

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
“Prof. Jorge A. Sabato”

**DESARROLLO DE SUSTRATOS
BIOABSORBIBLES PARA INGENIERÍA DE
TEJIDO DERMO-EPIDÉRMICO (*)**

Por Lic. Ignacio Ruiz

Director

**Dra. Élide B. Hermida
Dra. Alicia Baldessari**

**(*) Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología, Mención
Materiales**

República Argentina

2013

Desarrollo de sustratos bioabsorbibles para ingeniería de tejido dermo-epidérmico

Resumen

La ingeniería de tejido es un área del conocimiento interdisciplinaria, que combina ciencias de la vida, ciencia e ingeniería de materiales y la medicina. Intenta dar respuestas a los desafíos planteados por la pérdida de piel por quemaduras extensas o úlceras por enfermedades crónicas como diabetes, entre otras. Los sustratos bioabsorbibles tienen como objetivo emular la estructura tridimensional de la matriz extracelular necesaria para la adhesión y proliferación celular y permitir la consecuente regeneración del tejido. Estos dispositivos deben cumplir una serie de requisitos mínimos: deben ser biodegradables, biocompatibles y poseer una estructura porosa altamente interconectada para permitir el crecimiento celular.

En este trabajo de tesis se plantea la elaboración de sustratos bioabsorbibles para la regeneración de tejido dermo-epidérmico. Para ello, se eligió un biopolímero de origen natural de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHA), debido a su biocompatibilidad, su biodegradación en condiciones fisiológicas y sus buenas propiedades mecánicas.

Se utilizaron tres diferentes métodos de elaboración de membranas porosas: lixiviado de sales, separación de fases inducida térmicamente y evaporación de emulsiones. Además, se utilizaron dos métodos de hidrólisis (uno mediado por enzimas y otro por álcalis) para promover la hidrofiliidad de los sustratos y así mejorar su desempeño. Las membranas porosas obtenidas fueron evaluadas en función de su morfología, propiedades mecánicas, porosidad, hidrofiliidad y tamaño de poros. Las membranas obtenidas por evaporación de solvente son las que mejor resistencia a la flexión presentaron, además mostraron muy buena hidrofiliidad.

Se realizaron ensayos in vitro para evaluar la adhesión de queratinocitos a los sustratos elaborados por los diferentes métodos. Por otro lado se planteó un modelo simple de biodegradación in vitro, ya que la cinética de este proceso debe ser compatible con la de regeneración del tejido. Además se evaluó la toxicidad de los sustratos mediante el estudio in vivo. Por último, se demostró la capacidad de regeneración de piel de los sustratos obtenidos por evaporación de emulsiones, mediante un estudio in vivo en ratas de laboratorio.

Development of bioabsorbable scaffolds for dermo and epidermal tissue engineering

Abstract

Tissue engineering is a multidisciplinary subject that combines efforts of different areas: life science, material science and engineering and medicine. Particularly, skin regeneration intends to overcome the challenges due to the extended skin loss by burning or chronic wounds such as diabetic foot ulcers or pressure ulcers. Bioabsorbable scaffolds can facilitate tissue regeneration, by the development of a tridimensional extracellular matrix (ECM) that provides cellular adhesion and proliferation. These scaffolds must satisfy some key requisites: they must be biodegradable, biocompatible and must have a highly interconnected porous structure to support cells adhesion and proliferation.

This thesis presents the main characteristic of design and production of bioabsorbable scaffolds for simultaneous dermic and epidermic tissue regeneration. For this purpose, a natural polymer from the polyhydroxyalkanoates family was chosen, due to its biocompatibility, biodegradation in physiological conditions and good mechanical properties.

Three fabrication methods have been used: salt leaching, thermal induced phase separation and emulsion evaporation. In order to enhance the hydrophilic response, two hydrolysis procedures were presented: one by enzymes and another by alkaline solutions. The porous scaffolds were characterized by their morphology, mechanical properties, hydrophilic character, porosity and pore size. From these results, the emulsion evaporation scaffolds showed the best mechanical and hydrophilic behaviors.

The adhesion of keratinocytes and the biodegradation kinetics were evaluated in own designed tests in vitro. On the other side, toxicity and inflammatory response were studied in laboratory conditions in vivo. Finally, experiments in vivo with Wistar rats were performed to evaluate the skin regeneration capacity of the scaffolds produced by emulsion evaporation.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	La regeneración de piel	1
1.1.1.	Situación nacional e internacional de lesiones graves de la piel	3
1.1.2.	Falencias de los tratamientos tradicionales	5
1.1.3.	Desafíos para la Ingeniería de Materiales	7
1.2.	Propuesta para este trabajo	9
1.3.	Referencias	9
2.	Antecedentes	13
2.1.	Sustratos para regeneración de la piel	13
2.1.1.	Sustratos epidérmicos	14
2.1.2.	Sustratos dérmicos	15
2.1.3.	Sustratos dermo-epidérmicos	16
2.2.	Los PHAs y sus aplicaciones biomédicas	17
2.3.	Referencias	23
3.	Elaboración de membranas porosas	27
3.1.	Caracterización físico-química del PHBV	27
3.2.	Lixiviado de sales	31
3.2.1.	Materiales	33
3.2.2.	Procedimiento	33
3.2.3.	Caracterización	34
3.2.4.	Optimización de la hidrofiliidad de los sustratos	40
3.3.	Separación de fases inducida térmicamente	46
3.3.1.	Materiales	47
3.3.2.	Procedimiento	47
3.3.3.	Caracterización	47
3.4.	Evaporación de emulsiones	51
3.4.1.	Materiales	53
3.4.2.	Procedimiento	53
3.4.3.	Caracterización	54
3.5.	Discusión	63
3.6.	Referencias	65
4.	Desempeño de los sustratos	69
4.1.	Biodegradación <i>in vitro</i>	69
4.1.1.	Procedimiento	70
4.1.2.	Resultados y discusión	71
4.2.	Adhesión de queratinocitos <i>in vitro</i>	75
4.2.1.	Materiales	75
4.2.2.	Procedimiento	77
4.2.3.	Resultados y Discusión	78
4.3.	Evaluación de la respuesta histológica de los sustratos <i>in vivo</i>	80
4.3.1.	Elaboración de los sustratos	80

4.3.2.	Procedimiento	80
4.3.3.	Resultados y discusión	81
4.4.	Regeneración de piel <i>in vivo</i>	84
4.4.1.	Protocolo	84
4.4.2.	Resultados y Discusión	86
4.5.	Referencias	89
5.	Conclusiones	90
6.	Trabajos presentados en congresos y publicaciones	95
7.	Agradecimientos	97
	Apéndice 1-Fisiología de la piel	99
	Apéndice 2 -Funcionalización química del PHBV	102
	Apéndice 3 -Técnicas experimentales	119
	Apéndice 4-Separación de fases líquido—líquido.....	121
	Apéndice 5 -Protocolo para Ensayo de Adhesión de queratinocitos <i>in vitro</i>	121

1. Introducción

1.1. La regeneración de piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Cumple la función de barrera entre el organismo y el ambiente y la de protección frente a microorganismos patógenos. Es un tejido estratificado constituido por 3 capas, que desde la superficie hasta la profundidad son: la epidermis, la dermis y la hipodermis. Cada uno de dichos estratos se encuentra morfológica y fisiológicamente bien diferenciado; el Apéndice 1 presenta información más detallada sobre la estructura de la piel. Diferentes células como los queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y las células epiteliales son necesarias para asegurar la completa funcionalidad de este tejido.

La función de barrera se logra por capas de queratinocitos diferenciados fuertemente fusionados e integrados a la capa epidérmica. La epidermis posee un espesor variable en función de la región del cuerpo de 75 a 150 μm [1]. La capa inferior, la dermis, consiste en un entrecruzamiento de fibras de colágeno cuya superficie superior forma una zona conocida como la **membrana basal**, que tiene como función principal la de asegura la adhesión de los queratinocitos a la dermis [2]; tiene un espesor de 1 a 4 mm y representa la mayor masa de la piel [1]. La dermis está vascularizada y contiene receptores de temperatura, tacto y dolor, así como también los folículos pilosos y los poros de las glándulas sudoríparas. En la Fig. 1.1 se ilustra un corte de la piel que muestra en detalle su compleja estructura.

En el momento en que la piel se daña, se dispara una serie de eventos: las células del sistema inmune son atraídas al sitio de la herida, los fibroblastos generan una matriz provisoria de tejido, que luego es cubierta por los queratinocitos responsables de la re-epitelización y eventualmente se produce la re-vascularización de la herida [3]. Este intrincado proceso de cicatrización es estimulado y controlado por numerosos factores de crecimiento y citoquinas [4]. Sin embargo, si la cascada de coagulación se ve afectada negativamente en alguno de sus pasos, la cicatrización puede llegar a hacerse más lenta o convertirse en crónica.

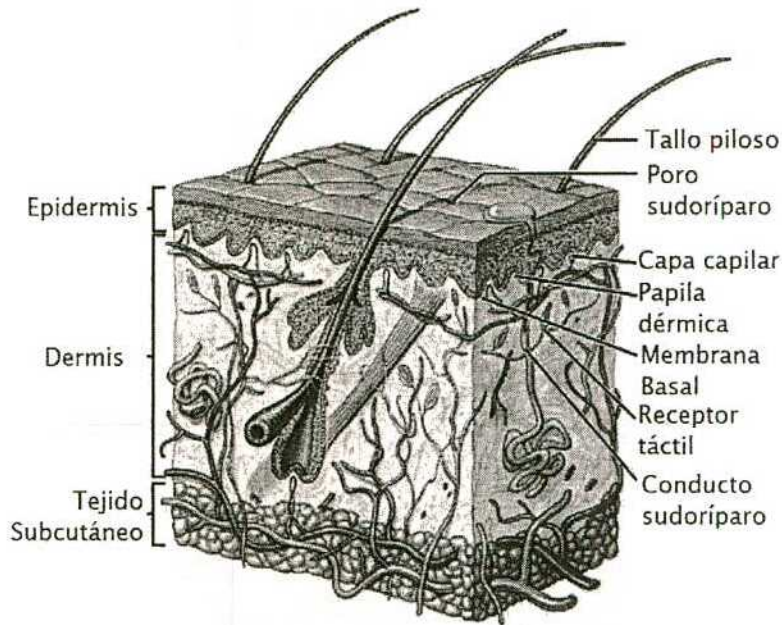


Fig.1.1 Estructura de la piel humana. Se destacan las tres capas que la componen, con sus anexos cutáneos como las glándulas sudoríparas y los folículos pilosebáceos [5].

La principal causa de pérdida significativa de la piel es la quemadura. Entre otras causas se incluyen los traumatismos y las úlceras crónicas, ya sea por la diabetes mellitus, por presión o venoestasis [4]. Las úlceras crónicas son una condición clínica delicada ya que en casos extremos el paciente puede llegar a requerir amputaciones. Las úlceras por presión o las venoestasis, significan en muchos casos largos períodos de tratamiento y altos costos para los sistemas de salud y los resultados funcionales o estéticos pueden ser desfavorables.

Las heridas pueden ser divididas en función de las capas o estratos de la piel afectados como: epidérmicas, superficiales de espesor parcial, profundas de espesor parcial y de espesor completo [6]. En los tres primeros casos la piel tiene la capacidad de regenerarse a partir del borde de la herida en donde los queratinocitos basales cambian a un tipo de células proliferativas migratorias que cubren el área dañada. De esta manera la epidermis se regenera sin necesidad de intervenciones quirúrgicas. En el caso de las heridas que involucran el espesor completo de la piel, si el diámetro es mayor a los 4 cm no podrá cicatrizar correctamente por sí sola sin intervención quirúrgica [7,8]. En cualquier herida de espesor completo, la pérdida de los elementos regenerativos y la cicatrización de las heridas conducen a resultados defectuosos, caracterizados por cicatrices hipertróficas o queloides, como las que se ilustran en las Fig. 1.2 y 1.3. El principal problema de las cicatrices es la contracción de la herida,

debida, en parte, a los miofiblastos que desarrollan las características de las células musculares lisas por acción del TGF- β 1 (factor de crecimiento de tejido) [9]. Estas cicatrices requieren largos tratamientos para mejorar la funcionalidad de la piel y la calidad de vida del paciente. Sin embargo sus secuelas no pueden eliminarse por completo.

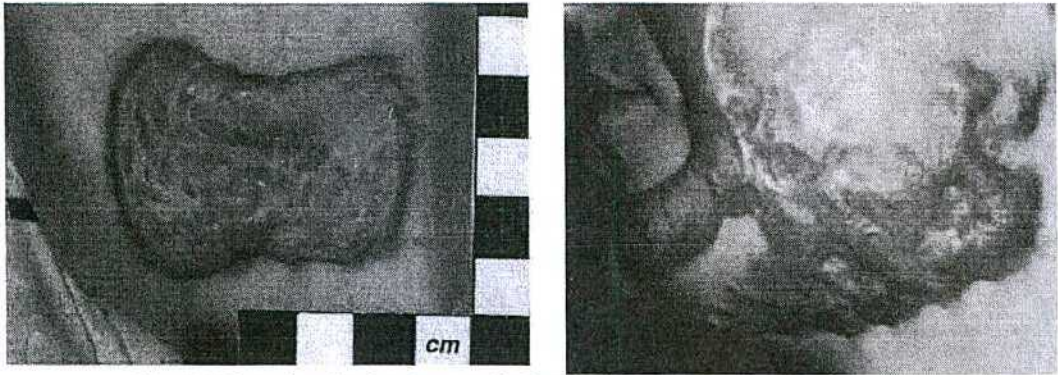


Fig. 1.2. Ejemplos de cicatrices queloides debidas a quemaduras profundas. [10,11].

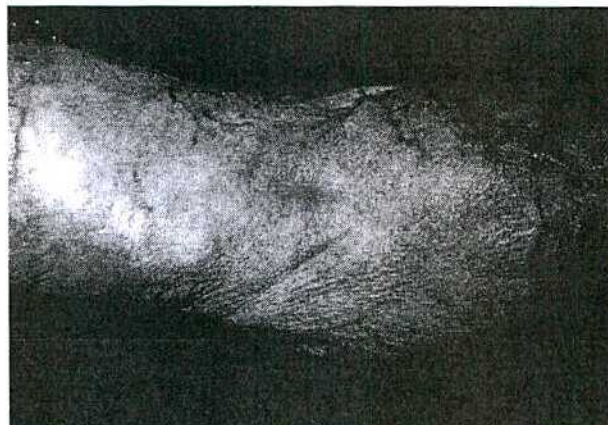


Fig. 1.3. Aspecto de una cicatriz leve hipertrófica luego de injertos de piel [12].

1.1.1. Situación nacional e internacional de lesiones graves de la piel

Los tratamientos de quemados y de ulcerados crónicos (por presión, úlceras venosas o metabólicas) constituyen hoy en día un gran problema para los sistemas de salud mundiales porque no sólo alteran en gran medida el estado de salud de los pacientes y su calidad de vida sino porque también conllevan elevados costos para su tratamiento.

Se estima que 1% de la población mundial puede sufrir una quemadura seria a lo largo de su vida. En Europa, se atienden anualmente a 1 millón de personas por quemaduras mientras que en los Estados Unidos, las personas que sufren de

quemaduras son 1,5 millones anualmente, de las cuales 60.000 a 80.000 requieren hospitalización [13].

En el caso de Argentina, la estimación de personas que sufren quemaduras asciende a 200.000 por año. De este número, se estima que 8.000 personas resultan con quemaduras de segundo y tercer grado, las cuales requieren hospitalización. La tasa de mortalidad de este grupo es del 1%. El número de quemados, según se observa en las estadísticas oficiales del Ministerio de Salud en Argentina es relativamente constante.

El pie diabético es la principal úlcera del tipo metabólica. Es un problema de salud pública por su elevada frecuencia y su alto costo sanitario y social, que se pone de manifiesto en el incremento del número de internaciones prolongadas, la mayor demanda de atención médica y la incapacidad laboral del paciente. En el año 2008, la población mundial de diabéticos alcanzó un total de 194 millones de personas. Se estima que en 2025 esta población crecerá hasta los 333 millones. La prevalencia de la diabetes en la Argentina es del 6 a 7% de la población (2.000.000 de personas) pero sólo un 50% conoce y trata su enfermedad. Dos tercios de estos pacientes sufren de complicaciones crónicas como pie diabético. La diabetes es causa del 48% de las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores y representa un 8% de la ocupación de las camas en hospitales públicos [14,15]. La Fig. 1.4 ilustra una úlcera en miembros inferiores de un paciente diabético.

