

MA

Materiales Avanzados



Nueva época, año 2, número 1, enero 2016, revista fundada en 2003.



Materiales Avanzados, Publicaciones UNAM, es una publicación semestral del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. Editor Responsable: Estrella Ramos Peña. Reserva de derechos al uso exclusivo del título ante el Instituto Nacional del Derecho de Autor de la Secretaría de Educación Pública 04-2003-041612533600-102. Certificado de licitud de título 12619, Certificado de licitud de contenido 10191, expedidos por la Comisión Calificadora de Publicaciones y Revistas Ilustradas de la Secretaría de Gobernación. ISSN 1665-7071.

Directorio



Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Enrique Luis Graue Wiechers

Rector

Dr. Leonardo Lomelí Vanegas

Secretario General

Dr. William Henry Lee Alardin

Coordinador de la Investigación Científica



Instituto de Investigaciones en Materiales

Ana María Martínez Vázquez

Directora

Juan A. Hernández Cordero

Secretario Académico

Estrella Ramos Peña

Editor Responsable

Comité Editorial

Larissa Alessandrova

Patricia Guadarrama Acosta

Ilich A. Ibarra Alvarado

Francisco Morales Leal

Guillermo Santana Rodríguez

Producción

Editorial IIM

Editor Científico: Estrella Ramos Peña

Edición Digital: Alberto López Vivas

Los editores autorizan la reproducción de los artículos que se publican en Materiales Avanzados siempre y cuando se cite la fuente.

Andamios Electrohilados para el Sistema Cardiovascular

Ricardo Vera Graziano

Introducción

Ante la insuficiencia de tejidos y órganos sanos surgió la medicina regenerativa. Este tipo de medicina se vincula a diferentes áreas científicas como la terapia celular avanzada, la ingeniería genética y la ingeniería de tejidos. La terapia celular se basa en la inserción de un gen en una célula para sustituir o bloquear un gen defectuoso o ausente en las células. La ingeniería genética que se ocupa de genes para sustituir o bloquear un gen defectuoso o ausente en las células. La ingeniería de tejidos tiene como propósito desarrollar sustitutos bio-artificiales para mantener o mejorar la función de tejidos y órganos humanos.

La ingeniería de tejidos contribuye de manera importante al desarrollo de biomateriales que mimeticen las funciones de los tejidos nativos para regenerar los tejidos por medio del crecimiento orientado de células y la formación de la matriz extracelular con propiedades similares a la del tejido nativo. En la figura 1 se ilustra cómo funciona la ingeniería de tejidos [Agarwal S, et al, 2008, Yi-Fan, et al, 2013, Persson M, et al, (2013)]

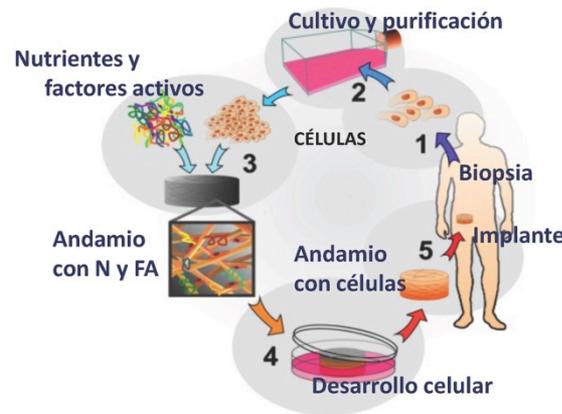


Figura 1. Esquema del ciclo de la ingeniería de tejidos. (1) se extraen células sanas del paciente. (2) Se aíslan y se cultivan. (3) Las células se siembran en un andamio. (4). Se coloca el andamio con las células en un biorreactor y se alimentan con nutrientes y se agregan factores de crecimiento. (5) El biorreactor promueve la adhesión de las células sobre el andamio así como su crecimiento y diferenciación. (6) Se implanta el andamio que contiene las células en la parte del organismo que se quiere regenerar.

La ingeniería de tejidos utiliza métodos de bioquímica, biomedicina y ciencia e ingeniería de materiales. En la práctica el término se relaciona con las aplicaciones para reemplazar o reparar parcial o totalmente tejidos y órganos.

