan a secado de punto crítico en un equipo Tousimis® SAMDRI®-795. Para su observación las muestras fueron recubiertas con oro y observadas en un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM-6490LV.

5.2.4 Comportamiento mecánico

Este ensayo se basó en la norma *ASTM D638* [8]. El ensayo se aplicó en sustratos de PQ-AO, cortes transversales y longitudinales de aortas de cerdo frescas e implantes comerciales. El tratamiento de las muestras y procesamiento de datos se realizó como indica la sección 4.3.1.3 del capítulo 4, excepto para los implantes comerciales ya que estos tenían un diámetro interno de 6 mm, por lo tanto, el corte de las probetas se realizó de acuerdo con sus dimensiones. Las curvas de esfuerzo deformación se realizaron según la capacidad de elongación de cada grupo de muestras, 111 % para el corte

transversal de las aortas porcinas, 56 % para el corte longitudinal, 48 % para el implante comercial y 128 % para el sustrato de PQ-AO. Para el módulo de Young, se registraron dos conjuntos de datos, definidos como zona *inicial* y zona *final*, los porcentajes de deformación de cada una de estas zonas varió según el tipo de probeta, estos resultados son presentados en una gráfica de barras junto a la resistencia máxima obtenida. El *valor-n* fue de 10.

5.2.5 Celularización

Como respuesta al segundo objetivo del trabajo de grado, se realizó un proceso de celularización de los sustratos de PVA. Para ello se fabricaron probetas rectangulares de 60 x 20 x 5 mm, las cuales fueron desinfectadas con etanol como se describe en la sección 4.2.1 e incubadas con DMEM-F12 suplementado por 24 horas a 37 °C antes de la siembra de las células. Luego cada muestra fue ubicada dentro de un portalámina individual, al cual se le realizó una ventana a cada lado de 65 x 15 mm aproximadamente, de manera que ambas caras de la muestra estuvieron en contacto con el medio de cultivo, durante la exposición a las células. Una vez las muestras estuvieron listas se sembraron 2×10^4 de fibroblastos humanos por gota de 20 μ L de medio de cultivo y se depositaron 7 gotas a lo largo de las muestras, las cuales se incubaron a 37 °C por 4 horas antes de ser sumergidas en medio de cultivo. 24 horas después de sembrados los fibroblastos, las muestras se giraron y se realizó el mismo procedimiento en la otra cara de las muestras con *EA.hy 926*. Luego las muestras se incubaron a 37 °C por siete días.

Para determinar si las células se adhirieron, se realizó una tinción con calceína como se describe en la sección 4.2.1.4. Para determinar el efecto de la adhesión celular se realizó un ensayo de tracción, el tratamiento de las muestras y procesamiento de datos se realizó como indica la sección 4.3.1.3 del capítulo 4, con las probetas rectangulares. El *valor-n* fue de cinco tanto para las muestras celularizadas como para las muestras control.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Humectabilidad

En la *Figura 2* se observan los valores de ángulo de contacto de la cara interna de implantes comerciales de *ePTFE*, de aortas porcinas frescas y del sustrato de PQ-AO, los cuales corresponden a 123.5 ± 2.64 , 51.92 ± 4.23 y 57.90 ± 7.67 respectivamente.

No existen diferencias estadísticas significativas entre los valores de las aortas y el sustrato PQ-AO, esto permite que el sustrato desarrollado imite mejor la característica química de la superficie que el implante comercial. Además, se observa que el implante comercial tiene una superficie muy hidrofóbica ya que el ángulo de contacto en su superficie aumentó 136.9 % en comparación con las aortas porcinas.

La humectabilidad de las superficies puede afectar la adsorción de proteínas superficiales y por consiguiente la adhesión celular. Aunque las superficies hidrofílicas favorecen más la adhesión celular, una hidrofiliidad muy alta hace que las moléculas de agua próximas a la superficie del PVA presenten una estructura muy ordenada e impiden la adsorción de las proteínas de adhesión celular [1]. Por el

contrario, si la superficie es demasiado hidrófoba, las proteínas de la *ME* se adsorben en un estado desnaturalizado y su geometría se vuelve inadecuada para la unión celular. Por lo tanto, el ángulo de contacto ideal para la adhesión celular se ubica en un rango que puede variar según el tipo de célula, para los fibroblastos por ejemplo la máxima adherencia ocurre en ángulos entre 60 y 80 ° [2]. Para las células en general no ocurre adhesión celular en ángulos de contacto por debajo de 5 ° y por encima de 150 ° [2].

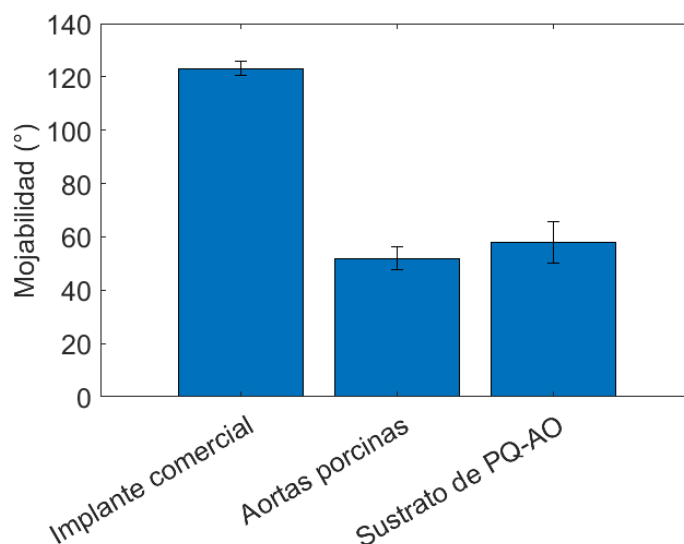


Figura 2. Gráfica de barras del ángulo de contacto medido en implantes comerciales, aortas porcinas y sustratos de PQ-AO. N=5, hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$ entre todos los tratamientos, realizado con ANOVA