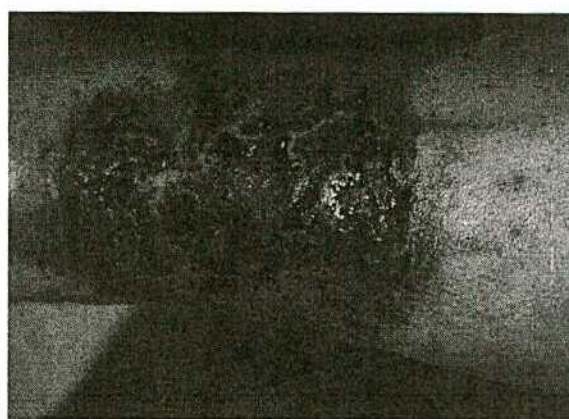


Fig.1.4. Úlcera de paciente diabético localizada en miembro inferior [16].

Las úlceras por presión, comúnmente llamadas escaras, son un problema significativo en la sociedad envejecida de hoy en día. Este tipo de heridas se define como un área de daño localizado de la piel causado por presión, fuerzas de cizallamiento y/o fricción. Las úlceras por presión son causadas por una ruptura de los

tejidos blandos como resultado de una compresión entre una prominencia ósea y una superficie externa [17]. La Fig. 1.5 ilustra una úlcera por presión localizada en el talón del paciente. A medida que aumenta la expectativa de vida, el número de individuos debilitados por padecimientos crónicos es cada vez mayor y por lo tanto se ven expuestos a mayores riesgos de padecer úlceras por presión. Además, la movilidad limitada por fracturas de caderas, las enfermedades progresivas como el Parkinson o Alzheimer hacen que la población de mayor edad tenga un riesgo elevado de desarrollar escaras. A pesar de que no existen datos concretos de los costos totales, en Estados Unidos se estima que el costo en el manejo de úlceras por presión representa 1.335 billones de dólares anuales. Los gastos de curación por úlcera se estiman entre 1.700 a 30.000 dólares por año por úlcera. En tanto, una investigación realizada en Holanda reveló que los gastos de tratamientos de úlceras por presión representan el 1% del presupuesto de salud del país [14,18].



Fig. 1.5. Escara que impide la correcta cicatrización de una úlcera por presión [19].

1.1.2. Falencias de los tratamientos tradicionales

En la actualidad el estándar para el tratamiento de heridas que involucran tanto dermis como epidermis es el injerto de piel autóloga, es decir, del propio paciente; este procedimiento se realiza en varias etapas [20]. La epidermis con algunos elementos superficiales de la dermis se extrae de un área no dañada de la piel del paciente por medio de un dermatomo y se aplica a la herida de espesor completo. Una vez aplicado, los capilares del injerto forman anastomosis o se conectan con los capilares existentes; se dice entonces que el injerto “prende”. El sitio donante cicatriza de manera similar a

una herida de espesor parcial. Cuando las heridas son más extensas se utiliza la técnica de malla en la que la piel extraída se perfora uniformemente y se extiende para abarcar toda el área afectada. Este procedimiento se observa en la Fig. 1.6, que presenta un injerto de neodermis en un paciente con quemaduras extensas.

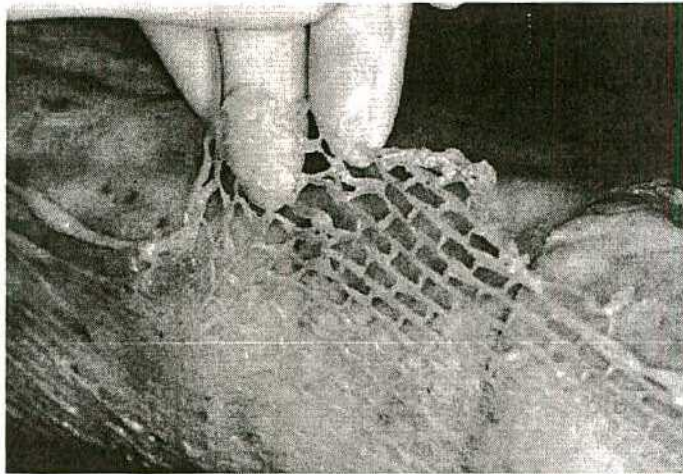


Fig. 1.6. Aplicación de injerto de neodermis por el método de mallado. [12].

La falta de dermis en los intersticios provoca contracción del injerto, lenta epitelización y formación de cicatrices en dichas aéreas, conocidas como “piel de cocodrilo” por su aspecto. Además de estos inconvenientes, el tratamiento actual encuentra una limitación fundamental: la falta de tejido donante autólogo en el caso de quemados extensos que involucren más del 50% de la superficie de piel afectada. Los avances logrados en el área de anestesia, ventilación y resucitación, así como en soporte farmacológico y nutricional de los pacientes quemados, en agentes cicatrizantes tópicos y mejoras técnicas en las unidades de quemados, han permitido la recuperación exitosa de casos que hubieran sido letales hace menos de 50 años. De acuerdo a estadísticas [6] entre los años 1942 y 1952 la probabilidad de muerte de un paciente de entre 15 y 44 años con una quemadura en el 60% de la superficie de su cuerpo era del 100%. Un estudio elaborado entre los años 1998 a 2003 mostró una reducción de la mortalidad a sólo 41.4 % en el mismo rango de edades y con similar superficie del cuerpo comprometida [21]. Sin embargo, todavía restan numerosas cuestiones por resolver en el área de regeneración de tejidos.

1.1.3. Desafíos para la Ingeniería de Materiales

Como se ha mencionado en la sección anterior, en el caso de quemaduras no tan extensas (menos del 2% de la superficie total de la piel del cuerpo) el cirujano puede tomar un injerto de espesor parcial (la capa de la epidermis completa y algunos elementos de la dermis) de alguna zona sana del cuerpo e injertarlo en la región dañada. Sin riesgo mayores de cicatrices hipertróficas o queloides se regenera la región de la quemadura mientras que la zona del cuerpo donante cicatriza por la proliferación de los queratinocitos sobre la dermis. Sin embargo, si la lesión es muy extensa, la técnica anterior se encuentra limitada por la zona del cuerpo capaz de ser donante de tejido. El caso típico es una quemadura profunda que afecta un 50 a 60 % de la superficie total del cuerpo [12]. En principio, este problema se eliminaría o minimizaría si fuera posible que células extraídas de una muestra de tejido autólogo proliferaran en un soporte que posea las propiedades anatómicas y funcionales de la piel normal, esto sería un sustrato dermo-epidérmico de piel aplicable sobre el lecho de la herida. Este sustrato para Ingeniería de Tejidos de piel debe cumplir al menos tres requisitos fundamentales [22]: debe ser seguro para el paciente, ser clínicamente efectivo y ser conveniente para su manipulación y aplicación. La Fig. 1.7 muestra esquemáticamente la aplicación de un sustrato ideal, en el que es posible el crecimiento y proliferación de ambos tipos de células de la dermis (fibroblastos) y de la epidermis (queratinocitos) del propio paciente.

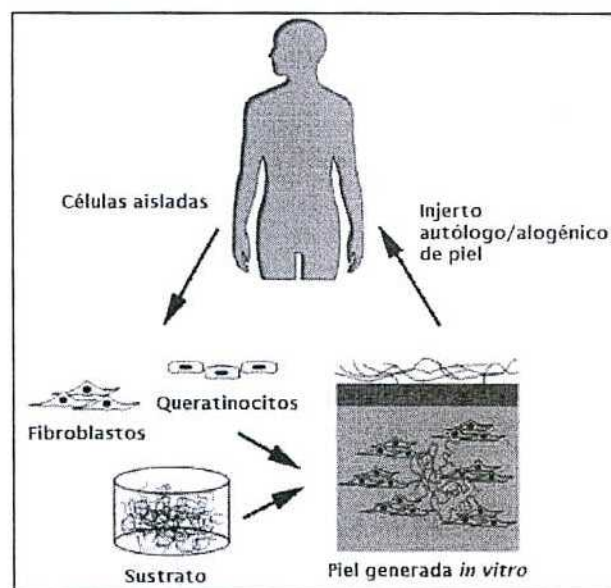


Fig. 1.7. Uso de sustratos dermo-epidérmicos para Ingeniería de Tejidos [23].

Desde el punto de vista de la Ingeniería de Materiales, existen una serie de desafíos estructurales que los sustratos para Ingeniería de Tejidos deben superar para lograr una estructura completamente mimética con la natural.

Por un lado, la membrana debe ser hidrofílica, ya que los medios en que se cultivan las células a implantar y los nutrientes, fármacos, etc. que se aplican durante la cicatrización son de base acuosa. Además debe permitir el desarrollo de los mecanismos de estimulación del anclaje de los queratinocitos, que depende de factores de crecimiento que producen los fibroblastos y a la vez son estos últimos los que sintetizan las proteínas de la membrana basal a partir de su interacción con los queratinocitos. El desarrollo de los queratinocitos y fibroblastos en un mismo sustrato representaría una gran ventaja frente a los soportes para regeneración de tejido presentes en el mercado actual, ya que estos últimos requieren múltiples intervenciones quirúrgicas. Por otra parte, la piel es un órgano ampliamente vascularizado y esta característica es esencial para su reparación. Si los mecanismos de cicatrización se limitan por una pobre vascularización (por ejemplo en pacientes ancianos o diabéticos), la regeneración de la piel puede hacerse más lenta o no ocurrir [24]. Lograr una membrana que propicie una rápida neovascularización es otro de los desafíos a superar en Ingeniería de Tejidos.

Además, la compleja estructura de la dermis formada por fibras de colágeno y elastina entrecruzadas enzimáticamente provee de un soporte mecánico y elasticidad a la piel. Una falla en esta compleja estructura fibrosa resulta en contracción de la piel, fibrosis y cicatrices. Por ello, lograr una membrana con las propiedades mecánicas que eviten estos resultados indeseables es otro de los desafíos para el desarrollo del soporte dermo-epidérmico [25].

El valor aportado por los polímeros para el desarrollo de este soporte dermo-epidérmico es otro punto a destacar. Con el advenimiento de los materiales poliméricos, durante el siglo XX, la variedad de biomateriales creció notablemente. En muchos casos se producen a costos relativamente bajos, dado que su disponibilidad no es un factor limitante. Además, la posibilidad de modificar su estructura química permite obtener gran versatilidad en las propiedades mecánicas y de biocompatibilidad, adaptándolos a las características específicas de la aplicación de interés.

1.2. Propuesta para este trabajo

El objetivo de este trabajo de tesis es establecer métodos de elaboración de matrices (scaffolds) que contribuyan a la regeneración de tejido dermo-epidérmico. Esto significa, por un lado, establecer métodos para controlar los parámetros de diseño de una matriz polimérica capaz de soportar y estimular el crecimiento simultáneo de los queratinocitos (células epidérmicas) y fibroblastos (células dérmicas). El sustrato deberá elaborarse con materiales biocompatibles, ser hidrofílico y además se propiciará que sea biodegradable y biorreabsorbible¹, esto es, que se degrade por la acción de enzimas del paciente en sustancias que no sean tóxicas y puedan ser metabolizadas. Este proceso de degradación deberá ser compatible con el tiempo de regeneración celular a fin de que el sustrato cumpla el rol de matriz extracelular temporaria. Por otro lado, dado que este desarrollo tiene como objetivo específico la transferencia de conocimiento al sector productivo, se considerarán como prioritarios aquellos métodos que minimicen la cantidad, la duración y la dificultad de las etapas de elaboración.

1.3. Referencias

1. Odland G. Structure of the skin. In: Goldsmith LA, editor. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin. Oxford:Oxford University Press; 1991.
2. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. Materials Today 2008; 11:26-35.
3. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2004;36:1031-1037.
4. Ghosh K, Clark RAF. Chapter seventy-six: Wound repair. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, Editors. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). Burlington:Academic Press; 2007.

¹ Biodegradable: material cuya degradación química es causada por reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas [26].

Biorreabsorbible: material que, una vez implantado en el organismo, se biodegrada a lo largo del tiempo en subproductos que no son perjudiciales y que pueden ser eliminados por mecanismos naturales del organismo sin dañarlo [27].

Bioabsorbible: término utilizado en la literatura de materiales para ingeniería de tejidos, que caracteriza a los materiales que se absorben en un ambiente biológico [28].

5. Shier DN, et al. Hole's Human Anatomy and Physiology 8th edition. Boston: McGraw Hill;1999.
6. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineering skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of Royal Society Interface* 2010;7:229-258.
7. Herndon DN, Parks, DH. Comparison of Serial Debridement and Autografting and Early Massive Excision with Cadaver Skin Overlay in the Treatment of Large Burns in Children. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 1986;26: 149-152.
8. Herndon DN, Barrow RE, Rutan RL, Rutan TC, Desai MH, Abston SH. A Comparison of Conservative versus Early Excision: Therapies in Severely Burned Patients. *Annals of Surgery* 1989;209:547-553.
9. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2002;3:349-363.
10. Brown BC, Moss TP, McGrouther DA, Bayat A. Skin scar preconceptions must be challenged: Importance of self-perception in skin scarring. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2010; 63:1022-1029.
11. Philipp CM, Scharschmidt D, Peter Berlien H. Laser treatment of scars and keloids – How we do it. *Medical Laser Application* 2008; 23:79-86.
12. Loss M, Wedler V, Kunzi W, Meuli-Simmen C, Meyer VE. Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. *Burns* 2000;26:644-652.
13. Velasquez P. et al. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Revista de Ingeniería Biomédica* 2008;2:77-83.
14. Prados P. PICT 00935 "Development of Bioabsorbable scaffolds for dermo and epidermal tissue engineering" Business Plan.
15. Consenso sobre Cicatrización de heridas, *Dermatología Argentina* 2008 Vol 14, No 4 (versión online)
16. Wound Bed Preparation-World Wide Wounds: <http://www.worldwidewounds.com/2002/april/Vowden/Wound-Bed-Preparation.html>. Enero 2013.
17. Lyder C. Pressure ulcer prevention and management. *Journal of American Medical Association* 2003;289:223-226.

18. Pressure ulcers in America: prevalence, incidence, and implications for the future. An executive summary of the National Pressure Ulcer Advisory Panel monograph. *Advance in Skin and Wound Care* 2001;14:208-215.
19. Scolnik M. *Ulceras por Presión-Diagnóstico Tratamiento y Prevención* 2008; Hospital Italiano de Buenos Aires.
20. Stanton RA, Billmire DA. Skin resurfacing for the burned patient. *Clinics in Plastic Surgery* 2002;29:29-51.
21. Chua A, Song C, Chai A, Kong S, Tan KC. Use of skin allograft and its donation rate in Singapore: an 11-year retrospective review for burns treatment. *Transplantation Proceedings* 2007;39:1314-1316.
22. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue engineered skin. *Nature* 2007;445:874-880.
23. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering—In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011;128:352-366.
24. Falanga V. Chronic Wounds: Pathophysiologic and Experimental Considerations. *Journal of Investigative Dermatology* 1993;100: 721-725.
25. Bhargava S, Patterson JM, Inman RD, MacNeil S, Chapple CR. Tissue-Engineered Buccal Mucosa Urethroplasty—Clinical Outcomes. *European Urology* 2008; 53:1263 - 1271.
26. Sasikala C, Ramana CV. Biodegradable Polyesters. In: Neidleman SL, Laskin AI. Eds. *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press 1996;42:97-218
27. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1992;3: 432-446.
28. Ikada Y. *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. United Kingdom: Interfase Science and Technology, Elsevier; 2006.

2. Antecedentes

2.1. Sustratos para regeneración de la piel

Las múltiples estrategias que se han probado para la regeneración de la piel tratan de superar las dificultades de la falta de donantes y a vez de proveer una cobertura de la herida para minimizar la posibilidad de infecciones. En la Tabla 2.1 se presenta un resumen de los desarrollos más significativos en sustratos para la regeneración de la epidermis, dermis y ambas capas en simultáneo. Muchos de los productos requieren células autólogas²; en otros casos se recurre a células y a materiales de origen alogénico o xenogénico. En esos últimos, es clave aplicar metodologías para eliminar riesgos de transmisión de virus como el de hepatitis B (HBV) o el de Inmunodeficiencia Humana (HIV).

Tabla 2.1 Ejemplos de sustratos para la regeneración de piel [1].

Objetivo	Producto	Estrategia
Sustratos epidérmicos	Epicel®	Autoinjerto de epidermis cultivado (queratinocitos autólogos cultivados en presencia de fibroblastos murinos).
	Epidex®	Autoinjerto de epidermis cultivado (células autólogas de la raíz de folículos pilosos).
	Myskin®	Autoinjerto de epidermis cultivado (queratinocitos autólogos cultivados en presencia de fibroblastos murinos irradiados)
	Laserskin®	Película de ácido hialurónico modificado para el crecimiento de queratinocitos.
Sustratos dérmicos	AlloDerm®	Alloinjerto acelular de dermis humana.
	Dermagraft®	Matriz porosa bioabsorbible de poliglactina sembrada con fibroblastos humanos alogénico neonatal.
	Integra®	Película delgada de polisiloxano (silicona); colágeno tipo I de tendón bovino y glicosaminoglicano de tiburón (condroitin-6-sulfato).
	Matriderm®	Colágeno bovino tipo I, III, V y elastina.
Sustratos Dermo-epidérmicos	Apligraf®	Queratinocitos humanos neonatales de origen alogénico; colágeno I de origen bovino sembrado con fibroblastos humanos alogénicos.
	OrCel®	Queratinocitos humanos neonatales de origen alogénico sobre la superficie no porosa un sustrato; esponja de colágeno bovino sembrada con fibroblastos humanos de origen alogénico.