En el grupo de investigación “síntesis y caracterización de polímeros para usos biomédicos” se orienta la investigación al desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos, en donde se hace uso de células, materiales y factores activos. Se cultivan seis temas generales de investigación para el desarrollo de andamios celulares: (a) síntesis de polímeros, copolímeros, funcionalización de polímeros y compuestos, (b) Caracterización de polímeros, nanofibras y andamios, (c) preparación de andamios por electrohilado, (d) diseño y construcción de equipo de electrohilado, (e) modelamiento de propiedades mecánicas y (f) desarrollo de biovidrios.

Los andamios, pueden construirse con diferentes materiales como polímeros, cerámicos, metales e híbridos. En el grupo se trabaja con polímeros, copolímeros y compuestos. La elaboración de los andamios debe tomar en cuenta la morfología de las células y sus dimensiones. La forma de las células depende del tipo de tejido y sus dimensiones varían de centímetros a micras.

Para que los andamios mimeticen las funciones del tejido nativo deben tener ciertas características. Deben ser estructuras con poros interconectados para permitir el paso de los nutrientes y factores activos así como el desecho de metabolitos, el tamaño de los poros debe corresponder al tipo de células que se quiere desarrollar. Deben ser esterilizables, biocompatibles y no inmunogénicos. Su morfología debe permitir la adhesión, crecimiento y diferenciación celular. Además deben ser reproducibles viables económicamente.

Existen diferentes métodos para fabricar andamios como el electrohilado, colada con disolvente y lixiviación de sales, separación térmica de fases, moldeo en caliente, espumado, secado criogénico de emulsiones, entre otros.

En el grupo se desarrollan andamios por el método de electrohilado en solución debido a sus ventajas: Permite aprovechar una gran variedad de materiales poliméricos y compuestos útiles, combinar propiedades físicas, químicas y biológicas de diferentes materiales, desarrollar andamios hechos de micro y nanofibras con diámetros y relación superficie/volumen cercana a la de tejidos vivos, permiten la adhesión, crecimiento y diferenciación de varios tipos de células, el proceso de electrohilado permite controlar la morfología de nanofibras y andamios así como en su desempeño y el proceso es escalable de nivel laboratorio a nivel piloto e industrial.

También se han diseñado y construido varios equipos de electrohilado para producir andamios a nivel laboratorio. En la figura 2 se muestran los componentes principales de un equipo de electrohilado (2a) y diferentes tipos de colectores para elaborar andamios con características morfológicas específicas (2b).

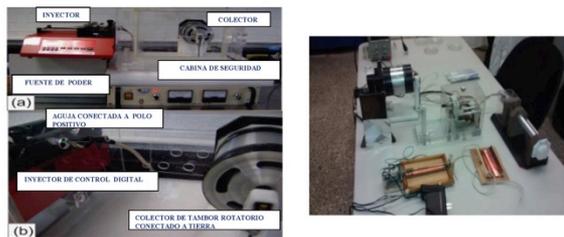


Figura 2. (A) Equipo de electrohilado en donde se resaltan sus componentes principales: Fuente de poder, inyector, colector, controladores y cabina de seguridad. (B) Colectores para elaborar diferentes tipos de andamios. (a) de tambor rotatorio, (b) plano, (c) rotatorio con desplazamiento para tubos de diámetro menor a 5 mm, (d) de tubos de diámetro mayor a 1 cm, (e) con curvatura y (f) tubular rotatorio. Vera R, Montiel R, Maciel A, et al (2013).



Figura 3. Aplicaciones de los biopolímeros en Ingeniería de Tejidos. En amarillo se muestran los campos en que se está incurriendo.

Elaboración de andamios para el sistema cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son generan altos índices de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Estas incluyen daños al corazón y a los vasos sanguíneos. Para contribuir a mitigar estos daños se estudian andamios para su aplicación en el sistema cardiovascular. A continuación se presentan de manera general los avances logrados en el desarrollo de tres tipos de andamios.

(A) *Andamios electrohilados de poli(carbonato - uretano) con fibronectina integrada.*

Si bien existen a nivel comercial vasos sanguíneos artificiales de diámetro mayor a 5 mm se detectó la carencia de arterias artificiales con diámetros interiores menores. [Y Nagaoka, H Yamada, et al, 2014]

Se desarrolló un sistema de electrohilado para fabricar tubos de poli(carbonato/uretano), PCU, con fibronectina, FN. El sistema incluye un colector tubular rotatorio con desplazamiento a lo largo del eje principal del tubo para fabricar vasos artificiales de diámetro menor a 5 mm. En la Figura 4 se muestra un andamio tubular de PCU con FN.