Si bien tanto el implante comercial como el sustrato desarrollado están dentro del rango de adhesión celular, el sustrato PQ-AO posee valores más adecuados para células como los fibroblastos. De manera que *la humectabilidad del sustrato PQ-AO es una propiedad favorecedora de la adhesión celular, por encima de los implantes vasculares comerciales de ePTFE.*

5.3.2 Morfología superficial

En el capítulo anterior se observó que, para las magnificaciones evaluadas, la morfología del sustrato de PQ-AO era relativamente lisa, homogénea y sin porosidad, no fue posible distinguir el PVA del quitosano, mostrando la homogeneidad del material conformado. Además, se concluyó que, debido a la morfología, las células no podrían penetrar el material sin que exista una degradación o erosión de este, pero sí podrían anclarse a la superficie.

Durante el proceso de incubación del sustrato PQ-AO con células, los controles experimentales fueron sumergidos en medio de cultivo sin células, y fijados y deshidratados con la técnica explicada en la sección 5.3.1, estos presentaron una superficie erosionada.

La erosión observada en la *Figura 3* genera un relieve que podría facilitar la adhesión celular [3], y al igual que en la *Figura 13* del capítulo 4 no se observan poros que permitan el paso de las células a través de ellos.

En la *Figura 4*, se observa un proceso de delaminación que puede ocurrir por la deshidratación de la aorta, alguno autores han reportado imágenes similares de delaminación con otras causas como aneurisma toracocortical ascendente en el caso de Brunet et al. [4], quienes presentan imágenes muy similares a las encontradas en este trabajo.

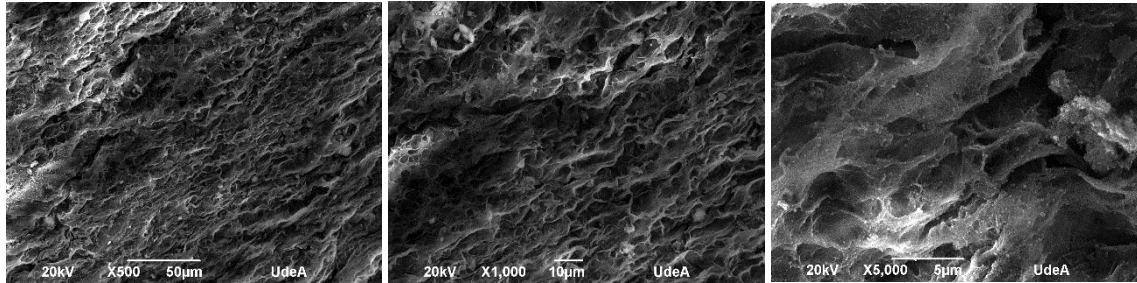


Figura 3. Fotografías SEM del sustrato de PQ-AO después de un proceso de incubación, fijación, deshidratación y secado de punto crítico a 500, 1.000 y 5.000 X. Donde se puede observar una erosión superficial. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliificaciones.

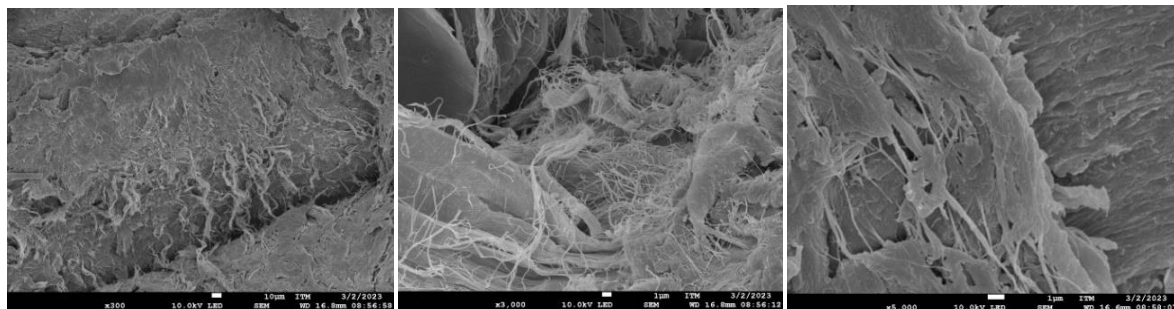


Figura 4. Fotografías SEM de la cara interna de una aorta porcina a 300, 3.000 y 5.000 x. Donde se puede observar la delaminación de las capas. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliificaciones.

En la *Figura 5*, se observan fibras sin un orden continuo, pero pueden ser asociadas a las fibras de colágeno ya que además de estar presentes en todas las capas de la aorta tienen una morfología estriada típica, tal como reportado por Gauvin et al. [5] que indicó que eran fibras de colágeno.

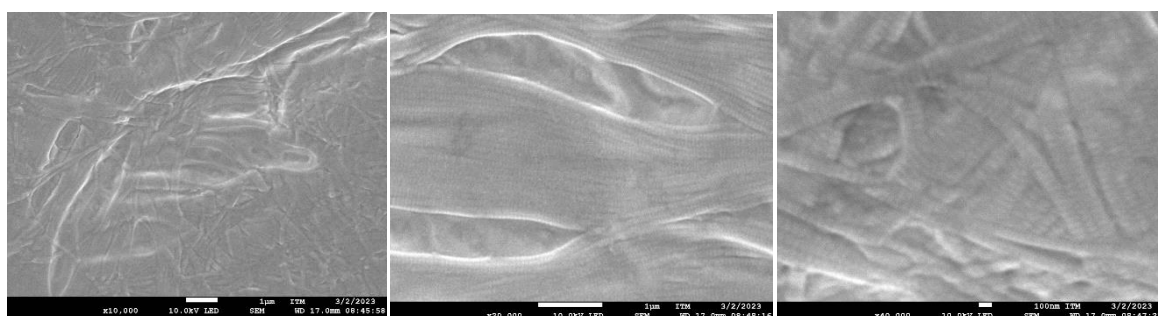


Figura 5. Fotografías SEM de la cara interna de una aorta porcina a 10.000, 20.000 y 40.000 x. Donde se pueden observar las fibras de colágeno. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 3 ampliificaciones.