² Autólogo: término utilizado para denominar células del propio paciente, distinguir de alogénico, que denota origen humano pero de otro paciente y xenogénico, que denota origen animal.

2.1.1. Sustratos epidérmicos

El primer paso hacia la regeneración de la piel podría situarse en el desarrollo hecho por Rheinwald and Green en 1975 [2], que permitió por primera vez el cultivo *in vitro* de células epiteliales en serie. Estos investigadores establecieron un método, que se continúa usando en la actualidad, para la extracción y cultivo de queratinocitos sobre fibroblastos 3T3 irradiados de murinos. Sus investigaciones demostraron que las limitaciones observadas anteriormente en el cultivo de células epiteliales se debían a la estrecha relación sinérgica que existe entre los queratinocitos y los fibroblastos. El cultivo de queratinocitos *in vitro* produce láminas de tejido epitelial autólogo lo suficientemente extensas para cubrir toda la superficie del cuerpo en 3 o 4 semanas a partir de una biopsia de 3 cm² [3]. Este desarrollo se aplicó para la regeneración de epidermis siguiendo diferentes estrategias. Un ejemplo de ello es Epicel®, un producto que simplemente realiza un cultivo *in vitro* de queratinocitos del propio paciente durante 15 días para formar láminas delgadas de tejido epitelial autólogo que luego se trasplantan sobre la epidermis faltante [4,5]. Una vez trasplantadas, las láminas de tejido autólogo forman la epidermis y con el tiempo estimulan la formación de tejido conectivo (neodermis). Esta es la aproximación más antigua hecha con queratinocitos; se encuentra en el mercado desde finales de la década del 80. Presentó ciertas dificultades como la manipulación de las células estratificadas generadas, la variable capacidad de integración de las láminas de tejido epitelial y los largos tiempos de cultivo, además de elevados costos de producción [6]. Habida cuenta de estas dificultades, MySkin® realiza la manipulación de los queratinocitos sobre una lámina de silicona con un recubrimiento para mejorar sus propiedades de superficie. Las células adheridas a la lámina se apoyan sobre la herida y migran a la misma sin la aplicación de tripsina, cambios de temperatura u otra intervención externa. Este producto, que se indica para úlceras por presión o pie diabético y quemaduras superficiales [7], tiene la ventaja de reducir los tiempos de intervención, porque el cultivo crece sobre el sustrato implantado sobre el paciente. Sin, embargo su aplicación es limitada en el caso de heridas profundas.

Laserskin®, por su parte, es una lámina de ácido hialurónico esterificado microperforada por laser, empleada para cultivar y aplicar los queratinocitos sobre la herida del paciente. El ácido hialurónico es un componente natural de la matriz

extracelular de la piel humana que promueve la proliferación de queratinocitos y fibroblastos. Dicho producto se bioabsorbe naturalmente luego de su aplicación.

Estos productos requieren de una previa biopsia de la epidermis del paciente para comenzar los cultivos *in vitro* que formará el tejido epitelial autólogo. Dicho proceso lleva de 2 a 4 semanas, por ello los pacientes necesitan una cobertura temporaria de la herida previa a la aplicación del producto.

En síntesis, los productos mencionados proveen un cierre permanente de la herida y pueden usarse en combinación con sustratos para soportes dérmicos para mejores resultados. Sin embargo, su eficiencia y resultados a largo plazo aún son cuestionados por la comunidad médica. La principal deficiencia es el grado de adhesión de la epidermis y la aparición de cicatrices, que depende fuertemente de la condición en que se encuentre la dermis [8], así como también del estado de los queratinocitos usados para su cultivo y expansión *in vitro*.

2.1.2. Sustratos dérmicos

También en el ámbito de regeneración de tejido dérmico se aplicaron diferentes estrategias. En efecto, numerosos trabajos dan cuenta de que los cultivos epiteliales de origen autólogo poseen mejores chances de integración si se realizan sobre un soporte de dermis o neodermis [9]. La mayoría de los productos usados para sustitutos dérmicos son acelulares, y emplean materiales de origen alogénico, xenogénico o sintético [10]. Productos como AlloDerm® o Karoderm® utilizan matrices de colágeno modificadas obtenida a partir de dermis humana como material base. Por tratarse de un material de origen alogénico, para poder asegurar la aplicación y el tiempo de vida útil de estos productos, las matrices deben deshidratarse y someterse a diferentes tratamientos. Otros productos usan una estrategia similar con la diferencia que el colágeno es de origen animal (porcino o bovino). Estas matrices diseñadas con el fin de ser un soporte permanente de tejido dérmico también pueden combinar materiales naturales con sintéticos. Un ejemplo de ello es TransCyte® que utiliza colágeno porcino, sobre un film de silicona semipermeable y tela de nylon [4] y que además tiene fibroblastos de origen alogénico incorporados al soporte. Es un producto de uso temporal y no degradable, de manera que es necesario quitarlo y reemplazarlo cada 7 a 14 días hasta una correcta regeneración del tejido dérmico perdido. Puede usarse también como cobertura temporal de la herida previa a la cobertura final con injertos

autólogos. Algunas estrategias recientes intentan realizar la aplicación en un solo paso como Matriderm®. Este desarrollo mostró resultados promisorios en zonas donde la matriz dérmica delgada (1 mm) como la mano y el hombro, sin embargo son necesarias mayores pruebas clínicas para aplicarlo en otras regiones.

2.1.3. Sustratos dermo-epidérmicos

Los sustratos o membranas de regeneración dermo-epidérmica intentan imitar la estructura y funcionalidad de la piel normal donde las capas de la dermis y la epidermis están presentes. No sólo son los sustratos más sofisticados y avanzados sino también son los más costosos [11]. La mayoría de estos productos se basan en células de origen alogénico incorporadas a un sustrato dérmico; el mayor inconveniente de estos productos es la baja disponibilidad de células en los bancos de piel y la posibilidad de riesgo de infecciones dado el origen de los tejidos. La idea subyacente en el diseño de estos sustratos se basa en que ambas capas de la piel deben actuar de modo sinérgico para mantener la homeostasis [12]. En los años 80 Bell *et al.* generaron un sustituto dermo-epidérmico que luego se conocería como Apligraf®. Este producto, que imitan la estructura normal de la piel, consiste en una matriz de colágeno bovino tipo I con fibroblastos de origen neonatal combinada con una capa de queratinocitos confluentes. A pesar de que este producto no generó rechazos inmunológicos, se observó que las células alogénicas de la matriz sobrevivían sólo 1 o 2 meses *in vivo*. Informes del uso de Apligraf® en úlceras crónicas muestran buena cicatrización en comparación a las técnicas convencionales [13], sin embargo se requieren mayores pruebas clínicas para confirmar estos resultados. Similares limitaciones y dificultades presentan otros tipos de productos, por ello no se encuentra en el mercado un producto que realmente sea un sustituto completo de ambas capas de la piel.

Existe un producto con resultados promisorios conocido como PermaDerm® basado en una esponja de colágeno que permite el crecimiento simultáneo de fibroblastos y queratinocitos de origen autólogo [14]. Se presenta como un cierre permanente de la herida y puede ser considerado como un verdadero sustituto de piel completo. A pesar de haber sido distinguido con un reconocimiento de la American Burns Association por su desempeño clínico, el producto no está disponible comercialmente.

A partir de las dificultades que se han resumido en este capítulo, se desprende que el diseño de dispositivos médicos que promuevan la regeneración dermo-epidérmica posee desafíos específicos. En efecto, los requerimientos de los queratinocitos—células de la epidermis—, y de los fibroblastos—células de la dermis— son diferentes y el sustrato debe permitir la correcta interacción de ambos tipos de células.

Las características claves que deben poseer los sustratos para regeneración de piel son:

1. Sostener el crecimiento celular, preferentemente de células de origen autólogo.
2. Proveer una superficie de adhesión apropiada para las células.
3. Facilitar la proliferación celular y la síntesis de la matriz extracelular
4. Ser biocompatible al igual que sus productos de biodegradación
5. Preferentemente, biodegradarse en el organismo de manera controlada.

Estos requerimientos plantean un desafío desde el punto de vista tecnológico porque se deben buscar materiales y procesos de fabricación que se adecuen al sistema biológico a regenerar.

Las propiedades de la superficie del sustrato influyen en la adhesión y la proliferación celular. Por ello, un factor importante para el éxito de los sustratos en la regeneración de tejido es la porosidad así como la macro y microestructura de los poros. Existen investigaciones previas que demuestran el efecto del tamaño de poros en la regeneración de piel y sugieren un tamaño óptimo de poro entre 20 a 125 μm para la regeneración de piel [15]. Otros autores demostraron que para el crecimiento y proliferación de fibroblastos en PLA y materiales compuestos el tamaño de poro debe ser menor a 160 μm [16]. Por otro lado, la interconexión de estos poros es esencial para la confluencia del tejido formado, para el transporte de nutrientes y desechos propios del metabolismo celular, y fundamentalmente para la vascularización del tejido regenerado.

2.2. Los PHAs y sus aplicaciones biomédicas

La elección del material de partida es uno de los puntos críticos del desarrollo, ya que se debe optar por uno que no genere rechazo (biocompatible) y que,

preferentemente, pueda degradarse naturalmente en condiciones fisiológicas (biodegradable).

En la actualidad existen sustratos para la regeneración de piel basados en biomateriales de origen animal. Un ejemplo de ello es el colágeno que se usa como soporte para la regeneración de la dermis. El origen alogénico (ya sea cadavérico o animal) de este material exige estrictas regulaciones para evitar la transmisión de enfermedades. Además, el origen natural de dicho material puede ser limitante para su disponibilidad. Estos problemas pueden subsanarse con el uso de materiales poliméricos absorbibles. Los primeros polímeros en ser usados para aplicaciones médicas fueron el ácido poli L-láctico (PLLA), la policaprolactona (PCL) y el ácido poliglicólico (PGL) [17,18]. Estos materiales han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) y se emplearon en numerosas aplicaciones como materiales bioabsorbibles (hilos de sutura, placas de fracturas y stents). Por ejemplo, Dermagraft® y Transcyte® son productos basados en estos polímeros que se están utilizando para uso clínico desde hace algunos años [19].

Al analizar productos biomédicos como soportes óseos, membranas para crecimiento de células neuronales, de retina, parches pericárdicos, etc. observamos que los polihidroxicanoatos (PHAs) están ganando la atención para su uso como biomateriales absorbibles [20]. Uno de los hitos más importante para los PHAs como biomateriales fue la aprobación del uso del poli(4-hidroxibutirato) (P(4HB)) como material de sutura por la FDA [21]. La gran diversidad de polímeros de la familia de los PHAs hace pensar que muchos otros poliésteres de esta familia se vayan aprobando para su aplicación médica en el mediano plazo. Como se verá más adelante, múltiples ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran su aplicabilidad y los convierten en materiales con buenas posibilidades en Ingeniería de Tejidos. Por todo esto, el polímero elegido para nuestro desarrollo pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs).

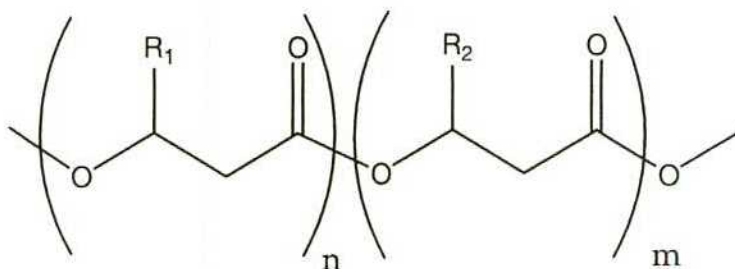


Fig. 2.1. Estructura general de los PHAs. R_1 y R_2 : alquilo. Homopolímeros: $\text{R}_1 = \text{R}_2$.

Los PHAs son poliésteres de los hidroxialcanoatos cuya estructura general es la que se observa en la Fig. 2.1. Los sustituyentes R pueden ser muy variados; en el caso de un homopolímero como el poli(3-hidroxibutirato) es un grupo metilo ($-CH_3$). Mientras que en el caso de un copolímero como el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) los sustituyentes R son metilo y etilo ($-C_2H_7$) dispuestos al azar. Estos poliésteres son sintetizados por numerosas bacterias Gram positivas, en condiciones aerobias (cianobacterias) o anaerobias (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas), bacterias fotosintéticas, bacterias Gram negativas y arqueobacterias. Estos microorganismos producen y acumulan gránulos de PHAs por fermentación, los cuales sirven como fuente de carbono y energía [22]. Muchos microorganismos llegan a acumular gránulos hasta un 90% del peso seco de células y pueden ser extraídos utilizando múltiples métodos (extracción con solventes orgánicos o de bases acuosas). Lemoigne, un microbiólogo del Instituto Pasteur, fue el primer investigador en reportar el PHB en 1925 [23]. El polímero fue aislado del *Bacillus megaterium* por extracción con cloroformo. Usualmente las bacterias producen estos polímeros bajo stress nutricional, o sea, en un ambiente de crecimiento desbalanceado con exceso de fuente de carbono y condiciones limitantes de O, N, S, Mg y P [22,23]. Si bien estos polímeros se conocen desde principios del siglo XX, su valor empezó a ser apreciado en las últimas décadas tanto para aplicaciones industriales (envases, productos biodegradables) como para aplicaciones biomédicas. En la actualidad existen empresas dedicadas al desarrollo de aplicaciones médicas de PHAs como alternativa a los materiales biocompatibles ya existentes en el mercado.

Sin lugar a duda una de las principales características de los biomateriales para evaluar su aplicación biomédica es la respuesta del material in vivo, o sea su biocompatibilidad. Numerosas investigaciones demostraron las propiedades de biocompatibilidad de los PHAs. Una de las primeras investigaciones en demostrar la respuesta in vivo de los PHAs fue llevada a cabo por W.R. Grace y sus colaboradores a mediados de los años 60 [24]. En estos estudios se implantaron tiras de PHB subcutánea e intramuscularmente en conejos y fueron removidas al cabo de 8 semanas. El examen del sitio de implante demostró la existencia de reacciones granulomatosas por el cuerpo extraño pero el tejido subyacente no se vio afectado. Resultados similares se observaron cuando muestras de PHB o PHBV se implantaron subcutáneamente en

ratones [25]. Luego de un mes se desarrolló una cápsula fibrosa de 100 μm de espesor, que aumentó 200 μm a los tres meses y se redujo a un espesor de 100 μm a los seis meses. Sevastianov et al. [26] comprobaron que films de PHB y PHBV en contacto con la sangre no activan el sistema de hemostasis a nivel celular a pesar de activar el sistema de coagulación y de reacciones complementarias. Comprobaron que dichas reacciones se debían a la presencia de trazas de hidroxiácidos de cadena larga. La eliminación de dichas impurezas, mediante purificaciones adicionales, mejoró la biocompatibilidad de los polímeros. Estos estudios destacan el grado de pureza requerido para la aplicación segura de los PHA's. En otros trabajos se comprobó la biocompatibilidad de estos polímeros al observarse la adhesión de células de diferentes orígenes que incluyen fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos en contacto directo con films de PHB y PHBV. En otro ensayo *in vitro*, Rivard et al. [27] demostró que sustratos porosos de PHBV con 9% de 3-hidroxivalerato (HV) pueden sostener la proliferación de fibroblastos caninos de ligamento anterior cruzado en una tasa similar a la observada en esponjas de colágeno durante 35 días, obteniéndose el máximo de densidad celular luego de 28 días de la siembra.

Cabe señalar que, la biodegradación del PHB tiene como subproducto al ácido 3-hidroxibutirato, que es un metabolito natural, presente en una concentración de 3 a 10 mg por 100 ml de sangre en un adulto sano [28]. Además PHAs de bajo peso molecular se encuentran en otras macromoléculas celulares conocidas como complejos de PHAs (cPHAs). Por ejemplo, se encontraron cPHAs en tejidos humanos complejados con lipoproteínas de baja densidad y con albúmina [29]. Es importante destacar que en la degradación *in vivo* de la mayoría de los PHAs se eliminan hidroxiácidos significativamente menos acídicos y menos inflamatorios que otros polímeros bioabsorbibles obtenidos de síntesis [30]. Por ejemplo, el P(3HB) y el P(4HB) derivados de los ácidos 3- y 4-hidroxibutíricos (pK_a 4,70 y 4,72 respectivamente) son menos ácidos que los 2-hidroxiácidos (ácido glicólico, pK_a 3,83 y ácido láctico pK_a 3,08) presentes en el PGA y el PLA.