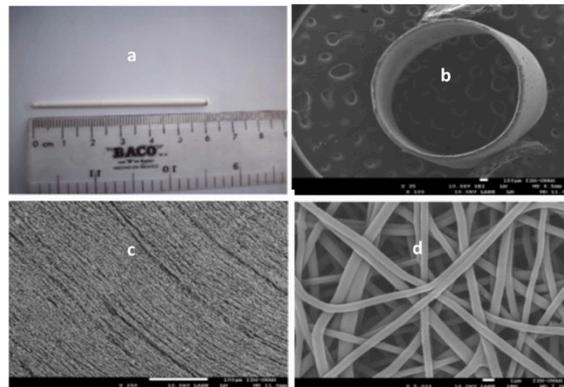


Figura 4. Andamio tubular de PCU con FN. (a) tubo delgado de 6 cm de longitud, (b) Vista axial, del tubo de 4 mm de diámetro interior. (c) Pared del tubo, 250X. (d) Nanofibras, 500X.

Se utilizó el PCU por ser un copolímero en bloque no biodegradable. Este copolímero tiene excelentes propiedades físicas, muestra buena adhesión y proliferación de células endoteliales, baja activación a la adhesión de plaquetas y monocitos y una gran resistencia a la degradación por hidrólisis. [Christenson, Dadsetan, Wiggings, Anderson, Hiltner, 2003. Christenson, Anderson, Hiltner, 2004. Shan-hui Hsu, 2004.]

La fibronectina, FN, es una glicoproteína que promueve la adhesión, crecimiento y la diferenciación celular. En la Figura 5 se muestran la estructura química del PCU y la composición de la fibronectina.

Para integrar la fibronectina, FN, a las fibras de PCU de forma permanente se prepararon soluciones de PCU con FN a diferentes concentraciones y se elaboraron los andamios para analizar sus propiedades fisicoquímicas y su viabilidad biológica. La integración de la FN en los andamios de PCU se detectó por espectroscopía infrarroja, analizando los grupos disulfuro (-S-S-) que unen los dos brazos de polipéptidos que constituyen la FN.

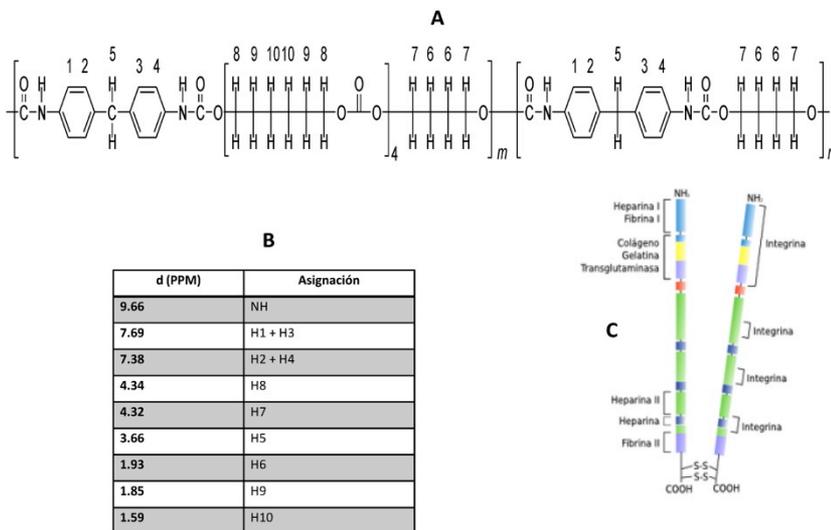


Figura 5. (A) Estructura química del poli(carbonato-uretano) en bloque (PCU), (B) asignación de los protones del PCU por RMN y (C) esquema de la composición de la fibronectina.