En la *Figura 6* se observa la morfología del implante comercial donde resalta la estructura en forma de fibras, láminas y capas; la presencia del relieve que podría favorecer la adhesión celular, este hecho

puede suceder a pesar de los resultados de una alta hidrofobicidad encontrada en el ensayo de humectabilidad.

Todas las morfologías observadas, incluido *el sustrato desarrollado* tienen rugosidades favorecedoras de la adhesión celular y no tienen poros que permitan el paso de las células a través de ellos.

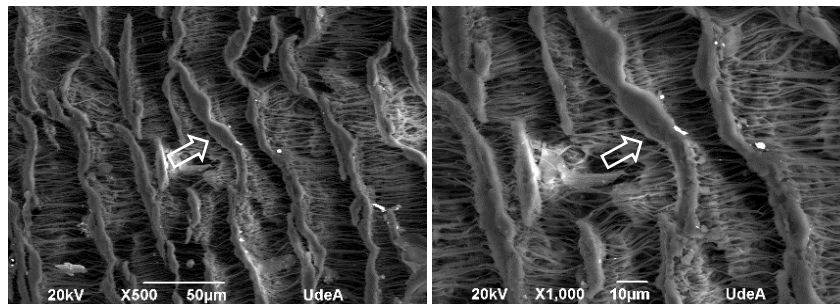


Figura 6. Fotografías SEM de la cara interna de los implantes comerciales de ePTFE donde se observa la formación de láminas y capas. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 ampliificaciones.

5.3.3 Morfología de la adhesión celular

En las Figuras 7 A) y B) se observan claramente a las células EA.hy 926 con morfología redondeada similar a la típica forma de adoquín de estas células, tiene además una confluencia significativamente mayor a la de los fibroblastos, un mayor tiempo de exposición podría haber facilitado una interacción entre ellas; pero no se encontraron diferencias significativas entre las fotografías de 24, 48 y 72 horas de exposición. En las Figuras 7 B) y D) se encuentran los fibroblastos humanos que presentan formas más aplanadas y alargadas similares a la morfología normal de los fibroblastos en cultivo, pero con una confluencia baja. Se corroboró entonces que las células se adhieren al sustrato con una morfología adecuada, pero puede ser necesario extender los tiempos de exposición para lograr una mayor confluencia.

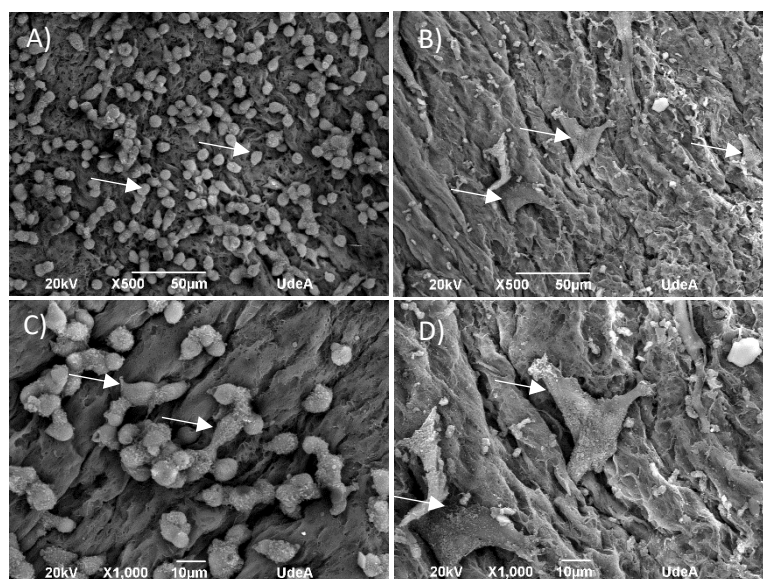


Figura 7. Fotografías SEM de sustrato PQ-AO después de 24 horas de exposición a A) y C) EA.hy 926 a 500 y 1000 X y B) y D) fibroblastos humanos a 500 y 1000 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 ampliificaciones.

En la *Figura 8 A)* se observa que no hay presencia de fibroblastos humanos en el implante comercial, es posible que esto se deba al grado de hidrofobicidad de este, pero para las células *EA.hy 926* observadas en las *Figuras 8 B)* y *C)* la hidrofobicidad no fue un impedimento para la adhesión celular, sin embargo, se observa como su morfología se ve afectada por la superficie favoreciendo el aplanamiento y formación de grandes lamelipodios en las células.

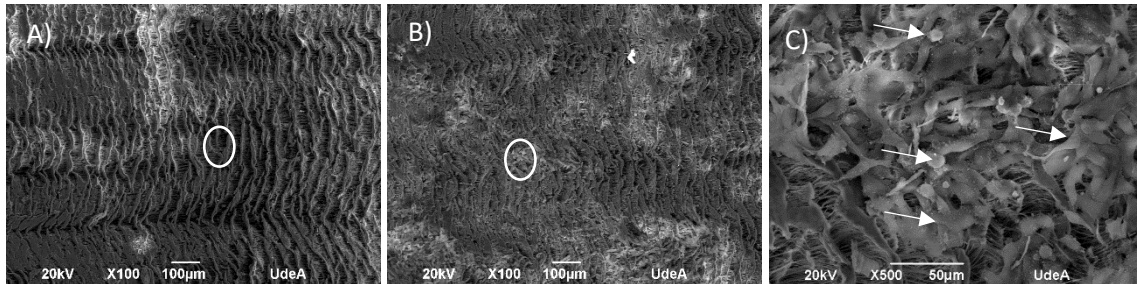


Figura 8. Fotografías SEM de implantes comerciales después de 24 horas de exposición a A) fibroblastos humanos – 100 X, B) y C) EA.hy 926 – 100 X y 500 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 1 y 2 ampliificaciones.