Una de las desventajas de algunos PHAs es su carácter hidrófobo que limita su aplicación en ingeniería de tejidos. Esta característica afecta directamente a la biocompatibilidad ya que la adhesión celular estará determinada por el recubrimiento del material con proteínas cuando se lo implanta en el organismo, por ello debe ser hidrofílico. Se han probado numerosas estrategias para mejorar la biocompatibilidad de los sustratos de PHA por ejemplo: (1) aumento de la hidrofiliidad del polímero por

injerto con acrilamida y grupos carboxilos sobre PHB o copolímeros de PHB por tratamiento con plasma [31], (2) tratamiento de PHAs con enzimas o NaOH [32,33], (3) implantación de iones C^+ que demostró mejorar la biocompatibilidad de los fibroblastos [34]. La combinación de hidrólisis enzimática con recubrimientos de ácido hialurónico demostró ser efectiva para el aumento del crecimiento de fibroblastos sobre películas de diversos PHAs [35].

En lo que respecta a la biodegradación, que puede ser definida como “la ruptura gradual de un material por medio de un agente biológico específico” [36], se busca eliminar el sustrato del organismo una vez cumplida su función por medio de las rutas metabólicas naturales. Esto evitaría una posterior intervención quirúrgica para quitar el material así como el riesgo de cualquier repuesta inmune debida al cuerpo extraño. La evaluación del proceso de biodegradación es clave para demostrar la aplicación de los dispositivos, ya que los cambios fisicoquímicos ocurridos durante el proceso pueden afectar la funcionalidad y los productos de degradación pueden disparar respuestas celulares anómalas.

Los dos mecanismos principales de degradación de polímeros en condiciones fisiológicas son la oxidación y la hidrólisis.

Los polímeros pueden sufrir oxidaciones cuando se los expone a fluidos corporales o tejidos. La respuesta inflamatoria es un mecanismo conocido provocado principalmente por los leucocitos y los macrófagos. Estas células son las primeras en entrar en contacto con la superficie del polímero y así disparan la fagocitosis y la consecuente síntesis de especies reactivas de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, ácido hipocloroso) [37-39] y enzimas de lisosomas.

La degradación hidrolítica de los polímeros consiste en el ataque de moléculas de agua a enlaces químicos para formar oligómeros y posteriormente monómeros. El primer paso de la reacción es el contacto de la molécula de agua con un enlace susceptible a ser hidrolizado. En caso de la hidrólisis no mediada por enzimas, la velocidad de la reacción estará determinada por la hidrofiliidad del polímero, siendo más hidrolizables los polímeros hidrofílicos o sea, los polímeros que permitan una mejor difusión de la molécula de agua. La hidrólisis también puede ser catalizada por enzimas, que son los catalizadores biológicos que hacen posible la mayoría de las reacciones en los organismos vivos. Las enzimas especializadas en las reacciones de hidrólisis son las hidrolasas, que incluyen proteasas, esterases, lipasas, glicosidasas y

fosfatasas. Teniendo esto en mente, es de esperar que el mecanismo principal de degradación hidrolítica de los polímeros *in vivo* sea el mediado por las enzimas.

La aplicación de los PHAs como biomaterial para sustratos en Ingeniería de Tejidos ha sido estudiada tanto para tejidos duros como para tejidos blandos, así como para el encapsulado de drogas para liberación controlada de fármacos. Existen variados ejemplos de uso experimental de los PHAs en el área cardiovascular. Se han utilizado como stent cardiológicos, injertos vasculares, válvulas cardíacas, parches pericardíacos, implantes, entre otras aplicaciones [40]. Para el reemplazo de tejido miocárdico infartado es necesario crear un parche poroso sobre el cual las células del miocardio se adhieran y puedan proliferar. Kenar *et al.* Presentaron el diseño de un material tridimensional microfibrroso formado por la mezcla de varios polímeros naturales y artificiales; mezclaron PHBV, ácido poli(L-láctico) y poli(glicerolsebacato) y elaboraron la matriz porosa por electrospinning [41].

Se pueden citar diversos ejemplos de aplicaciones de los PHAs para regeneración de piel. Entre ellos se destaca el trabajo de Zorlutuna *et al.* [42], quienes diseñaron un sustrato de PHBV y PLA para crecimiento conjunto de queratinocitos y fibroblastos. Combinaron la técnica de separación de fases para formar una esponja porosa sobre la que adhirieron un film con un patrón destinado a guiar el crecimiento de los queratinocitos. Para mejorar la proliferación celular recubrieron esa bicapa con fibronectina; observaron adhesión y proliferación tanto de los queratinocitos como los fibroblastos. Otro desarrollo consistió en elaborar membranas de PHBV por evaporado de solvente (solvent casting) y luego microperforadas por laser [43]. Las perforaciones cumplen la función de permitir la migración de las células sembradas en el soporte hacia la herida. Se realizaron pruebas de proliferación y migración de queratinocitos HaCat; cuyos resultados mostraron ser prometedores para la aplicación como sustrato epidérmico.

En base a los antecedentes del uso de los PHAs para aplicaciones biomédicas, a las propiedades físico-químicas, de biodegradación y a la disponibilidad en el mercado internacional se ha elegido al PHBV como material de partida para el presente desarrollo.

2.3. Referencias

1. Böttcher-Haberzth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue Engineering of Skin. *Burns* 2010;36:450-460.
2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
3. Chester DL, Balderson DS, Papini RP. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2004;25:266-275.
4. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineering skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of Royal Society Interface* 2010;7:229-258.
5. <http://www.epicel.com/> Enero de 2013
6. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal Cellular & Molecular Medicine* 2005;9:592-608.
7. Moustafa, M. et al. A new autologous keratinocyte dressing treatment for non-healing diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetic Medicine* 2004;21:786-789.
8. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue engineered skin. *Nature* 2007;445:874-880.
9. Travia G, Palmisano PA, Cervelli V, Esposito G, Casciani CU. The use of fibroblast and keratinocyte cultures in burns treatment. *Annals of Burns & Fire Disasters* 2003;XVI:19-23.
10. Anthony ET, Syed M, Myers S, Moir G, Navsaria H. The development of novel dermal matrices for cutaneous wound repair. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2006;3:81-86.
11. Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery* 2002;55:185-193.
12. Parenteau NL, Sabolinski ML, Mulder G, Rovee DT. Wound research. In: Krasner D, Kane D, Editors. *Chronic Wound Care: A Clinical Source for Healthcare Professionals* 2nd ed. Wayne, Pennsylvania: Health Management Publications; 1997.
13. Edmonds M. European and Australian Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study Group, Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *International Journal of Low Extremity Wounds* 2009;8:11-18.
14. Boyce ST, Kagan RJ, Greenhalgh DG, Warner P, Yakuboff KP, Palmieri T, Warden GD. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin

- autograft for closure of excised, full-thickness burns. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2006;60:821-829.
15. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Science* 1989;86:933-937.
 16. Yang J, Shi G, Bei J, Wang S, Cao Y, Shang Q, Yang G, Wang W. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *Journal of Biomedical Material Research* 2002;62:438-446.
 17. Zong X. et al. Structure and Morphology Changes during in Vitro Degradation of Electrospun Poly(glycolide-co-lactide) Nanofiber Membrane. *Biomacromolecules* 2003;4:416-423.
 18. Zhang, Y. et al. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Material Research Part B* 2005;72:156-165.
 19. Marsten WA. et al. The Efficacy and Safety of Dermagraft in Improving the Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers: Results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 2003;26:1701-1705.
 20. Rai R, Keshavarz T, Roether JA, Boccaccini AR, Roy I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future *Materials Science and EngineeringR* 2011;72:29-47.
 21. Chen GQ, Qiong W. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005;26:6565-6578.
 22. Anderson A J, Dawes EA. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 1990;54:450-472.
 23. Doi Y. *Microbial polyesters*. New York: VCH; 1990.
 24. Baptist JN, Ziegler JB Method of making absorbable surgical suture from beta hydroxyl acids. US Patent No 3.225.766. 1965.
 25. Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK, Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Material Research* 1993;27:1135-1148.

26. Sevastianov VI, Perova NV, Shishatskaya EI, Kalacheva GS, Volova TG. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition* 2003;14:1029-1042.
27. Rivard CH, Chaput CJ, DesRosiers EA, Yahia LH, Selmani A. Fibroblast seeding and culture in biodegradable porous substrates. *Journal of Applied Biomaterials* 1995;6:65-68.
28. Hocking PJ, Marchessault RH. Biopolyesters. In: *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Glasgow: Blackie;1994.
29. Reusch RN. Non-storage poly-(R)-3-hydroxyalkanoates (complexed PHAs) in prokaryotes and eukaryotes. Weinheim Germany:Wiley-VCH;2002.
30. Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Heller J. Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulates degradation products. *Journal of Applied Biomaterials* 1994;5:151-157.
31. Flösch D, Clarotti G, Geckeler KE, Schue F, Göpel W. Characterization of plasma-treated poly(hydroxybutyrate) membrane surfaces by ESCA and contact angle measurements. *Journal of Membrane Science* 1992; 73:163-172.
32. Yang X, Zhao K, Chen G. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials* 2002;23:1391-1397.
33. Zhao K, Yang X, Chen GQ, Chen JC. Effect of lipase treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *Journal of Materials Science: Materials in medicine* 2002;13:849-854.
34. Chen XY, Zhang XF, Zhu Y, Zhang JZ, Hu P. Surface modification of polyhydroxyalkanoates by ion implantation. Characterization and cytocompatibility improvement. *Polymers* 2003;35:148-154.
35. Wang Y, Wu Q, Chen G. Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating. *Biomaterials* 2003;24:4621-4629.
36. Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R* 2001;34:147-230.
37. Williams DF, Zhong SP. Biodeterioration/biodegradation of polymeric medical devices *in situ*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1994;34: 95-130.
38. Coleman JW. Nitric oxide in immunity inflammation. *International Immunopharmacology* 2001;1:1397-1406.

39. Labow RS, et al. The effect of oxidation on the enzyme-catalyzed hydrolytic biodegradation of poly(urethane)s. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition* 2002;13:651-665.
40. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007;82:233-247.
41. Kenar H, Kose GT, Hasirci V. Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 2010;21:989-997.
42. Zorlutuna P, Tezcaner A, Hasirci V. A novel construct as a cell carrier for tissue engineering. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition* 2008;19:399-410.
43. Serrano F, López-G L, Jadraque M, Koper M, Ellis G, Cano P, Martín M, Garrido L. A Nd:YAG laser-microperforated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-basal membrane matrix composite film as substrate for keratinocytes. *Biomaterials* 2007;28:650-660.

3. Elaboración de membranas porosas

En la Introducción se destacó la importancia de la ingeniería del sustrato a fin de satisfacer los requerimientos esenciales para la buena adhesión y proliferación de las células dérmicas y epidérmicas así como para lograr una bioabsorción compatible con la regeneración de la piel. En este capítulo se presentará, en primer término, la caracterización del material empleado en la fabricación de los sustratos: PHBV con 12 % en peso de ácido 3-hidroxivalérico adquirido en Sigma Aldrich. A continuación se describirán detalladamente los tres procesos de manufactura de los sustratos empleados en este trabajo de tesis y se discutirán las ventajas y desventajas de cada uno en relación con las propiedades físico-químicas de las membranas necesarias para regeneración dermo-epidérmica.

3.1. Caracterización físico-química del PHBV

El análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H del material tal como se recibió del proveedor determinó la presencia de impurezas. En efecto, el espectro ilustrado en la Fig. 3.1, mostró señales que no corresponden a los desplazamientos químicos para el PHBV consignados en la Tabla 3.1 [1].

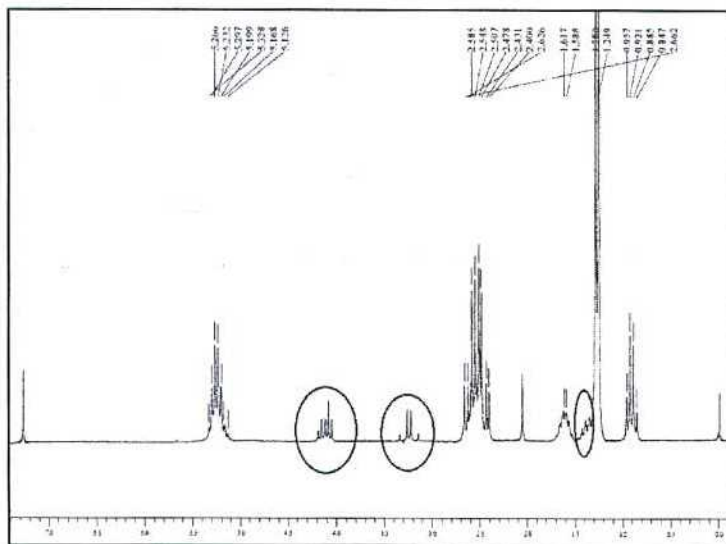


Fig. 3.1 Espectro RMN ^1H (200 MHz) del PHBV sin purificar en Cl_3CD . La señales destacadas no corresponden al PHBV

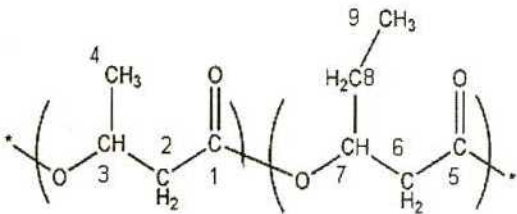
En virtud de ello, el PHBV fue purificado por agregado de hexano a una solución 6 % P/V en cloroformo hasta precipitación. Se extrajo el sólido precipitado por filtración,

luego se lo secó en evaporador rotatorio y en estufa de vacío a 50°C, para eliminar restos de solventes.

La Fig. 3.2 muestra el espectro RMN¹H del PHBV purificado, donde sólo se observan los picos correspondientes al polímero.

Tabla 3.1 Valores de desplazamiento químico para PHBV 19% 3HV.^a

δ (ppm)	Asignación
0.89	CH ₃ (9)
1.27	CH ₃ (4)
1.63	CH ₂ (8)
2.48	CH ₂ (6)
2.60	CH ₂ (2)
5.16	CH (7)
5.46	CH (3)



^a Doi et al. [1].

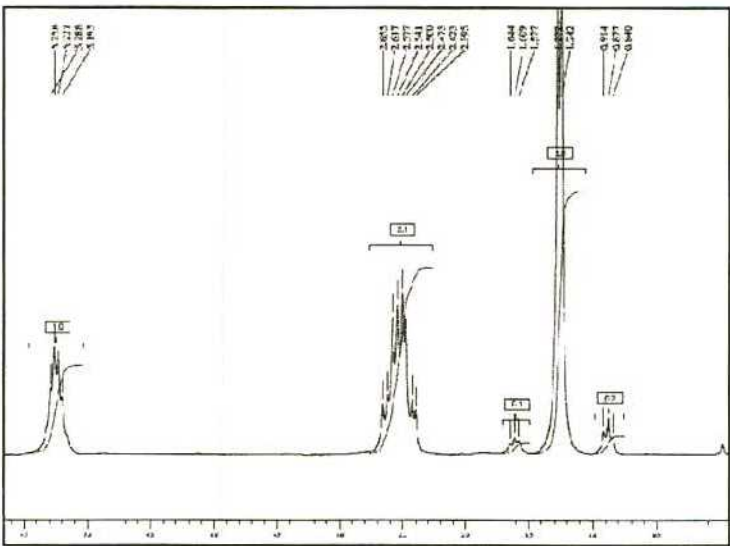


Fig. 3.2. RMN 200 MHz de ¹H del PHBV purificado.

Además se analizó el PHBV purificado mediante espectroscopía RMN ¹³C. La Fig. 3.3 muestra las señales más intensas correspondientes al copolímero 3-hidroxibutirato. La Tabla 3.2 enumera las correspondientes asignaciones de desplazamiento químico de acuerdo a la literatura [1].

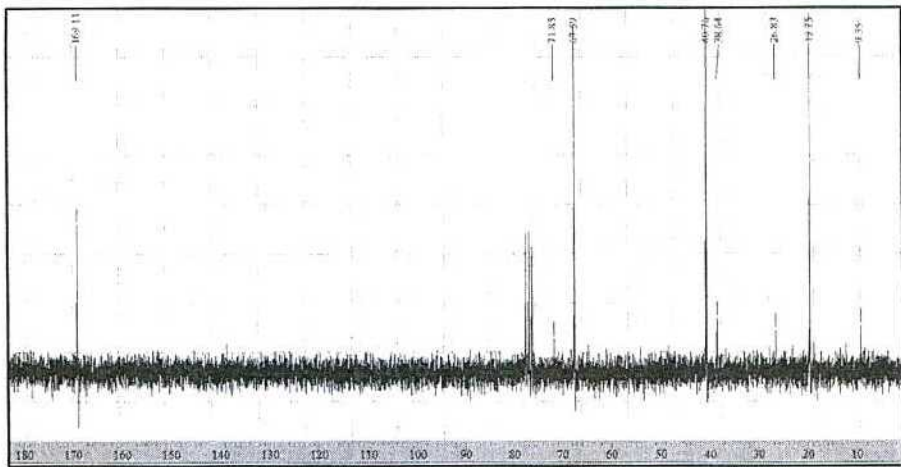


Fig. 3.3. Espectro RMN ¹³ C (200 MHz) del PHBV purificado.