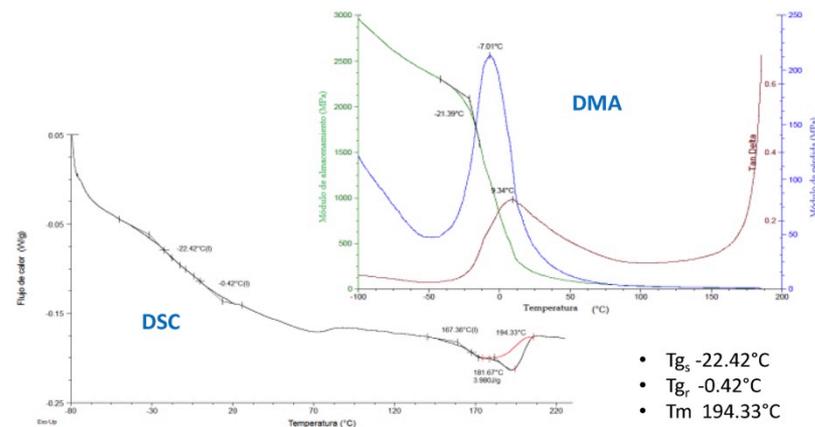


Figura 6. Transiciones térmicas de los andamios de PCU-FN detectadas por calorimetría diferencial de barrido, DSC, y análisis mecánico dinámico, DMA.

Los análisis de ángulos de contacto de agua en sobre los andamios de PCU mostraron que la fibronectina, en función de su concentración, cambió el carácter hidrofóbico del PCU a hidrofílico.

Los análisis por calorimetría diferencial de barrido, DSC, y análisis mecánico dinámico (Figura 6) confirmaron que el PCU es un copolímero en bloque y que cada bloque se segrega formando microdominios semicristalinos y amorfos. Las pruebas mecánicas a su vez mostraron que los andamios PCU/FN presentan un módulo de elasticidad y una resistencia a la ruptura mayor que los andamios que no tienen fibronectina.

Las pruebas de biológicas (Figura 7) indican que los andamios de PCU/FN presentan mayor confluencia celular que los andamios sin FN y que la viabilidad celular aumenta con el contenido de FN integrada a las fibras que constituyen los andamios de PCU.

Avances. El estudio realizado mostró que es factible fabricar andamios tubulares de poli(carbonato-uretano), PCU, y PCU/Fibronectina con diámetros menores a 5 mm por el método de electrohilado. La hidrofiliicidad de los andamios aumenta en función del contenido de FN. El electrohilado de la solución PCU/FN garantiza que la FN no se elimine al estar en un medio biológico debido a que queda integrada al cuerpo de las fibras. La FN aumenta la bioestabilidad y la biocompatibilidad del PCU y también mejora sensiblemente la adhesión y proliferación de células HEK293. Los andamios tubulares PCU-FN son potencialmente útiles en la regeneración de vasos endoteliales. [Vera R, Avila L, Maciel A, Montiel R, Third US - Mexico Meeting "Advances in Polymer Science" MACROMEX 2014, Proc. (2015) 63-67.]

(B). Andamios de poli(ácido láctico)/colágena para la reducción de infarto de miocardio con apoyo de oxígeno hiperbárico.

El trasplante celular ha mostrado ser una gran promesa para la reparación y restauración del miocardio después de un infarto. Sin embargo, el potencial de la terapia celular para la reparación del tejido miocárdico es limitada, principalmente por la muerte temprana de las células en un medio con bajo aporte de nutrientes y oxígeno. La terapia con oxígeno hiperbárico mejora en parte la supervivencia de las células y sus efectos protectores. La aplicación de una membrana porosa en la zona infartada también coadyuva a la supervivencia celular. Aquí se muestra el efecto que tiene la aplicación de un andamio sembrado con células mesenquimales en la zona infartada de una rata Wistar.

Se hicieron andamios con una mezcla de poli(ácido láctico) y colágena por electrohilado en solución, se esterilizaron, se sembraron con células mesenquimales y se cultivaron durante 15 días. Conforme a un protocolo previamente aprobado se indujo un infarto agudo en el miocardio de una rata Wistar, mediante cirugía se colocó el andamio celular en una región de la zona infartada del corazón con dos puntos de sutura. Se aplicó oxígeno hiperbárico por 60 min con gradiente de presión. Posteriormente se examinó la zona infartada del corazón vivo de la rata (Figura 7). El examen mostró que la zona infartada que cubre el andamio está bien irrigada, que la respuesta inflamatoria es baja y que el andamio quedó bien adherido a la superficie del miocardio.