El sustrato desarrollado favorece la conservación de la morfología celular más adecuadamente que el implante.

La importancia de conservar la morfología natural de las células cuando se colocan en contacto con biomateriales sintéticos, como el desarrollado en este trabajo, radica en que las células regulan las estructuras nucleares y celulares, como la forma y el tamaño, en respuesta a señales del ambiente, como podrían ser las generadas por cuerpos extraños como los implantes. Se han observado cambios morfológicos en células alteradas como las cancerígenas, por lo tanto, la morfología es una señal del estado funcional de la célula [6].

5.3.4 Comportamiento mecánico

La *Figura 9* presenta las curvas promedio de esfuerzo-deformación de los cortes longitudinal y transversal de aortas de cerdo frescas, del sustrato de PQ-AO y de un implante comercial de *ePTFE* con 50 medidas de desviación estándar por curva. Para los cortes de las aortas, se observa que ambos tienen el mismo comportamiento hasta 40 % de deformación. El corte longitudinal incrementa su resistencia de 40 a 60 % de deformación con respecto al corte transversal probablemente por ser la resistencia mecánica final del material. El corte transversal puede deformarse 67 % más y resistir 37 % más respecto al corte longitudinal debido a la orientación de las fibras.

El implante comercial tiene una resistencia máxima de 16.11 MPa y una deformación máxima 53.33 %, resultado que no se observa en la gráfica por la ventana de visualización escogida, esto corresponde a 1583 % la resistencia máxima del corte transversal de la aorta. El sustrato PQ-AO por su parte presentó una resistencia máxima de 0.23 MPa, lo cual representa un 14 % de la resistencia máxima del corte transversal de la aorta.

En la literatura se encuentra una gran variación del comportamiento mecánico de las aortas de cerdo, esto puede deberse tanto a variables de manipulación (forma de preparación del tejido), como a variables relacionadas con la edad y la condición de salud del animal, en general se observa que los

resultados obtenidos están en el rango de los encontrados en la literatura, para observar mejor estas comparaciones, los datos fueron recopilados en la *Tabla 1*.

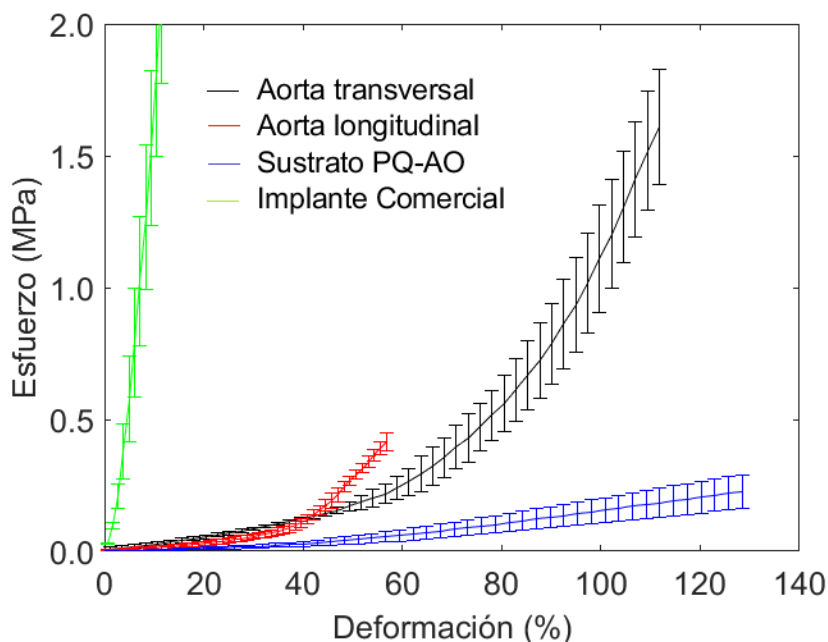


Figura 9. Curvas promedio de esfuerzo-deformación de aortas en cortes longitudinales y transversales, sustrato de PQ-AO y un implante comercial de ePTFE. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 1. Datos del comportamiento mecánico de las aortas de cerdo

| Literatura | | | | Autor | Experimento | | | |
|----------------|---------|-----------------|---------|--------------|----------------|---------|-----------------|-----|
| Esfuerzo (MPa) | | Deformación (%) | | | Esfuerzo (MPa) | | Deformación (%) | |
| Corte L | Corte T | Corte L | Corte T | Corte L | Corte T | Corte L | Corte T | |
| 0.06 | 0.06 | 40 | 40 | Dong [7] | 0.11 | 0.11 | 40 | 40 |
| 1 | 3 | 60 | 100 | Pei [8] | 0.43 | 1.15 | 60 | 100 |
| 0.4 | 1.3 | 43 | 75 | Kanda [9] | 0.17 | 0.45 | 43 | 75 |
| 0.1 | | 60 | | Padavan [10] | - | 0.24 | - | 60 |
| 0.05-0.5 | | 30 | | Bernal [11] | 0.081 | 0.081 | 30 | 30 |

En la *Figura 10*, se observan los valores para la resistencia máxima obtenida en cada tratamiento sin el límite de deformación de la probeta menos deformable de la *Figura 9*, y los módulos de Young 1 y 2 tomados en zonas *iniciales* y *finales* de cada curva.