Tabla 3.2. Desplazamientos químicos para las señales de RMN de ¹³C [1].

δ (ppm)	Asignación
9.3	CH ₃ (9)
19.7	CH ₃ (4)
26.8	CH ₂ (8)
38,6	CH ₂ (6)
40.8	CH ₂ (2)
67.59	CH (3)
71.85	CH(7)
169.11	CO(1),CO (5)

La Fig. 3.4 muestra el espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de una película delgada del polímero evaporada sobre una ventana de KBr. Las principales señales del espectro, resumidas en la Tabla 3.3, coinciden con las encontradas en la literatura [1]. Por esta técnica no se observaron diferencias entre el polímero sin purificar y purificado.

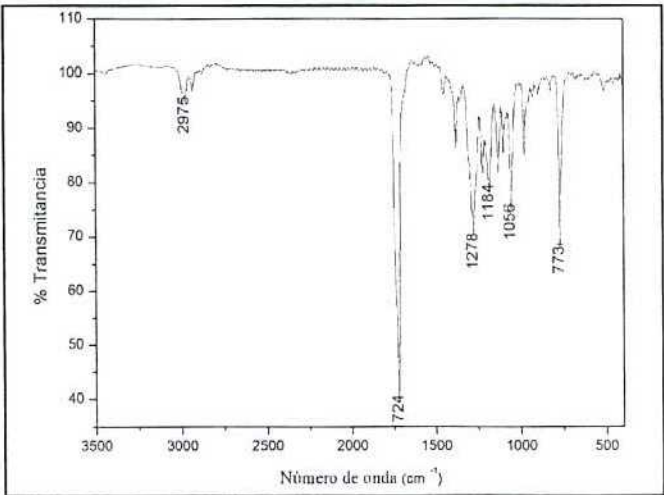


Fig. 3.4. Espectro FTIR de película delgada de PHBV.

Tabla 3.3. Asignación de señales principales del PHBV en FTIR.

$\nu(\text{cm}^{-1})$	Asignación
2975	vas. (CH_3)
2932	vas. (CH_2)
1724	vas. (COO)
1687	vs. (COO)
1452	δ (CH_2) + δ_{as} (CH_3)
1377	δ_{s} (CH_3)
1219	δ_{s} (OH) no enlazado
1184	$\nu(\text{C-C}) + \omega(\text{CH}_2)$
1130	$\nu(\text{C-CH}_3)$
1056	ρ (CH_3)
977	$\gamma(\text{OH-O carboxilo})$
896	$\nu(\text{C-C})$
826	$\nu(\text{C-C})$
773	ρ (CH_2)

Por su parte, la Tabla 3.4 muestra que los resultados de análisis elemental del PHBV concordaron con los valores de %de C, H y O calculados a partir de la masa molecular de los monómeros con la proporción de ácido 3-hidroxivalérico que indicó el proveedor.

Tabla 3.4. Resultados de análisis elemental del PHBV.

	Cálculo	Análisis
% C	56.30	56.14
% H	7.10	7.01
% O	36.60	36.85

Se determinó la masa molecular del polímero mediante cromatografía de permeación en geles (GPC). En esta técnica la separación de las moléculas de la muestra ocurre en virtud de su masa molecular, para ello se utiliza una columna empacada de geles de polímero (el más común es el copolímero poliestireno divinilbenceno) que posee partículas porosas de diámetro y porosidad controlada. Las moléculas de menor tamaño (menor masa molecular relativa) podrán interaccionar durante más tiempo con dichos poros a diferencia de las de mayor tamaño (mayor masa molecular relativa). Previamente la columna cromatografía debe ser calibrada con patrones de masa molecular conocida. De esta manera es posible obtener la distribución de la masa molecular del polímero caracterizada por la masa molecular promedio en número (M_n), masa molecular promedio en peso (M_w), masa molecular del pico más alto (MP) y la polidispersión (M_w/M_n). La Fig. 3.5 ilustra un cromatograma del PHBV obtenido en un sistema de dos columnas en serie y

cloroformo como solvente para la muestra y para la elución. Los valores de las masas moleculares y la polidispersión de la muestra se consignan en la Tabla 3.5. Los detalles de la técnica al igual que las condiciones cromatográficas se presentan en el Apéndice 3.

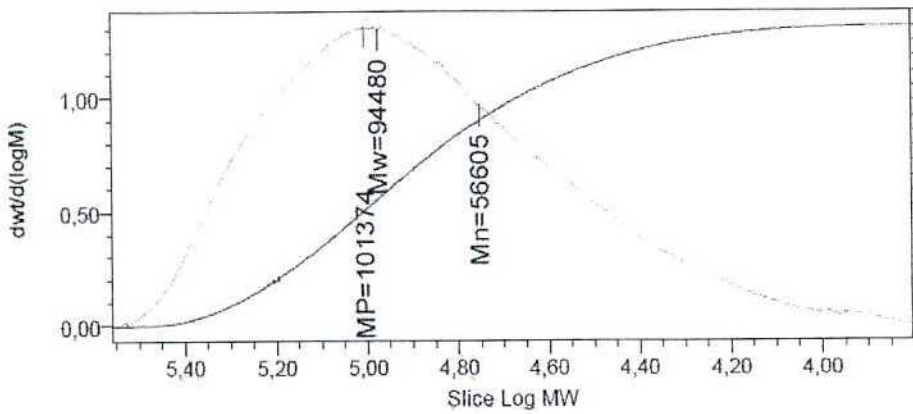


Fig. 3.5. Cromatograma GPC característico del PHBV.

Tabla 3.5. Parámetros del PHBV determinados por GPC.

	kDa
Mn	56
Mw	94
MP	101
Polidispersión	1,7

3.2. Lixiviado de sales

El método de lixiviado de sales, utilizado por primera vez en 1993 y 1994 por Mikos et al., permite emplear polímeros biodegradables para producir sustratos porosos de variadas formas [2, 3]. La técnica consiste en generar la matriz porosa por medio de un porógeno de una naturaleza diferente a la solución del polímero que conformará el sustrato. Dada esta diferente característica, el porógeno se mezcla con la solución del polímero en el proceso de elaboración del sustrato sin que exista interacción entre ambas fases. Luego de la evaporación o extracción del solvente el porógeno puede extraerse por lixiviado resultando así una matriz porosa. Los porógenos más utilizados son sales (cloruro de sodio [2,3], citrato de sodio [4], carbonato de amonio) o azúcares [5] que son insolubles en solventes orgánicos comunes. Algunos autores presentan trabajos en los que utilizan microesferas de gelatina de tamaño controlado para generar la matriz porosa [6]; en ese caso el

lixiviado se realiza con agua a una temperatura superior a la de disolución de la gelatina.

Una de las ventajas de esta técnica es la baja cantidad de polímero requerida en comparación, por ejemplo, con técnicas de formación de sustratos porosos que utilizan equipos de extrusión o de electrospinning, donde son necesarios varios kilogramos de material para el llenado de la maquinaria. Dado el bajo requerimiento de equipos es un método elegido en las etapas iniciales de desarrollo de sustratos.

Los principales pasos en este método son la preparación del agente porógeno y de la solución del polímero, la mezcla de ambas fases, el secado de la mezcla y el lixiviado del porógeno. Cada etapa presenta parámetros de proceso relevantes para lograr un sustrato con porosidad de tamaño adecuado y una buena interconexión. Los gránulos de sal se muelen a un determinado tamaño, ya sea manualmente o con asistencia de molinos analíticos. Luego, los gránulos se clasifican por granulometría y se selecciona la fracción adecuada para el tamaño de poros que se desea generar. Lee *et al.* elaboraron sustratos de gelatina por el método de lixiviado de sales; con el uso de gránulos de tamaños de 300 a 500 μm lograron tamaños de poros de 350 μm , que mostraron buena afinidad para el cultivo de fibroblastos [7].

La etapa de mezcla de la solución del polímero y el porógeno es crítica ya que un mezclado inadecuado puede provocar un sustrato con grandes inhomogeneidades debida a la sedimentación entre otros factores. Para evitarlo algunos autores preparan moldes con el porógeno seco y comprimido para luego verter la solución de polímero [8]. Un sustrato poco homogéneo no puede asegurar una buena interconexión entre los poros y por lo tanto no sería adecuado para su aplicación en Ingeniería de tejidos. En este sentido Murphy *et al.* optimizaron la técnica tradicional de lixiviado de sales mediante una fusión parcial de los gránulos del porógeno por exposición a un ambiente de alta humedad relativa [9]. Los gránulos parcialmente fusionados permiten asegurar una buena interconexión entre los poros. En este sentido, el trabajo de Zhang *et al.* plantea la elaboración de sustratos por lixiviado de sales con una estructura porosa del orden de 200-300 μm interconectados por poros de menor tamaño. Los fibroblastos cultivados en dichos sustratos mostraron buena adhesión y proliferación celular al cabo de 14 días de estudio [10].

3.2.1. Materiales

Se empleó cloroformo y etanol de grado pro análisis.

3.2.2. Procedimiento

Las membranas porosas se elaboraron por la técnica de lixiviado de gránulos de sal parcialmente fundidos [11]. Se utilizó cloruro de sodio como porógeno. A partir de los trabajos previos citados y teniendo en mente los valores de tamaño de poros buscados (20 a 125 μm) se utilizaron gránulos de entre 106 y 355 μm . Los gránulos se molieron manualmente en un mortero, se los clasificó con tamices estandarizados y se distribuyeron en placas de Petri de 100 mm de diámetro. Luego, se los sometió a una humedad relativa (HR) del 93% durante un determinado período de tiempo, para propiciar la fusión parcial que asegurará poros interconectados. Para ello se utilizó un recipiente cerrado que contenía una solución de ácido sulfúrico que genera un ambiente de humedad constante, cuyo valor está relacionado con la concentración del ácido [12]. La placa con los cristales se secaron en desecador con vacío durante 24 hs para eliminar restos de humedad. La fusión parcial de los cristales de cloruro de sodio se aprecia en las micrografías de la Fig. 3.6; luego de permanecer en el ambiente de alta humedad relativa los cristales de Naci perdieron la geometría cúbica y presentaron aristas redondeadas.

Se vertió una solución de PHBV en cloroformo 6% P/V hasta cubrir completamente los cristales de cloruro de sodio fusionados. Se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente y su eliminación se completó en una cámara de vacío por 2 horas. Se sumergió el polímero con los gránulos en su interior en agua destilada para desmoldarlo de la placa de Petri. La elución de la sal se completó dejando el sustrato en agua destilada durante 24 hs; se renovó el solvente 3 veces durante ese período. Por último se realizaron lavados con solución acuosa de etanol al 10% en volumen. Las membranas así obtenidas se secaron sobre papel de filtro y luego en desecador en vacío hasta estabilizar su peso seco.

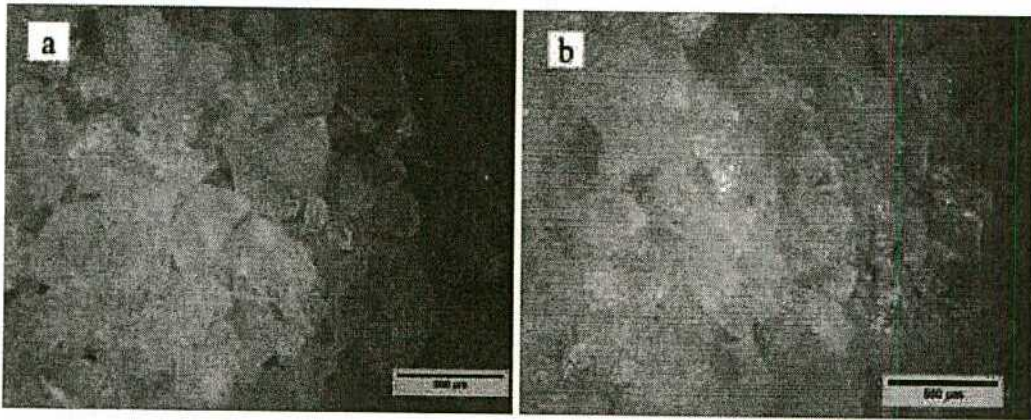


Fig. 3.6. Gránulos de NaCl a) sin fusionar b) fusionados a 93% HR durante 18 hs.

3.2.3. Caracterización

Morfología

Mediante la técnica de lixiviado de sales se obtuvieron membranas porosas de hasta un diámetro de 10 cm y espesor desde $(0,50 \pm 0,02)$ mm a $(1,50 \pm 0,02)$ mm; dicho valor puede ser modificado cambiando el espesor de la cama de sal utilizada. La Fig. 3.7 ilustra un sustrato obtenido por lixiviado de sales.

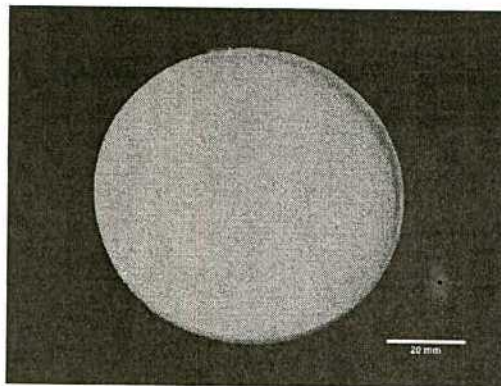


Fig. 3.7. Membrana porosa obtenida por lixiviado de sales. La escala indica 20 mm.

La morfología de las muestras se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); para mejorar la conducción electrónica y evitar que se carguen las muestras, éstas fueron recubiertas con oro. Las micrografías se tomaron a bajo vacío en un equipo FEI Quanta 200 y el tamaño medio de poros se determinó con el programa de análisis de imágenes, ImageJ®, tal como se ilustra en la Fig. 3.8. La medición se realizó en 3 micrografías por muestra y 30 poros por micrografías.

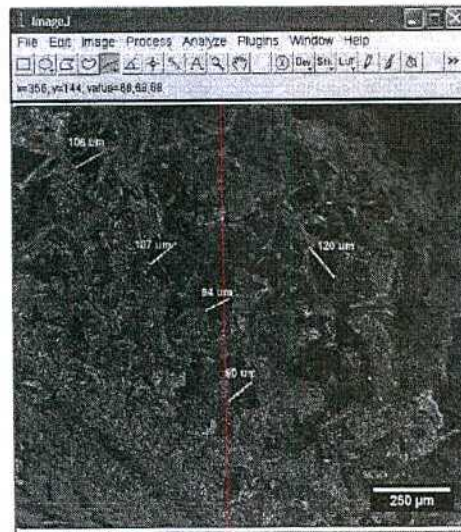
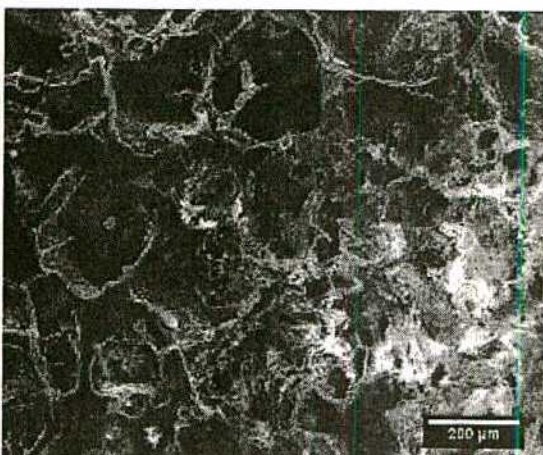
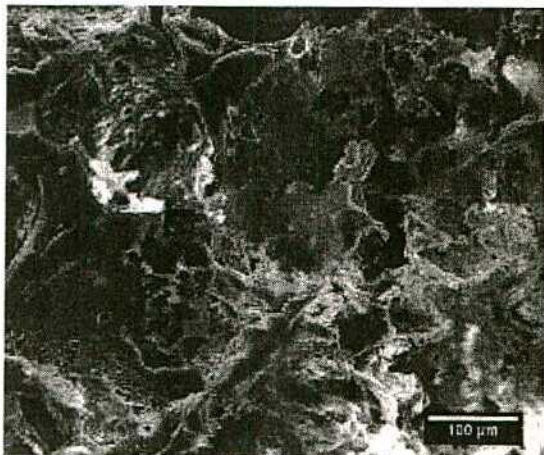


Fig. 3.8. Uso de ImageJ para la medición del tamaño de poros en las micrografías SEM.