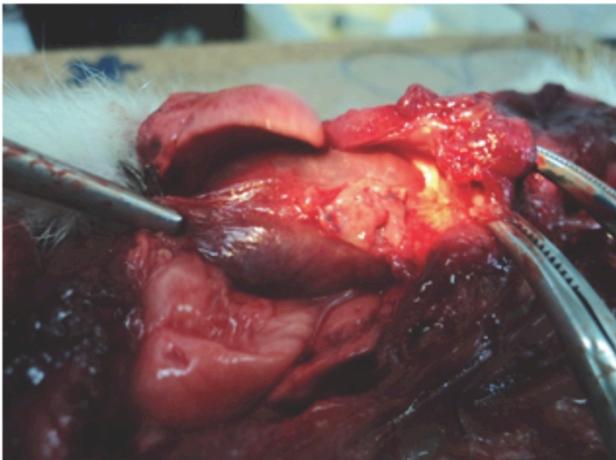


Figura 7. Andamio celular de poli(ácido láctico)/colágena tipo 1 sembrado con células mesenquimales y colocado en una región de la zona infartada del corazón vivo de una rata Wistar.



Figura 8. Corazón de la rata Wistar después de extraerlo. El infarto se redujo en la región en donde se colocó. La zona no cubierta por el andamio permaneció sin irrigación.

Posteriormente se extrajo el corazón para analizarlo. El estudio histológico mostró que se redujo el infarto en la región en donde se encontraba el andamio en tanto que la zona que no abarcó el infarto quedó sin irrigación.

Avances.- Las pruebas realizadas muestran que funcionó el uso de los andamios de poli(ácido láctico)/colágeno sembrados con células mesenquimales y con terapia de oxígeno hiperbárico para reducir el infarto de miocardio en ratas Wistar. [Ospina-Orejarena et al, R, 3er Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, SLABO (2014).]

(C). Andamios biodegradables de poli(glicerol sebacato)/poli(e-caprolactona)

Los hules o elastómeros tienen propiedades útiles como andamios para la regeneración de tejidos suaves. El poli(glicerol sebacato), PGS, es un elastómero biodegradable y biocompatible de interés creciente en el desarrollo de vasos sanguíneos bioartificiales. Ha sido probado como andamio para crecer células endoteliales y es hemocompatible *in vitro* e *in vivo* (Wang et al, 2002). La degradación del PGS en medio acuoso se da *in vivo* e *in vitro*, siendo más rápida *in vivo*. La acción enzimática hidrolítica promueve la ruptura de los enlaces éster del PGS y su resistencia mecánica cae linealmente con la degradación.

La poli(e-caprolactona), PCL, también es un polímero biodegradable y biocompatible probado en ingeniería de tejidos. La PCL puede mejorar algunas propiedades fisicoquímicas y biológicas del PGS. Por ejemplo aumenta la hidrofiliabilidad de los andamios PGS, puede mejorar la adhesión y crecimiento de células endoteliales y facilitar el proceso de electrohilado. Con base en estas características se estudió el sistema poli(glicerol sebacato)/poli(e-caprolactona), PGS/PCL, para la elaboración de andamios útiles en la regeneración de vasos sanguíneos. [Yadong Wang, et al, 2002 Shilpa Sant, et al, 2012- 2013]

El PGS se entrecruza fácilmente lo que limita su electrohilado en solución. Por ello se preparó una serie de prepolímeros lineales de PGS como se muestra en la figura 9.

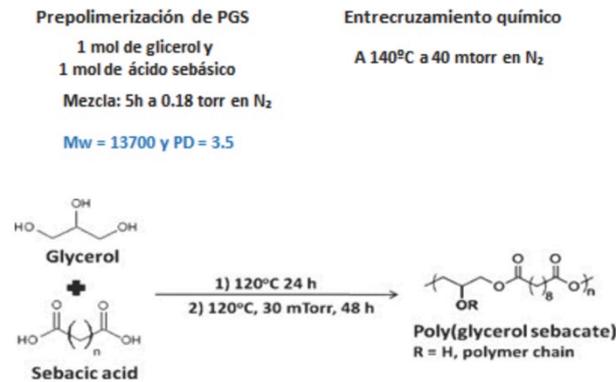
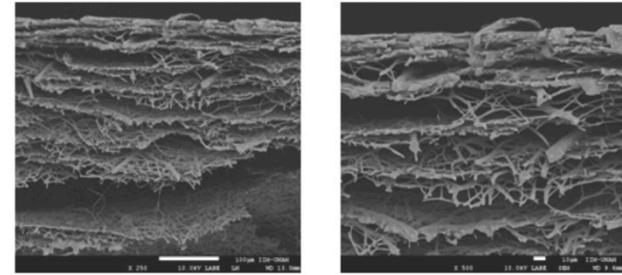