El análisis ANOVA de estos datos reveló que la resistencia máxima tiene diferencias significativas entre las cuatro muestras evaluadas, el sustrato PQ-AO posee una resistencia máxima 84 % menor que el corte transversal de la aorta porcina, esto implica que el sustrato debe ser reforzado para la aplicación que se desea desarrollar. Respecto al módulo de Young, en la zona inicial solo se presentan diferencias significativas de todos los tratamientos con respecto al implante comercial, con respecto a la zona final, solo los cortes de las aortas no presentaron diferencias significativas entre ellos. El implante comercial presentó valores de módulo de Young muy superiores a la aorta, significando que el material es mucho más rígido y puede comprometer el desenvolvimiento de este como implante vascular; por el contrario, el sustrato de PQ-AO es menos rígido que la aorta, pero su comportamiento es más

comparable y esto puede ayudar a evitar los problemas asociados a la rigidez como la hiperplasia de la íntima [12].

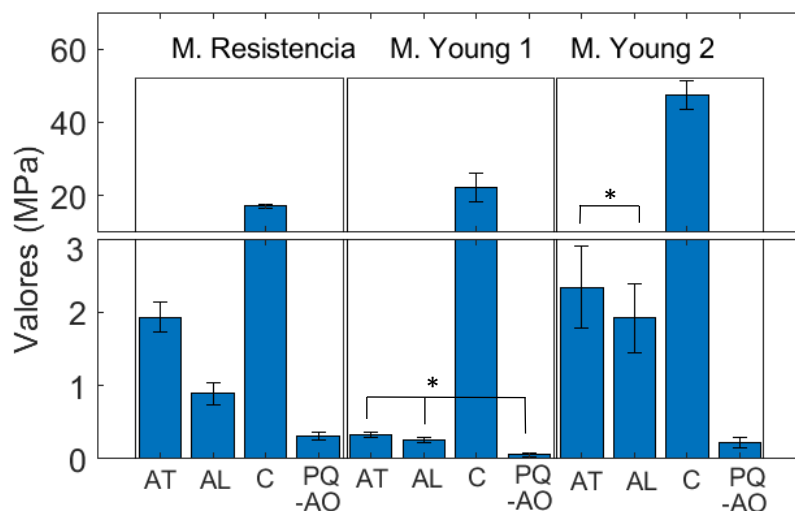


Figura 10. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región inicial y en la región final de aorta corte transversal (AT), corte longitudinal (AL), implante comercial (C) y del sustrato de PVA-quitosano ácido oxálico (PQ-AO). N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor-p > 0.05, realizado con comparación de rangos múltiples LSD Fisher.

En la literatura se encuentra una gran variedad de alternativas sintéticas al uso de los implantes comerciales, cuyas propiedades mecánicas varían en torno a los materiales utilizados y las técnicas de procesamiento, en la *Tabla 2* se encuentran los valores de resistencia máxima de implantes vasculares fabricados a partir de PVA. En comparativa los valores reportados son superiores a los desarrollados en el sustrato PQ-AO del presente proyecto y dichas diferencias pueden ser atribuidas al uso de refuerzos, entrecruzantes químicos o técnicas de fabricación utilizadas en el desarrollo de estos implantes. Si bien en el desarrollo del material PQ-AO se implementó la adición de quitosano y de ácido oxálico para mejorar algunas propiedades, se puede hacer necesaria la implementación de alguna de estas estrategias para incrementar los valores obtenidos en este trabajo.

Tabla 2. Datos del comportamiento mecánico de implantes vasculares basados en PVA en la literatura

| Material de la literatura | Esfuerzo (MPa) | | Deformación (%) | Autor |
|---------------------------------------|--|-------------|-----------------|--------------|
| | Literatura | Experimento | | |
| PVA con refuerzo de tela longitudinal | 1.2 | | 30 | Bernal [11] |
| PVA con refuerzo de tela transversal | > 0.1 | 0.018 | | |
| PVA / Ácido poliamico | 0.4 | 0.060 | 60 | Padavan [10] |
| PVA / Gelatina | 0.5 | | | Atlan [13] |
| PVA / Poliacrilamida | 0.1 a 0.5 según el contenido de poliacrilamida | 0.16 | 100 | Xing [14] |
| PVA entrecruzado con TS | 0.25 | | | Jeong [15] |

El sustrato desarrollado posee una rigidez comparable con las aortas porcinas, siendo una promesa para el desarrollo de un implante vascular que evite la hiperplasia de la íntima generada por los implantes comerciales actualmente disponibles, pero su resistencia mecánica debe ser mejorada para que su integridad física no se vea comprometida en su desempeño.

5.3.5 Celularización

En la *Figura 11* se observan las células sembradas sobre los sustratos de PQ-AO teñidas con calceína, estas fotografías se tomaron con el fin de corroborar la adhesión celular antes de realizar una prueba de tracción, de tal manera que se pudiera verificar si la celularización tenía un efecto sobre el comportamiento mecánico. Se corroboró la presencia de células, además se puede observar que la morfología de ambas células, fibroblastos [16] y *EA.hy 926* [17] corresponde a lo esperado y a lo observado en las fotografías SEM de la *Figura 7*, ya que los fibroblastos conservan su morfología alargada mientras las *EA.hy 926* conservan su forma más adoquinada.