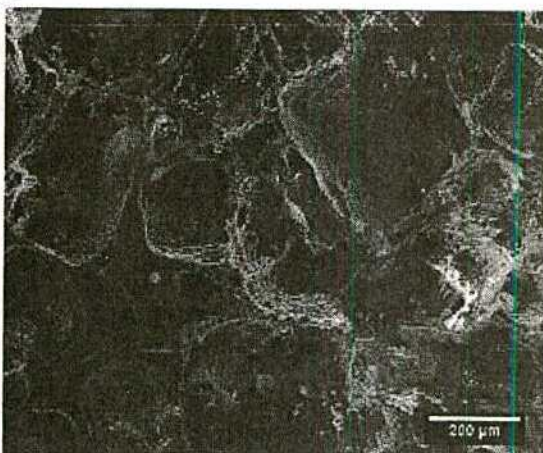
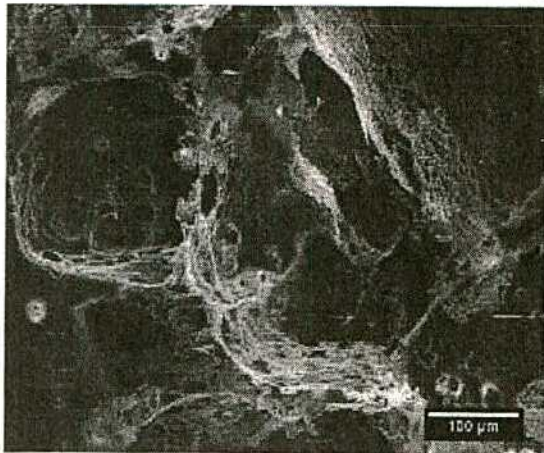
El tiempo de permanencia de la camas de sal en el medio con 93%HR, es la variable que controla el tamaño e interconexión de los poros, tal como puede verse en la secuencia de micrografías la Fig. 3.9. A medida que aumenta el tiempo de fusión parcial del agente porógeno, en general se observan morfologías más complejas, se pierde la forma cúbica propia de los cristales de cloruro de sodio. Además, las paredes de los poros se tornan más delgadas como consecuencia de dicho proceso.

La medición del tamaño de poros presenta una dispersión entre 30 y 40%, tal como se indica en la Tabla 3.6 y se observa en la Fig. 3.10. Esto se debe a que los cristales de sal tenían, aún a pesar del tamizado, una alta dispersión en la granulometría. Se puede decir que los poros obtenidos a partir de la sal sin estar expuesta a la condición de humedad revelan el tamaño real de dichos cristales. La fusión de los cristales de menor tamaño provoca un aumento de la población de poros de menor tamaño hacia las 4 hs de fusión parcial. Luego continúa el crecimiento del tamaño de cristales por fusión haciendo que los valores de tamaño de poros tiendan al tamaño inicial de los gránulos de sal. La significancia estadística de las diferencias de los valores promedio de tamaño de poros se llevó a cabo por medio del Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor con un test de Fisher de comparaciones múltiples. Para este análisis se utilizó el programa OriginPro 8.

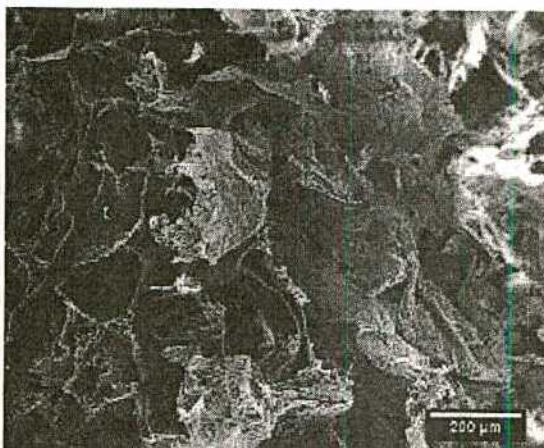
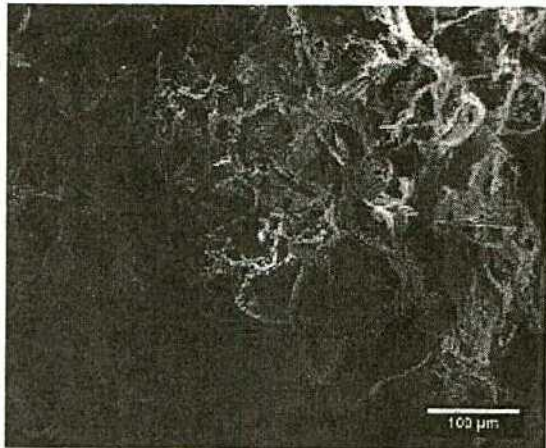
0 hs



2 hs



4 hs



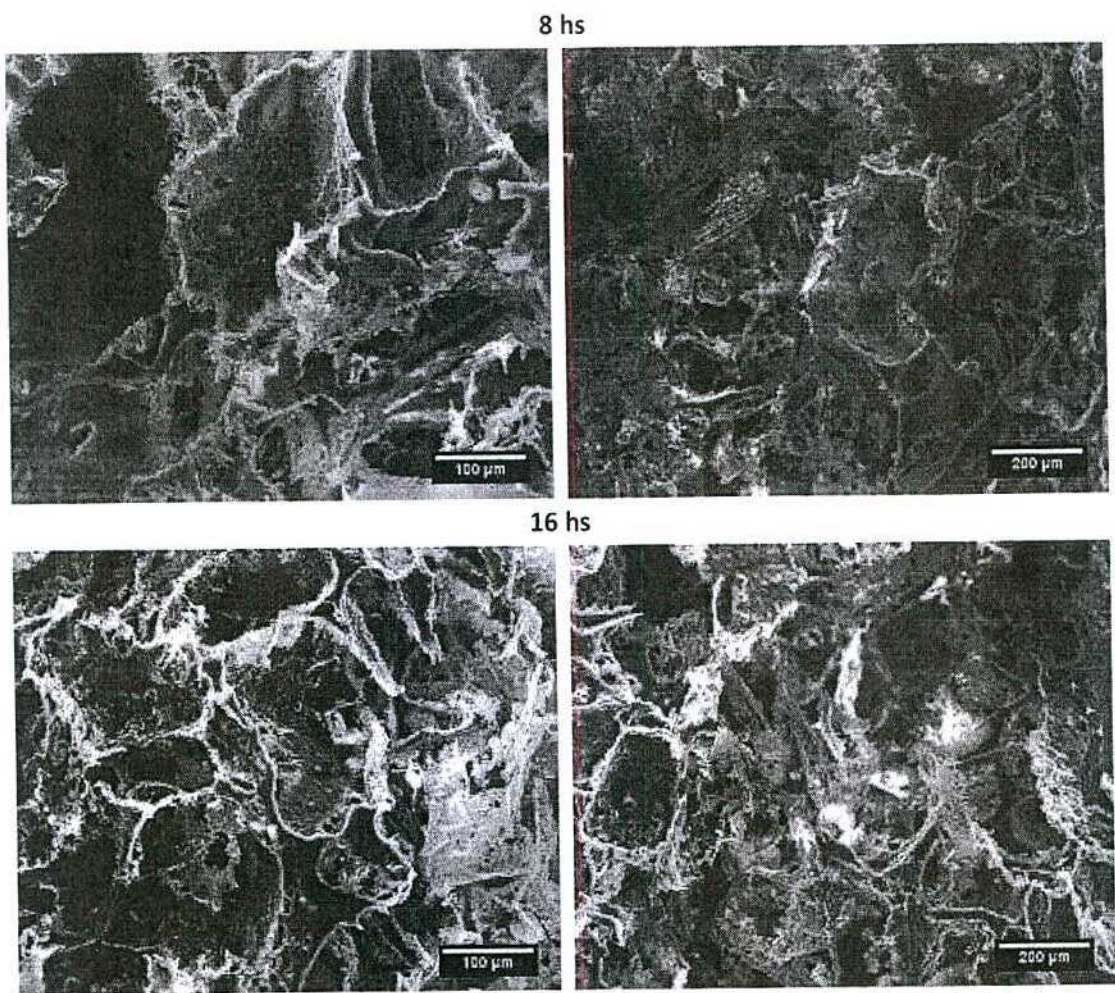


Fig. 3.9. Micrografías SEM de cortes transversales de muestras obtenidas por lixiviado de sales, a diferentes tiempos de fusión parcial de los gránulos de sal.

Tabla 3.6 Diámetro de poros medidos a partir de las micrografías

Tiempo (h)	Diámetro de poros (μm)
0	179 ± 56
2	138 ± 36
4	97 ± 55
8	126 ± 89
16	133 ± 39
18	167 ± 63

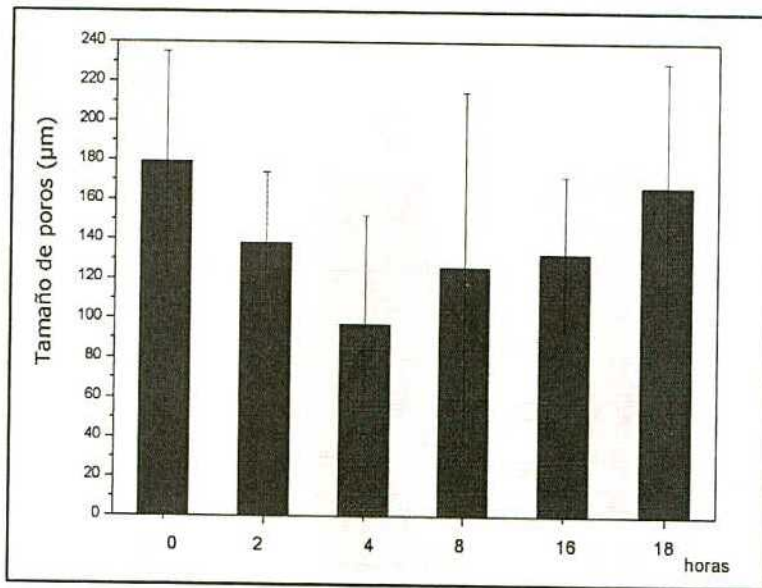


Fig. 3.10. Tamaño de poros de sustratos a diferentes tiempos de fusión parcial de gránulos.

El análisis de la varianza (ANOVA) de un factor de los tamaños de poros permite asegurar que los valores medios son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 0,05. La Tabla 3.7 muestra los valores de suma de cuadrados y cuadrados medio calculados para la aplicación del método ANOVA.

Tabla 3.7. Tabla del análisis de la varianza de los tamaños de poros de las muestras por lixiviado de sales.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Prob(F (5,168)>F)
Entre grupos	5	124200	24840	8,6397	2,63E-7
Dentro de grupos	168	483016	2875		
Total	173	607216			

Hipótesis

H_0 : todas las medias son iguales

H_1 : las medias de uno o más niveles son diferentes.

Las medias poblacionales son significativamente diferentes a un nivel de confianza de 0,05.

Una observación en detalle del sustrato obtenido a partir de gránulos expuestos a humedad por 18 hs se presenta en la Fig. 3.11; ésta muestra con claridad la porosidad interconectada, requisito necesario para su aplicación como soporte celular. La Fig. 3.12, por su parte, muestra dos magnificaciones del corte transversal del mismo sustrato, que ilustran claramente la interconexión alcanzada por medio de la fusión parcial de los gránulos de cloruro de sodio. Se observa una mayor rugosidad y la aparición de poros de menor tamaño en las paredes de los poros grandes. Este proceso

también puede verse en la secuencia de la Fig. 3.9a medida que aumenta el tiempo de exposición de la sal a 93% HR.

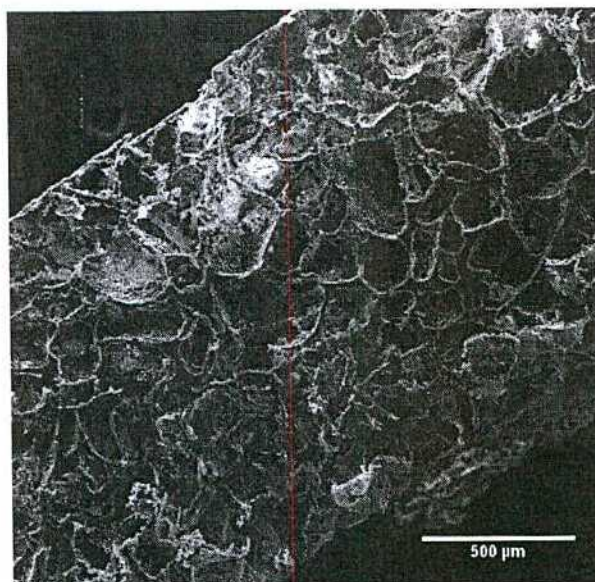


Fig. 3.11 Corte transversal del sustrato con gránulos fusionados durante 18 hs

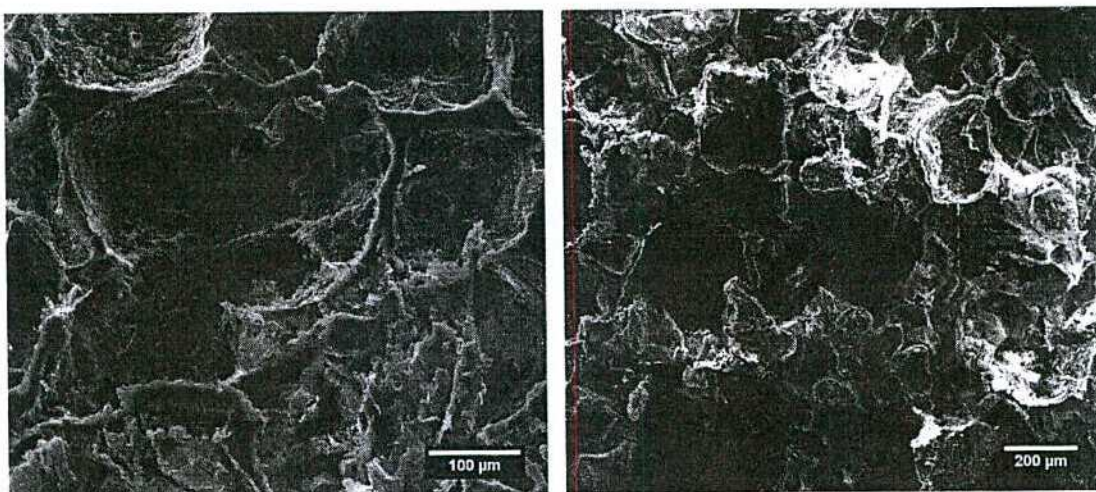


Fig. 3.12 Detalles de las paredes del corte transversal del sustrato obtenido con gránulos fusionados durante 18 hs.

Propiedades mecánicas

Las muestras pueden comprimirse con facilidad, sin embargo, la sollicitación mecánica a la que estará sometido el sustrato es fundamentalmente la de flexión. Se intentó evaluar este comportamiento a través de un dispositivo de flexión a tres puntas normalizado, montado sobre una máquina de ensayos Instron 5500R. Aún cuando se

los trató con sumo cuidado, la mínima flexión de los discos elaborados por lixiviado producía la rotura prácticamente sin deformación plástica.

3.2.4. Optimización de la hidrofiliidad de los sustratos

Para evaluar el carácter hidrofílico de los sustratos se midió el ángulo de contacto. Para ello se utilizó un sistema óptico montado en el laboratorio que permitió la toma de imágenes con una cámara digital de una gota de 5 μ l de agua desionizada apoyada sobre la membrana (método estático). Las imágenes obtenidas de este modo se analizaron realizado con el programa ImageJ®, para la medición del ángulo de contacto como se ilustra en la Fig. 3.13.

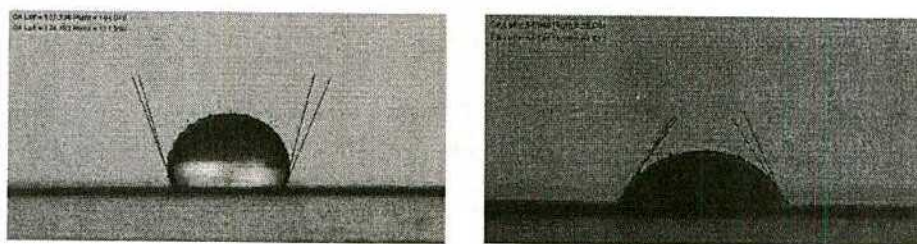


Fig. 3.13. Ejemplos del uso de ImageJ para la medición del ángulo de contacto. Izq. sobre una membrana altamente hidrofóbica. Der. sobre una membrana de menor carácter hidrófobo.

La medición de ángulo de contacto para las muestras de lixiviado de sales fue de $105 \pm 7^\circ$. Esto es inapropiado para lograr que el medio acuoso se absorba en el sustrato y que así permita una adecuada proliferación celular. Para mejorar esta respuesta, debida al elevado carácter hidrófobo del PHBV, se pueden aplicar diferentes técnicas de hidrofiliización. En particular, en este trabajo se probaron dos métodos de hidrólisis: uno enzimático y otro químico.