Figura 9. Condiciones de prepolimerización y entrecruzamiento químico de PGS.
Esquema de la síntesis del PGS

El prepolímero PGS y la PCL se disolvieron en una mezcla de diclorometano, tetrahydrofurano y dimetilformamida a una concentración de 33% w/w para fabricar los andamios. Los andamios se prepararon por electrohilado utilizando un colector de vástago giratorio bajo los parámetros indicados en la figura 10. El diámetro interno del tubo depende del diámetro del vástago. El tubo PGS/PCL se forma por capas y el espesor de la pared depende del tiempo de electrohilado. En la figura 11 se observa que la pared del tubo está formada por capas de nanofibras



Figura 10. La mezcla PGS/PCL se disuelve en una solución de diclorometano, tetrahidrofurano y dimetilformamida para fabricar los andamios. El electrohilado se realiza en el colector del vástago giratorio, bajo los parámetros indicados arriba.



(a) 250

(b) 500x

Figura 11. Microfotografía de la pared del andamio tubular. Se observa que la pared está formada por capas de nanofibras de PGS/PCL.

Avances.- De acuerdo a los estudios y experimentos realizados los andamios PGS/PCL son potencialmente útiles en la fabricación de andamios tubulares elastoméricos y biodegradables. Las mediciones por ángulos de contacto, θ , el andamio PCL es hidrofóbico ($\theta > 90^\circ$) y el andamio PGS/PCL es hidrofílico ($\theta = 0^\circ$). La hidrofiliidad es un factor muy importante para la adhesión y crecimiento celular, la absorción de proteínas y el tiempo de degradación. Las soluciones PGS/PCL se hicieron con solventes cuya toxicidad es diez veces menor a los usados por otros autores. El tipo de colector usado resultó más adecuado que los reportados, obteniéndose fibras más uniformes. Las propiedades mecánicas de los andamios son similares a las de vasos sanguíneos, lo cual es indispensable para el crecimiento y proliferación de nuevo tejido celular.

Bibliografía

Agarwal S, et al, 2008, Yi-Fan, et al, 2013, Persson M, et al, (2013

Y Nagaoka, H Yamada, T Kimura, A Kishida, T Fujisato, K Takakuda1, J Med Dent Sci 2014, 61 33–40.

Christenson, Dadsetan, Wiggings, Anderson, Hiltner, 2003.Christenson, Anderson, Hiltner, 2004. Shan-hui Hsu, 2004.

Yadong Wang, et al, 2002, Shilpa Sant, et al, 2012- 2013

Vera-Graziano R, Maciel-Cerda A, Moreno-Rondon EV, Ospina A, Gomez-Pachón EY, *Modified polylactide microfiber scaffolds for tissue engineering*, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 1373, 2012, imrc 11.1376-s11-09.

Edwin Yesid Gómez-Pachón, Francisco Manuel Sánchez-Arévalo, Federico J. Sabina, Alfredo Maciel-Cerda, Raúl Montiel Campos, Nikola Batina, Israel Morales-Reyes, Ricardo Vera-Graziano, *Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds*, Journal of Materials Science (2013) 48:8308–8319.

Villareal-Gómez Luis Jesús, Vera-Graziano Ricardo, Vega Ríos María Raquel, Pineda Camacho José Luis, Almanza Reyes Horacio, Mier Maldonado Paris Astrid, Cornejo-Bravo José Manuel, *In vivo Biocompatibility of Dental Scaffolds for Tissue Regeneration*, IV National Congress of Science and Materials Engineering, February 18-22, 2013, Pachuca, Hgo., Advanced Materials Research Vol. 976, 191-195 (2014).