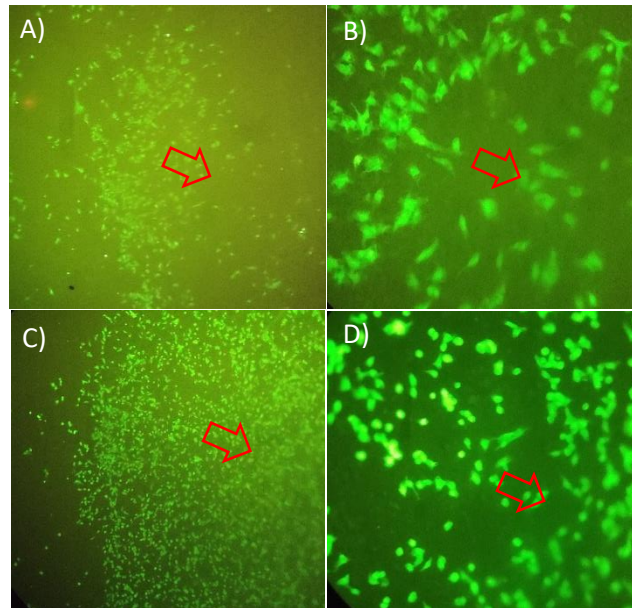


Figura 11. A) y B) Fibroblastos humanos a 50 X y 200 X y C) y D) *EA.hy 296* a 50 X y 200 X. Fotografías tomadas en 3 réplicas por 2 amplificaciones.

Comportamiento mecánico del sustrato celularizado

En la *Figura 12* se observa que la celularización de los sustratos PQ-AO incrementó la resistencia mecánica de los controles, sometidos a las mismas condiciones de incubación, en un 21 % a la misma deformación (98 %); esto puede deberse a que la deposición de *ME* de las células sobre el sustrato refuerza su estructura e incrementa la resistencia mecánica, este efecto de la celularización ha sido identificado por otros autores [18][19][20].

En la *Figura 13* se observan los valores para la resistencia máxima obtenida en cada tratamiento sin el límite de deformación de la probeta menos deformable de la *Figura 12* y los módulos de Young 1 y 2 tomados en la zona de 20 a 30 % de deformación y entre 80 y 90 % de deformación.

El análisis ANOVA de estos datos reveló que existen diferencias significativas en la resistencia máxima entre el sustrato celularizado y sin celularizar, el sustrato celularizado posee una resistencia máxima 57.9 % mayor que el sustrato sin celularizar, esto implica la celularización contribuye en el incremento de la resistencia mecánica y que una mayor exposición a las células podría elevar dicho incremento.

Respecto al módulo de Young, tanto en la zona inicial como en la zona final, no existen diferencias significativas, esto implica que la resistencia mecánica se mejoró sin sacrificar la elasticidad del sustrato obtenida.

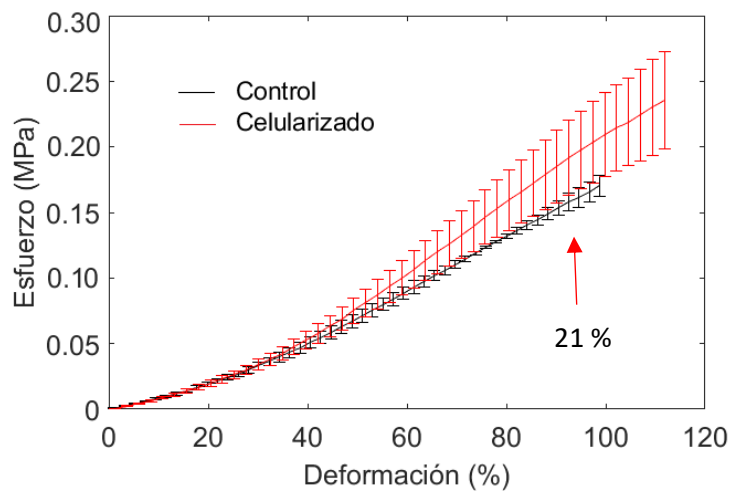


Figura 12. Curvas promedio de esfuerzo-deformación de sustratos de PQ-AO y sustratos PQ-AO-celularizados. N=5, las barras de error representan la desviación estándar.

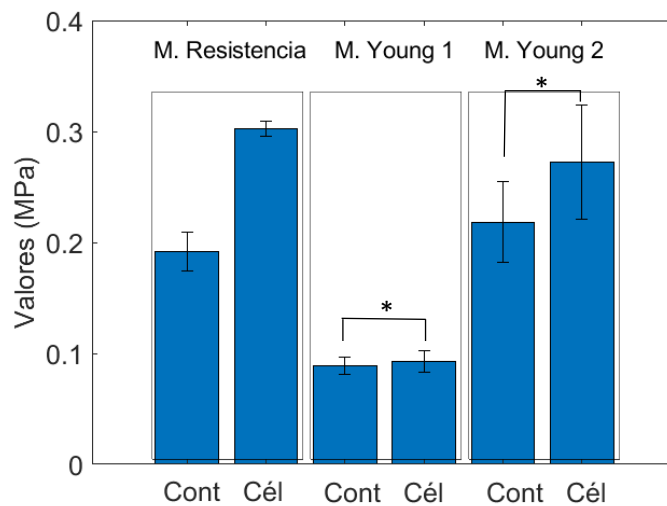


Figura 13. Gráfica de barras con los valores (de izquierda a derecha) de resistencia máxima y módulo de Young en la región 1 y en la región 2 de sustratos de PQ-AO (Cont) y sustratos de PQ-AO-celularizados (Cél). N=5, * indica que no hay diferencias estadísticas significativas para un valor- $p > 0.05$, realizado con ANOVA.

En la literatura se encuentra una gran variedad de alternativas al mejoramiento mecánico que pueden apreciarse indirectamente en la *Tabla 2*, estas técnicas combinadas con el hallazgo del efecto de la celularización podrían potenciar el uso del sustrato desarrollado como implante vascular.

En conclusión, la celularización incrementa la resistencia mecánica máxima del material PQ-AO sin alterar el módulo de Young del sustrato.

5.4 CONSIDERACIONES FINALES

Como característica química del material, el valor de humectabilidad del sustrato de PQ-AO no tiene diferencias significativas con el valor obtenido en las aortas porcinas, esto favorece la adhesión celular ya que existe una correlación entre esta propiedad y la capacidad del material de adsorber proteínas de adhesión, contrario al implante comercial que es significativamente hidrofóbico dificultando la adhesión celular.