El uso de enzimas para el aumento de la hidrofiliidad de numerosos polímeros sintéticos es un recurso utilizado a nivel industrial. Estas aplicaciones se ven también motivadas por la disponibilidad de enzimas de diferentes orígenes, aisladas, por ejemplo, de microorganismos modificados genéticamente. La hidrólisis enzimática de poliésteres se puede llevar a cabo con lipasas, enzimas con actividad hidrolítica sobre los grupos ésteres de estos polímeros. Estas enzimas se aplicaron con éxito en el aumento de la hidrofiliidad y mojabilidad de fibras de polietilentereftalatos (PET) [13]. Wang et al. [14] utilizaron lipasas de la empresa Novozymes para el aumento de la hidrofiliidad de sustratos de PHA y demostraron una mejora en la biocompatibilidad,

además de la posibilidad de realizar recubrimientos de ácido hialurónico más efectivos debido a dicha mejora.

Hidrólisis enzimática

Se utilizó una preparación enzimática líquida comercial de Novozymes (EN) con una actividad de 15 KLU(kilo unidad de lipasa)/g. También se utilizó lipasa de *Candida rugosa* (CRL) con una actividad declarada de 1302 U/mg. Una unidad de enzima³ hidroliza 1,0 microequivalente de ácido graso de un triglicérido en 1 hora a pH 7,2 a 37°C.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática real depende de la forma de conservación y la fecha de preparación del producto, por ello es necesario determinar la actividad exacta de la lipasa antes de aplicarla. La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo por medio de un procedimiento estándar de control de calidad publicado por la empresa Sigma® (Sigma Quality Control Test Procedure-Enzymatic Assay of LIPASE (EC 3.1.1.3)).

Se utilizaron los siguientes reactivos:

Solución salina buffer de fosfato (PBS) pH: 7,4 (Ver preparación en Apéndice3)

Aceite de oliva.

Etanol 98%

Solución valorada de NaOH 0,05 N

Solución enzimática: preparada inmediatamente antes de su uso debe contener 500 a 1000 unidades de lipasa/ml en agua destilada fría

El procedimiento consistió básicamente en hidrolizar el aceite de oliva en condiciones estándar para la enzima (37°C y pH: 7,4) durante un tiempo exactamente medido. Luego de ese período de tiempo se inactiva la enzima por agregado de etanol y se miden los moles de ácido producido por titulación con NaOH valorado. Estos parámetros permiten determinar, por medio de cálculos simples, el número de unidades enzimáticas por mg de enzima.

Se prepararon soluciones de ambas enzimas en solución buffer salina de fosfatos (PBS) de pH: 7,4 con diferentes actividades, 1000, 5000 y 10000 U/l.

³ Se define unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto (o la conversión de 1 μmol de sustrato) por minuto en condiciones estándar. La actividad específica se define como el número de unidades enzimática por mg de proteína.

Se cortaron muestras cuadradas de membranas porosas de 1 cm de lado aproximadamente y se las sumergió en las soluciones enzimáticas a 30°C y agitación de 100 rpm durante 20 hs. Completado el período se enjuagaron las muestras con agua destilada y luego con etanol 10% con el fin de inactivar y eliminar restos de enzima. Por último, se las secó en desecador con vacío y se analizaron.

Hidrólisis alcalina

Se cortaron muestras cuadradas de 1 cm de lado y se las sumergieron durante diferentes períodos de tiempo con un máximo de 45 minutos en una solución acuosa de NaOH 0,5 N a 55°C. Luego se las enjuagaron con abundante agua destilada y, por último, solución 70% etanol en agua. Se mantuvieron durante 1 hora en desecador con vacío para asegurar completa sequedad.

Caracterización

La hidrólisis enzimática resultó efectiva para el aumento de la hidrofiliidad de los sustratos porosos. En efecto, la Tabla 3.8 muestra la disminución del ángulo de contacto en todas las condiciones de hidrólisis. La lipasa de *Candida rugosa* resultó más eficiente que la preparación enzimática de Novozymes (lipasas EN) para la misma actividad. Para ambas enzimas, el ángulo de contacto disminuyó con la concentración de la lipasa. En el caso de la *Candida rugosa*, para una concentración de 10 KLU/l, la gota de agua dispuesta sobre la superficie porosa tratada se absorbió completamente en unos segundos. No se observaron variaciones en el peso seco de las muestras tratadas enzimáticamente, lo que evidenció que el tratamiento ocurrió a nivel superficial de las muestras.

Tabla 3.8. Ángulo de contacto luego de la hidrólisis enzimática.

	Lipasa EN	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
Original	105±7	105±7
1KLU/l	70±12	96±10
5KLU/l	66±5	58±23
10KLU/l	27±4	0

Las micrografías SEM (Fig. 3.14) muestran una evidente erosión superficial de los sustratos como consecuencia de los tratamientos enzimáticos.

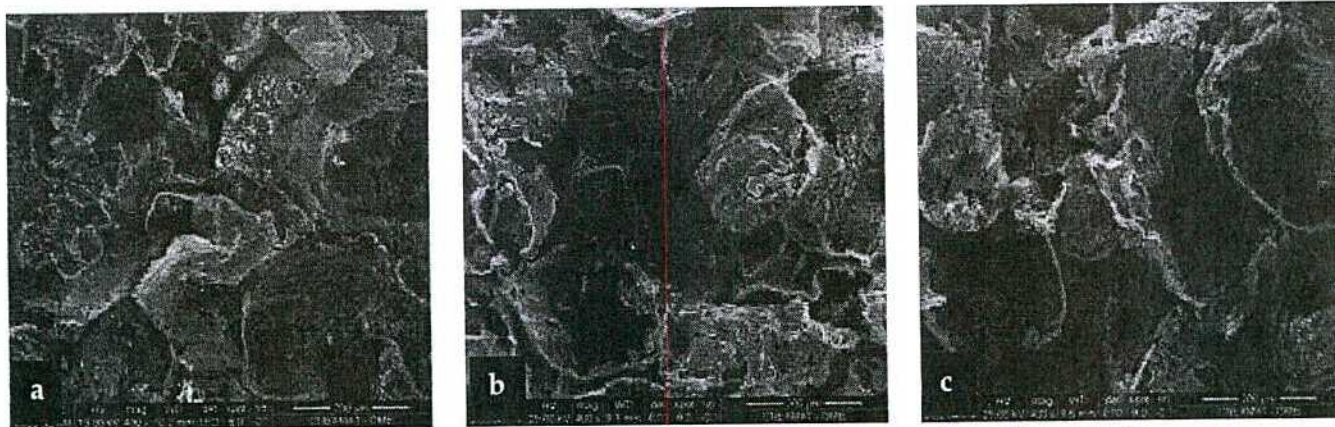


Fig. 3.14. Comparación de la morfología de los sustratos sin tratamiento (a) y tratados enzimáticamente con CRL (b) y con EN (c), ambas con una actividad de 10 KLU/l.

Dados estos buenos resultados se buscó reducir los tiempos de hidrólisis para optimizar el tiempo de esta etapa del proceso productivo. Se realizaron tratamientos en condiciones similares a las descritas pero duplicando la actividad de las soluciones enzimáticas y reduciendo los tiempos de exposición a 2 y 3 hs. La Tabla 3.9 exhibe los ángulos de contacto medidos; ambas enzimas permitieron obtener sustratos completamente hidrofílicos a las 3 hs de tratamiento enzimático.

Tabla 3.9 Ángulos de contacto de las muestras sometidas a hidrólisis enzimática a 20KLU/l.

	Lipasa EN	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
Original	105±7	105±7
20 KLU/l 2 hs	23±5	32±6
20 KLU/l 3 hs	0	0

Los tratamientos de hidrólisis alcalina también fueron efectivos para incrementar la hidrofiliidad de los sustratos. Como se puede observar en la Tabla 3.10, 45 min de tratamiento dieron lugar a un sustrato completamente hidrofílico que absorbió la gota de agua en pocos segundos.

Tabla 3.10. Ángulos de contacto de muestras elaboradas por lixiviado de sales, sometidas a hidrólisis alcalina.

Tiempo(min)	Ángulo de contacto (°)
0	106±2
15	54± 3
30	13± 4
45	0

Ambas hidrólisis resultaron efectivas para obtener sustratos completamente hidrofílicos. Sin embargo, vale la pena destacar que las enzimas requieren condiciones más suaves de reacción (solución buffer pH 7,3) que la hidrólisis alcalina (solución de pH~13). Las enzimas poseen una determinada conformación para reaccionar por ello se dice que son catalizadores estereoespecíficos a diferencia de la hidrólisis alcalina que procede inespecíficamente. Esta es una de las ventajas de las enzimas frente a las reacciones de química llevadas a cabo en condiciones tradicionales. Además, dicha característica hace que la presencia de productos secundarios de reacción sea muy baja o nula.

Con el fin de encontrar señales espectroscópicas que permitieran caracterizar la hidrólisis se analizaron soluciones de las muestras hidrolizadas con ambos tipos de tratamiento por FTIR. Las soluciones se evaporaron sobre ventanas de KBr y se registraron los espectros FTIR. La Fig. 3.15 es una comparación de los espectros correspondientes a la muestra sin hidrolizar e hidrolizada por NaOH durante 45 min.

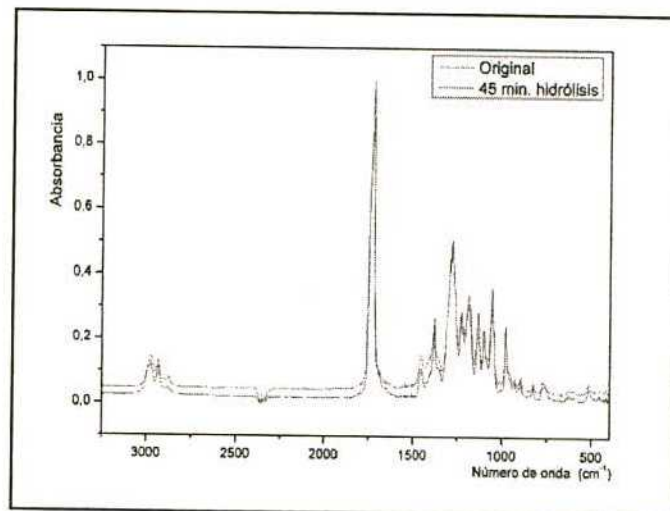


Fig. 3.15. Espectro FTIR de la muestra sin hidrolizar e hidrolizada por NaOH 0.5 N durante 45 minutos.

No se observaron cambios, ya sea por desplazamiento o por aparición de nuevas señales. Si bien el tratamiento resultó exitoso con respecto al aumento en la hidrofilidad del sustrato, el número de grupo éster hidrolizados por ambos

tratamientos sobre el PHBV de alto peso molecular utilizado como materia prima, no fue lo suficientemente importante como para ser detectado por FTIR. Este resultado es consistente con lo publicados por varios autores [14,15].

Con el objetivo de cuantificar el efecto superficial de las hidrólisis en términos de la densidad de grupos carboxilos por unidad de área, se emplearon películas obtenidas por evaporado de solvente (solvent casting) cuya área efectiva coincide con el área nominal debido a su escasa rugosidad. No pudo realizarse la misma determinación utilizando membranas porosas obtenidas por lixiviado de sales, debido a la dificultad para establecer con precisión su área superficial. Sobre las películas se realizó un tratamiento de hidrólisis alcalina sumergiéndolas en una solución de NaOH 0,5 N a 55°C por 1, 2 y 3 horas.

Posteriormente se aplicó un procedimiento colorimétrico para la determinación de la densidad superficial de grupos carboxilos [16,17]. El procedimiento fue el siguiente: se expusieron las películas a una solución 5×10^{-4} M del colorante básico Azul de Toluidina O (C.I. 52040) a pH 10 a 30 °C por 5 hs. Luego de la tinción, se lavaron con agua destilada e NaOH 0,1 mM para remover el colorante no complejoado. Por último, se desorbió el colorante adherido con ácido acético 50 % v/v y se determinó la concentración de cada muestra por espectrofotometría UV-visible del colorante mediante una curva de calibración a 633 nm. Se calcularon las densidades superficiales de los grupos carboxilos asumiendo que el colorante compleja un número equivalente de moles de grupos carboxilos en la superficie. Los resultados de las densidades superficiales de los grupos carboxilos se resumen en la Tabla 3.11. Se observa un aumento de la densidad hasta las 2 horas de hidrólisis; luego a mayor tiempo de tratamiento la densidad no parece cambiar significativamente.

Tabla 3.11. Densidades superficiales de grupos carboxilos

Tiempo (hs)	Densidad ($\mu\text{moles}/\mu\text{m}^2$)
0	14
1	16
2	22
3	23

A partir de estos resultados se puede concluir que al cabo de 2 horas de hidrólisis, aproximadamente se triplica la densidad de grupos carboxilo; luego se estabiliza el proceso.

3.3. Separación de fases inducida térmicamente

La técnica de separación de fases en polímeros fue utilizada en la fabricación de membranas porosas para uso no médico [18] y para producir microesferas destinadas a la incorporación de agentes farmacéuticos y biológicos [19].

Existen variadas formas de inducir la separación de fases: por disminución de la temperatura, por agregado de un no solvente y por reacción química en el sistema monofásico [20]. En el presente trabajo se utilizará la técnica de separación de fases inducida térmicamente (thermal induced phase separation, TIPS). Esta técnica consiste en disolver el polímero en un buen solvente a la concentración adecuada y bajar rápidamente la temperatura de la solución lo que determina la reducción de la solubilidad y la consecuente formación de una nueva fase, que puede ser sólida o líquida, a la cual se incorpora el polímero que segrega la solución enfriada. Es decir que, reduciendo la temperatura de una solución polimérica homogénea se puede alcanzar una estructura bifásica con: una fase rica y otra pobre en concentración del polímero (separación líquido-líquido) o una solución pobre en el polímero y una fase polimérica sólida (separación sólido-líquido).

En la separación líquido-líquido, la morfología de cada fase depende de la concentración de la solución enfriada. Así, a bajas concentraciones la separación se manifiesta mediante la formación de núcleos dispersos en una solución pobre en el polímero; cuando se extrae el solvente, los núcleos quedan como partículas de polímero, es decir que la separación deja una estructura de polvo. En cambio, al enfriar rápidamente una solución con alta concentración de polímero, la estructura resulta una matriz polimérica con poros cerrados, que ocluyen el solvente. La separación de fases en soluciones con concentraciones poliméricas intermedias, entonces, permitiría lograr una estructura no pulverulenta sino integrada, con poros interconectados [21] (ver Apéndice 4).

La separación sólido-líquido, en cambio, tiene lugar si la temperatura de cristalización del solvente es mayor que la de separación de fases. Si esto sucede, a medida que la temperatura disminuye el solvente cristaliza y expelle al polímero del frente de cristalización [18]. La estructura final depende de la competencia entre la separación líquido-líquido y la naturaleza del proceso de cristalización: vitrificación, cristalización del polímero o solidificación del solvente.

Luego de la separación de fases sólido-líquido o líquido-líquido el solvente se debe extraer del sistema. Es necesario realizar este proceso a baja temperatura para evitar

que la fusión del solvente y la consecuente disolución del polímero. Por ello la extracción se lleva a cabo por medio de liofilización (freeze drying). De esta manera, el solvente sublima por la presión reducida a la que está expuesto dejando la estructura porosa deseada. Existe una alternativa para la extracción del solvente y consiste en realizarla por medio de un solvente que no disuelva al polímero pero que sea miscible con el solvente del sistema. Este método se realiza también en frío y se lo conoce como "freeze extraction". Lo aplicó Ho et al. usando etanol [22] sobre matrices de PLLA y PLGA.

Por todo lo dicho, este método resulta atractivo para evaluar la posibilidad de establecer el tamaño de los poros así como su interconexión controlando los parámetros del proceso para soluciones de PHBV.

3.3.1. Materiales

Además de PHBV se utilizó dioxano y etanol grado analítico.

3.3.2. Procedimiento

Se preparó una solución de PHBV en dioxano 6% P/V . Se mezcló el polímero con el solvente hasta lograr una completa disolución. Se colocaron alícuotas de 5 ml de la solución en placas de Petri de vidrio borosilicato. Se dividieron estos recipientes en cuatro grupos, cada uno fue sometido a diferentes procesos de enfriamiento para provocar la separación de fases: i) 8°C, heladera, ii) 0°C, baño de hielo y agua, iii) -5°C, freezer y iv) -196°C, baño de nitrógeno líquido, durante 30 minutos. Las muestras se identificaron con las letras H, A, F y N, respectivamente. Finalmente, cada grupo de muestras se liofilizó durante 25 hs a -86°C en un liofilizador Labconco Free Zone Plus.

3.3.3. Caracterización

Morfología

Mediante este método pudieron obtenerse muestras desde 5 a 10 mm de espesor y de un tamaño máximo de 4 cm de diámetro. La Fig. 3.16 ilustra el aspecto general de una muestra obtenida por separación de fases.