Luis Jesús Villareal-Gómez, Ricardo Vera-Graziano, María Raquel Vega Ríos, José Luis Pineda Camacho, Horacio Almanza Reyes , Paris Astrid Mier Maldonado, José Manuel Cornejo-Bravo, *Biocompatibility Evaluation of Electrospun Scaffolds of Poly(L-lactide) with pure and Grafted Hydroxyapatite for Hard Tissue Regeneration*. Journal of the Mexican Chemical Society, (In Press, Ref: JMCS13130).

Luis Jesús Villarreal Gómez, José Manuel Cornejo Bravo, Ricardo Vera Graziano, *Biocompatibilidad de implantes para regeneración de tejido duro*, Verlag/Editorial: Publicia, (2015) Schaltungsdienst Lange o.H.G, Berlin, Alemania.

Karla A. Barrera-Rivera Ricardo Vera-Graziano, Erik López-Sánchez, Antonio Martínez Richa, *Characterization of Chain Dimensions of Poly(ϵ -caprolactone) Diols by Size-Exclusion Chromatography Couples with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS)*. Journal of Polymer Research (2015), 22(1):1-8

Ospina-Orejarena A, Prado-Villegas G, Benítez-Arvizu G, Maciel-Cerda A, Castillo-Ortega M.M, Vera-Graziano R, *Andamio electrohilado de poli(ácido láctico)-colágena combinado con oxígeno hiperbárico para la reducción del infarto del miocardio*, 3er Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 26-28 de septiembre, OBI 2013, Viña del Mar, Chile. Libro de Trabajos Completos: Páginas 13-16, 13 de enero 2014, Sociedad Latinoamericana de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, SLABO.

Ricardo Vera-Graziano, Lizeth Ávila Gutiérrez, Raúl Montiel Campos, Atlantida Raya Rivera, Alfredo Maciel-Cerda, *PCU electrospun scaffolds for the vascular system*, Third US-Mexico Meeting “Advances in Polymer Science” and XXVII SPM National , MACROMEX 2014, Nuevo Vallarta, Mexico, Book of extended abstracts, (2015) 63-67.

Agradecimientos

Este trabajo se presenta en nombre de los siguientes académicos y estudiantes que participamos en el grupo de investigación “síntesis y caracterización de polímeros para usos biomédicos”.

Colaboradores

Dr. Alfredo Maciel Cerda (IIM, UNAM), Dr. Filiberto Rivera Torres (Fac. Química, UNAM), Dr. Francisco Sánchez Arévalo (IIM, UNAM), Dr. Federico J. Sabina Siscar (IIMAS, UNAM), Dr. Antonio Martínez Richa (Universidad de Guanajuato), Dr. Raúl Montiel Campos (UAM-Iz), Dra. Atlántida Raya Rivera (Hospital Infantil de México), Dra. Cristina Velasquillo Martínez (Instituto Nacional de Rehabilitación), Dr. Luis Jesús Villareal Gómez (U. Autónoma de Baja California), Dr. Edwin Yesid Gómez Pachón (U. Pedagógica y Tecnológica, Colombia), Dra. Margarita García Garduño (Facultad de Odontología, UNAM), Dra. Patricia Oropeza, (Facultad de Odontología, UNAM), Dr. Rafael Herrera Nájera (Facultad de Química, UNAM), Dra. Margarita Navarrete Montesinos (Facultad de Ingeniería, UNAM), Dr. Juan Paulo Hinestroza Ardila (Universidad de Cornell, NY),

Estudiantes

MC Alida Ospina Orejarena, MC Lizeth Ávila Gutiérrez, MC Vladimir Gómez Díaz, Q. María Eugenia Trejo Caballero, Q. Ángela Sánchez Cepeda, Q. Rodolfo de Jesús Romero Aragón, Andromeda A Louz Monroy Brera, Q. Pedro Salas Ambrosio, Ulises Edmundo Espinoza Nava (Diseño Industrial), David Josué Barrón Díaz, Yesica Carolina Cárdenas Pérez.

Apoyo Técnico

Adriana Tejeda Cruz (DRX), Carlos Flores Morales (TEM), Damaris Cabrero Palomino (DSC, DMA, TGA), Gerardo Cedillo Valverde (NMR), Miguel Ángel Canseco Martínez (FTIR), Omar Novelo Peralta y Josué E Romero (SEM), Salvador López Morales (HPLC).

Donativos

Proyecto PAPIIT-UNAM IN-108930

Proyecto CONACYT CNPq No: 174247

Edición Especial 2º Claustro Académico del IIM