Como característica morfológica del material, inicialmente se detectó una superficie lisa y suavizada que se erosionó después de una incubación con medio de cultivo, generando una superficie más similar a la encontrada en la aorta y el implante comercial, dicha superficie puede facilitar la adhesión celular y no permitir el paso de las células hacia el interior del material.

En la adhesión celular se encontró que la morfología de ambos tipos de células obedece a su morfología típica indicando un posible estado funcional adecuado, la confluencia también fue significativa para las *EA.hy 926*, para el caso de los fibroblastos humanos se requiere mayor exposición, de hecho no se evidenció que lograran adherirse al implante comercial.

Mecánicamente, el sustrato presentó un excelente comportamiento en cuanto su rigidez, ya que es más similar a las aortas porcinas que al implante comercial lo que podría evitar la hiperplasia de la íntima. Sin embargo, su resistencia máxima es muy baja para la aplicación como implante vascular, frente a esto existen varias estrategias como la celularización del sustrato, que en este caso logró incrementar la resistencia máxima del sustrato de manera significativa, hasta en un 21 %.

5.5 REFERENCIAS

- [1] M. Firoozi, M. Entezam, E. Masaeli, F. Ejeian, and M. H. Nasr-Esfahani, "Physical modification approaches to enhance cell supporting potential of poly (vinyl alcohol)-based hydrogels," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 139, no. 2, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1002/app.51485.
- [2] S. Cai, C. Wu, W. Yang, W. Liang, H. Yu, and L. Liu, "Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors," *Nanotechnol. Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 971–989, 2020, doi: 10.1515/ntrev-2020-0076.
- [3] Y. Yao et al., "Fucoïdan and topography modification improved in situ endothelialization on acellular synthetic vascular grafts," *Bioact. Mater.*, vol. 22, no. May, pp. 535–550, 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.10.011.
- [4] J. Brunet, B. Pierrat, and P. Badel, "Review of Current Advances in the Mechanical Description and Quantification of Aortic Dissection Mechanisms," *IEEE Rev. Biomed. Eng.*, vol. 14, pp. 240–255, 2021, doi: 10.1109/RBME.2019.2950140.
- [5] R. Gauvin and G. Marinov, "A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants," *J. Biomater. Appl.*, vol. 28, no. 4, 2012, [Online]. Available: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0885328212465482>.
- [6] L. Ressel, "Morphological alterations of cells," in *Normal Cell Morphology in Canine and Feline Cytology*, 2017, pp. 157–172.

- [7] H. Dong et al., "Ultimate tensile strength and biaxial stress–strain responses of aortic tissues—A clinical-engineering correlation," *Appl. Eng. Sci.*, vol. 10, 2022.
- [8] M. Pei et al., "The influence of sample geometry and size on porcine aortic material properties from uniaxial tensile tests using custom-designed tissue cutters, clamps and molds," *PLoS One*, vol. 16, no. 2 February, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0244390.
- [9] H. Kanda, K. Oya, T. Irisawa, Wahyudiono, and M. Goto, "Tensile Strength of Porcine Aorta Decellularized with Liquefied Dimethyl Ether and DNase," *ACS Omega*, vol. 7, no. 38, pp. 34449–34453, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c04103.
- [10] D. T. Padavan, A. M. Hamilton, L. E. Millon, D. R. Boughner, and W. Wan, "Synthesis, characterization and in vitro cell compatibility study of a poly(amic acid) graft/cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 1, pp. 258–267, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.038.
- [11] M. Bernal, J. Saldarriaga, C. Cabeza, C. Negreira, J. Bustamante, and J. Brum, "Development and evaluation of anisotropic and nonlinear aortic models made from clinical images for in vitro experimentation," *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, no. 16, 2019, doi: 10.1088/1361-6560/ab2db5.
- [12] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, and F. Claeysens, "The tissue-engineered vascular graft - Past, present, and future," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 22, no. 1, pp. 68–100, 2016, doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
- [13] M. Atlan et al., "Design, characterization and in vivo performance of synthetic 2 mm-diameter vessel grafts made of PVA-gelatin blends," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25703-2.
- [14] M. Y. Xing, C. L. Yu, Y. F. Wu, L. Wang, and G. P. Guan, "Preparation and characterization of a polyvinyl alcohol/polyacrylamide hydrogel vascular graft reinforced with a braided fiber stent," *Text. Res. J.*, vol. 90, no. 13–14, pp. 1537–1548, 2020, doi: 10.1177/0040517519896753.
- [15] Y. J. Jeong, Y. Yao, T. H. Mekonnen, and E. K. F. Yim, "Changing Compliance of Poly(Vinyl Alcohol) Tubular Scaffold for Vascular Graft Applications Through Modifying Interlayer Adhesion and Crosslinking Density," *Front. Mater.*, vol. 7, no. January, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3389/fmats.2020.595295.
- [16] Merck, "Human Dermal Fibroblasts: HDF," Sigma-Aldrich, 2021.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=hdf&interface=All&N=0&mode=matchpartialmax&lang=en®ion=CO&focus=product>.
- [17] ATCC, "EA.hy926 CRL-2922TM." <https://www.atcc.org/products/crl-2922>.
- [18] R. P. Nair, J. Joseph, V. S. Harikrishnan, V. K. Krishnan, and L. Krishnan, "Contribution of fibroblasts to the mechanical stability of in vitro engineered dermal-like tissue through extracellular matrix deposition," *Biores. Open Access*, vol. 3, no. 5, pp. 217–225, 2014, doi: 10.1089/biores.2014.0023.
- [19] D. B. Camasão et al., "Increasing cell seeding density improves elastin expression and mechanical properties in collagen gel-based scaffolds cellularized with smooth muscle cells," *Biotechnol. J.*, pp. 1–23, 2018.
- [20] S. Haykal et al., "Double-chamber rotating bioreactor for dynamic perfusion cell seeding of large-segment tracheal allografts: Comparison to conventional static methods," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 20, no. 8, pp. 681–692, 2014, doi: 10.1089/ten.tec.2013.0627.

6. CONCLUSIONES GENERALES

La solución de etanol al 70 % demostró ser suficiente para lograr la desinfección de los hidrogeles de forma efectiva, fue necesario, no obstante, variar el tiempo de exposición del hidrogel a la solución según la composición de este.

El análisis por espectroscopia de infrarrojo dio cuenta de los grupos funcionales presentes correspondientes a las moléculas utilizadas, sin embargo, no tuvo resolución suficiente para determinar diferencias significativas de los hidrogeles al variar el porcentaje de *PVA* y el número de ciclos de *C/D* o de la inclusión de quitosano y el uso de ácido oxálico, esto debido a que dichas diferencias no existen (observado en otras pruebas) o a que la técnica no tiene la sensibilidad de detectar dichas diferencias.

Algunos hidrogeles de *PVA* presentaron un efecto citotóxico, que al parecer estuvo relacionado con la liberación de moléculas ácidas ocurrida por la hidrólisis de acetado de vinilo presente en el *PVA* parcialmente hidrolizado. Esta teoría se refuerza con los fenómenos observados en la prueba de adhesión celular, ya que esta requiere que los hidrogeles de *PVA* se sumerjan 24 horas en medio de cultivo antes de hacer la siembra, para asegurar que se intercambie el agua libre del hidrogel por medio de cultivo. Después de dicha exposición algunos hidrogeles acidificaban el medio, pero en una segunda exposición al medio realizada en el ensayo de adhesión no ocurría tal acidificación.

Las pruebas de estabilidad realizadas en distintos tipos de hidrogeles siempre arrojaron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados cuando los hidrogeles se fabricaban con solo *PVA*, sin embargo, se verificó que, la estabilidad dependió del grado de entrecruzamiento en los hidrogeles de *PVA* y quitosano; ya que el entrecruzamiento generado por el uso de ácido oxálico incrementó de forma significativa la estabilidad.

La resistencia mecánica y la rigidez de los hidrogeles se vio afectada por el porcentaje de *PVA* y el número de ciclos de *C/D*, ya que se corroboró que existen diferencias significativas entre los niveles 5 y 10 % de *PVA* y 3 y 7 ciclos de *C/D*. En niveles superiores solo se observaron diferencias significativas con 15 % de *PVA*, aunque este nivel fue descartado por dificultades de procesamiento. El efecto del grado de entrecruzamiento también se observó en el uso del ácido oxálico para entrecruzar el quitosano, ya que este incrementó la resistencia mecánica de forma significativa. Este resultado también se observó en la calorimetría diferencial de barrido del sustrato *PVA*-quitosano-ácido oxálico, ya que se requirieron mayores temperaturas para generar una fusión en los hidrogeles entrecruzados frente a los no entrecruzados, esto se debe a que el entrecruzamiento genera un mejor arreglo de las redes cristalinas.

El hidrogel de solo *PVA* no tiene la capacidad de generar adhesión celular debido a que su hidrofiliidad, puesto que crea una capa de agua sobre la superficie que impide la adsorción de proteínas, ahora bien, la inclusión de moléculas de quitosano disminuyó la hidrofiliidad superficial y permitió la adhesión celular.

El implante comercial de *ePTFE* tiene una alta hidrofiliidad que dificulta la adhesión celular y tiene una alta rigidez que puede provocar hiperplasia de la íntima, estas carencias fueron suplidas en el sustrato desarrollado, que mostro buena adhesión celular y rigidez adecuada.

Respecto al tejido nativo, representado por aortas porcinas frescas se obtuvo que su hidrofiliidad y rugosidad son similares a las alcanzadas con el sustrato desarrollado, pero la resistencia mecánica es significativamente mayor en las aortas que en el sustrato. Se demostró también que la celularización del sustrato incrementó la resistencia mecánica del mismo, por lo tanto, el proceso de celularización puede ser utilizado como un mecanismo para alcanzar el comportamiento mecánico adecuado del material desarrollado de polivinil alcohol-quitosano-ácido oxálico.

7. RECOMENDACIONES

Como ensayos adicionales se recomienda corroborar el estado funcional de las células adheridas más allá de la observación de su morfología.

Se recomienda utilizar *CE* de cultivo primario en vez de una línea celular ya que su comportamiento es más acorde con lo que ocurre *in vivo*. En este proyecto no se utilizaron debido a la complejidad que supuso la extracción y sostenimiento de *CE* de vena de cordón umbilical (*HUVEC*), de hecho, fue necesario recubrir los platos de cultivo con un soporte proteico para asegurar la supervivencia de estas.

También se recomienda utilizar mayor cantidad de células y aumentar su tiempo de exposición en las pruebas que implican adhesión celular, con el fin de garantizar una mayor confluencia y determinar el comportamiento morfológico y mecánico de las células una vez cubran la superficie.

Para mejorar la resistencia mecánica máxima obtenida del sustrato, se recomienda utilizar un refuerzo interno fabricado en forma de malla con una solución de *PVA* deshidratada.

También es importante la fabricación de estructuras tubulares, pensando en escalar el desarrollo del sustrato a la fabricación de un implante. En el proyecto se diseñaron 3 tubos con diámetros internos y externo de 3.17 mm - 6.2 mm, 4.76 mm - 7.6 mm y 9.52 mm - 12.4 mm, no obstante, debido a la necesidad de diseñar un biorreactor para la celularización de los tubos se utilizaron otras geometrías en los ensayos experimentales. Se recomienda entonces el diseño de un biorreactor rotatorio de doble cámara como lo propone Hyakal et al. [19].