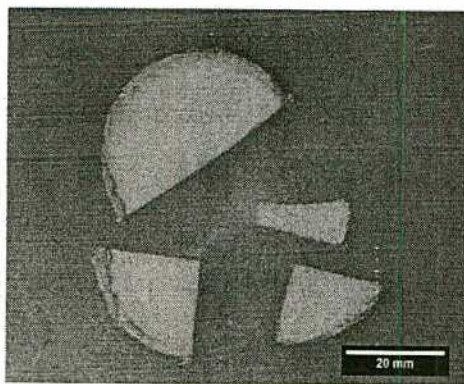


Fig. 3.16. Aspecto general de una muestra obtenida por separación de fases.

En primer lugar, interesa evaluar la influencia de la velocidad de enfriamiento en la estructura de los sustratos. Para eso se realizaron cortes transversales de las matrices porosas elaboradas con diferente velocidad de enfriamiento (H, A, F y N en orden creciente de dicha velocidad). Las muestras, cubiertas con oro, se observaron por microscopía de barrido electrónico. Las micrografías se obtuvieron en un equipo FEI Quanta 200 con bajo vacío; el tamaño promedio de poros se midió por medio del programa de análisis de imágenes, ImageJ®. La significancia estadística de los tamaños de poros medidos se evaluó por medio de un Análisis de la Varianza de un factor (temperatura) con un test de Fisher de comparaciones múltiples. Para ello se utilizó el software OriginPro8.

Las micrografías de la muestra H, enfriadas a 8°C, permiten observar una estructura de poros irregular de paredes delgadas (Fig. 3.17). Las paredes fracturadas pueden deberse al proceso de corte de la muestra. La Fig. 3.18 destaca que la estructura de la superficie es similar a la de los cortes transversales, así como las dimensiones de los poros medidos a partir de las micrografías (Tabla 3.12).

Las estructuras observadas en la muestra A, enfriada a 0°C, son similares a las observadas en la muestra H, como puede verse en la Fig. 3.19. La superficie de esta muestra resulta en una estructura cerrada de poros circulares de menor tamaño que los poros internos (Fig. 3.20).

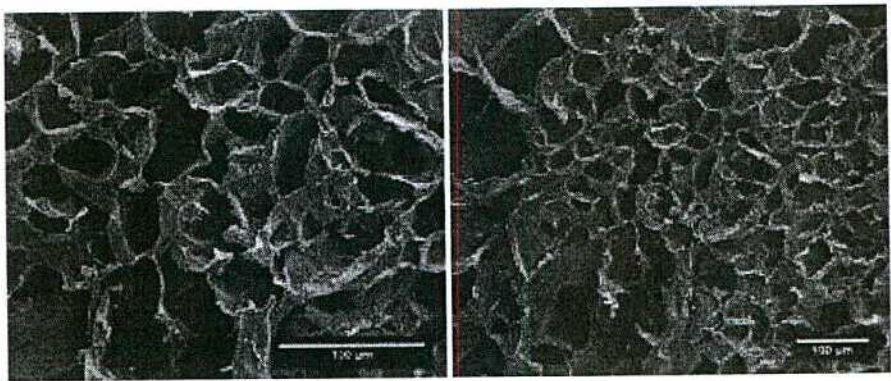


Fig. 3.17. Micrografías SEM de cortes transversales de muestra H.

Tabla 3.12. Tamaño de poros (μm) de las muestras fabricadas por separación de fases.

Muestra	Corte transversal	Corte superficial
H	41 ± 9	44 ± 11
A	63 ± 12	14 ± 3
F	36 ± 17	34 ± 7
N	10 ± 2	19 ± 5



Fig. 3.18. Micrografía SEM de corte superficial de la muestra H.

Las muestras obtenidas por enfriamiento a -5°C (F) poseen extensos poros de $(134\pm35) \mu\text{m}$ rodeados de poros pequeños de $(36\pm17) \mu\text{m}$. La elevada dispersión en los valores denota la irregularidad de los poros, lo que resulta evidente en las micrografías de la Fig. 3.21. La superficie de la muestra posee una orientación regular de poros de menor dimensión; detalles de la superficie permiten apreciar que dichos poros están formados por estructuras globulares (Fig. 3.22).

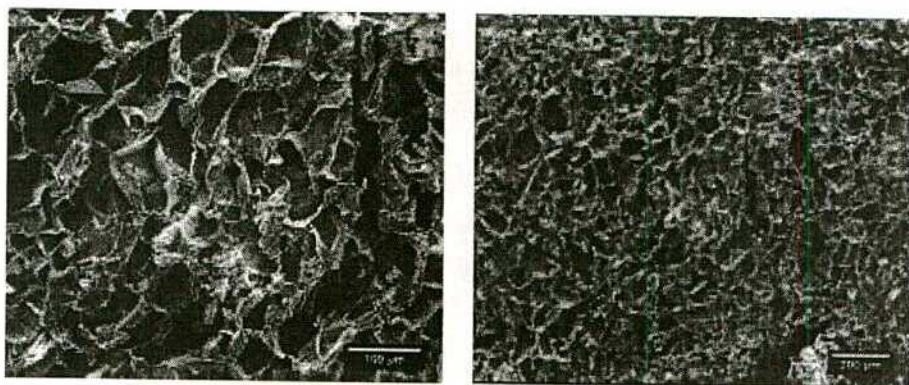


Fig. 3.19 Micrografías de corte transversal de la muestra A.

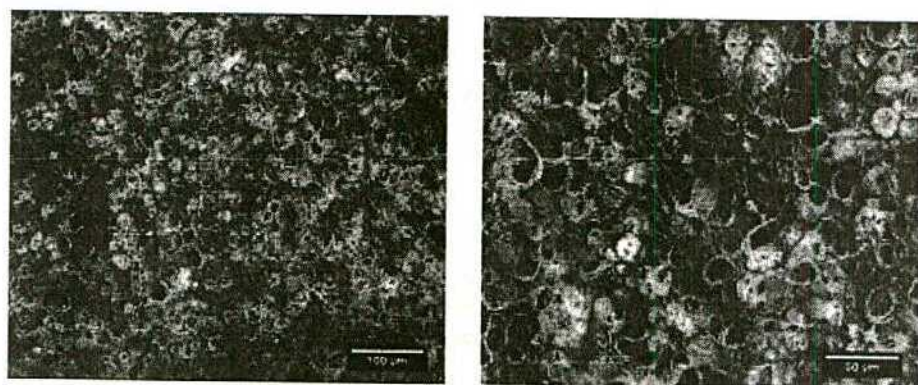


Fig. 3.20. Detalles de la superficie de la muestra A.

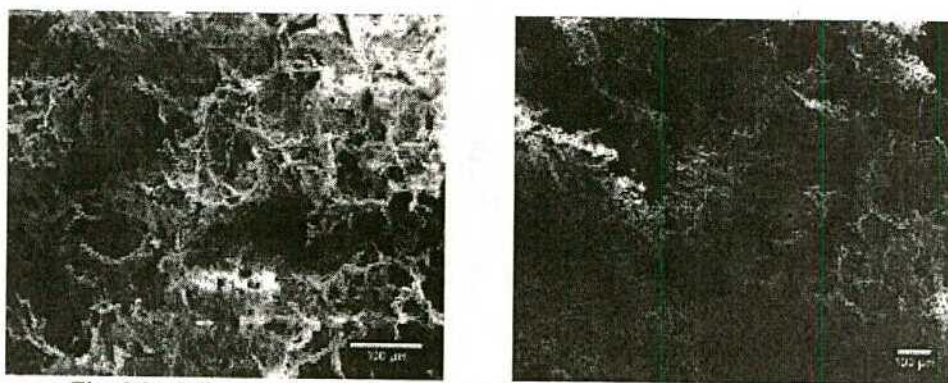


Fig. 3.21. Micrografías SEM de cortes transversales de la muestra F.

La muestra obtenida a -196°C (N) presentó el menor tamaño de poros. La morfología de esta muestra es compleja, compuesta por poros alargados de $(21 \pm 6) \mu\text{m}$ y poros de menor dimensión. Como puede observarse en la Fig. 3.23, existe una orientación de los poros; ésta coincide con la dirección de enfriamiento y se hace más notable en la interfase de la muestra con el recipiente. La superficie consiste en una estructura cerrada de conglomerados de polímero y espacios vacíos irregulares (Fig. 3.24).

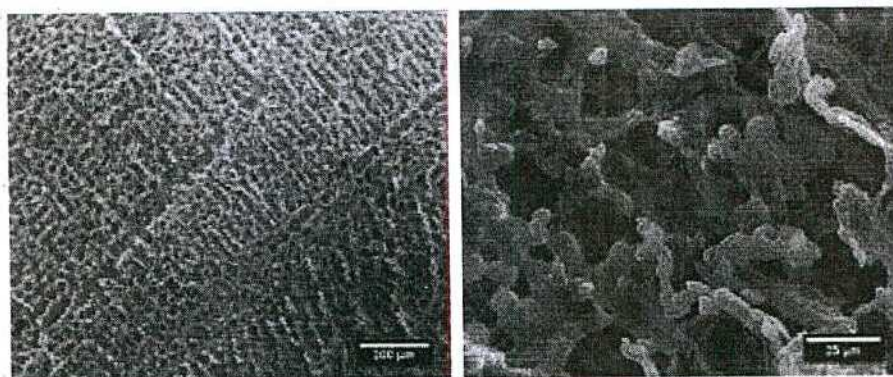


Fig. 3.22. Micrografías SEM de cortes superficiales de la muestra F: a) aspecto general, b) detalle de la superficie.

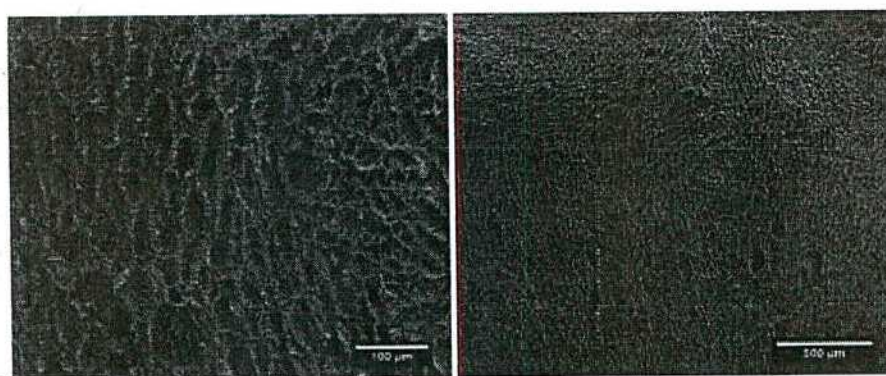


Fig. 3.23. Micrografía SEM de cortes transversales de la muestra N: a) detalle de los poros orientados b) aspecto general.

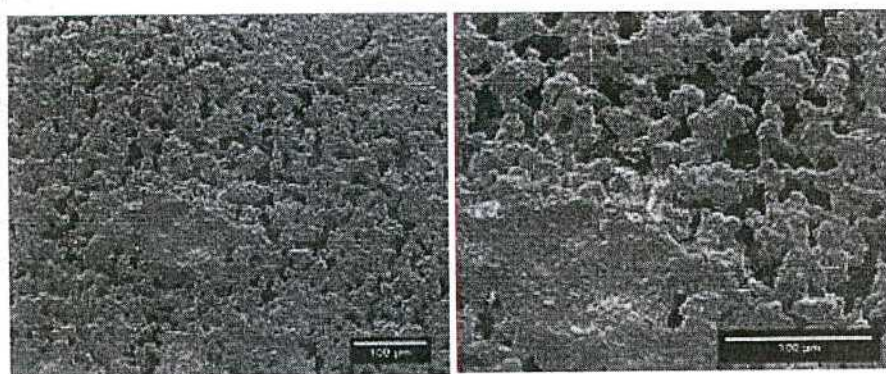


Fig. 3.24. Micrografía de la superficie de la muestra N: a) aspecto general b) detalle de la superficie.

De acuerdo con las tablas del análisis de la varianza del tamaño de los poros transversales y poros superficiales, Tabla 3.13 y Tabla 3.14 respectivamente, se puede asegurar que los tamaños de poros son distintos con un nivel de significancia de 0,05. Es decir, al variar la temperatura de separación de fases se puede controlar la porosidad de los sustratos.

Tabla 3.13. Tabla del análisis de la varianza de los poros transversales

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Prob(F (3,82)>F)
Entre grupos	3	31456	10485	96,5295	1,26E-12
Dentro de grupos	82	8907	109		
Total	85	40363			

Tabla 3.14. Tablas del análisis de la varianza de los poros superficiales

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Prob(F (3,82)>F)
Entre grupos	3	5744	1915	37,8917	2,23E-11
Dentro de grupos	37	1869	50		
Total	40	7614			

Propiedades mecánicas

Dada la fragilidad de las muestras obtenidas no fue posible evaluar su comportamiento en tracción o flexión. En efecto, la simple flexión de los discos elaborados por separación de fases inducida térmicamente determinaba la rotura prácticamente sin deformación plástica.

3.4. Evaporación de emulsiones

La evaporación de emulsiones es una técnica probada para la elaboración de sustratos [23,24] y nano o micropartículas [25,26] con aplicación en distribución controlada de fármacos. Una de las principales ventajas de este método es la producción de sustratos en un solo paso en el que, además, se podrían incorporar moléculas como factores de crecimiento, antibióticos, etc. sin recurrir a pasos extra en la elaboración. Las emulsiones son mezclas físicas de dos fases inmiscibles y, por lo tanto, son sistemas termodinámicamente inestables, caracterizados por la energía libre de la emulsión (ΔG_i). Esta energía está dada por

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S_f \quad (3.1)$$

donde, γ y ΔA representan la tensión superficial y el área de la interfase en la emulsión, respectivamente, T es la temperatura absoluta y ΔS_f , la entropía de formación de la interfase. Una buena emulsión se logrará al incrementar el área de la interfase, esto es, cuando ΔG_i se hace positiva. La velocidad con que se revierta el estado inestable de la emulsión puede reducirse mediante la presencia de un surfactante (o tensioactivo) que

reduce dicha energía libre (al promover el aumento del área de la interfase) y por lo tanto estabiliza la emulsión.

El proceso de generación de una emulsión consiste, en un primer paso, en la formación de gotas y la posterior deformación y disrupción de estas gotas en otras de menor dimensión. A continuación, el surfactante debe adsorberse en la interfase para estabilizar las gotas de menor tamaño. El objetivo de la emulsificación es combinar dichas etapas entregando la energía necesaria para formar y dispersar ambas fases. Para ello se recurre a mezcladores mecánicos, disruptores ultrasónicos u homogeneizadores. Existe una gran variedad de surfactantes que pueden emplearse para la generación de emulsiones. La mayoría son moléculas hidrofílicas como el alcohol polivinílico, los polisorbatos (Tween®), el ácido poliacrílico, los poloxámeros (Pluronic®) y el dodecil sulfato de sodio (SDS).

Para lograr membranas de espesor homogéneo a partir de las emulsiones se utilizó un procedimiento referido en la literatura [27] que emplea un dispositivo extensor, que consta de una placa sobre la cual se extiende la emulsión con la asistencia de una cuchilla. La separación entre placa y cuchilla se regula para controlar el espesor de la membrana.

3.4.1. Materiales

Se empleó un surfactante no iónico aprobado para uso parenteral y bromatológico, etanol absoluto pro análisis de Carlo Erba, cloroformo grado pro análisis de Sintorgan y agua desmineralizada.

3.4.2. Procedimiento

Formulaciones con etanol

Se aplicó una técnica modificada del método de evaporación de solventes en emulsiones, utilizada para la elaboración de micropartículas por varios autores [28]. Se mezclaron 5 ml de una solución 6%^{P/v} de PHBV en cloroformo con 0,8 ml de etanol absoluto mediante agitación; dicho volumen de etanol fue el mayor que admitió la solución sin que precipite el polímero. Se agregó la cantidad de surfactante especificada en la Tabla 3.15 y se sonicó la mezcla durante 15 minutos en baño ultrasónico para lograr la emulsión. Dicha emulsión se extendió en una batea plana de teflón con una distancia regulable entre la cuchilla y la superficie y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. Luego de la evaporación del solvente se obtuvo una

película flexible poco translúcida. Para eliminar el surfactante se sumergieron las películas en una solución acuosa 10%^{v/v} de etanol por 24 hs. Se las enjuagaron, renovando la solución 3 veces durante ese período. Para finalizar la elución, se realizó un lavado con agua destilada. Por último, se secaron las películas entre papel de filtro y en desecador a bajo vacío.

Tabla 3.15. Composición de las muestras con etanol.

	E0	E4	E6	E8
PHBV 6% ^{P/v} (ml)	5	5	5	5
% surfactante ^P / _P polímero	0	40	60	80
Etanol (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8

Dados los tamaños de poros obtenidos con las emulsiones conteniendo etanol, se buscó cambiar aumentar la polaridad de la fase dispersa se probaron membranas a partir de emulsiones conteniendo agua.

Formulaciones con agua

Utilizando la misma metodología descripta para las formulaciones con etanol, se elaboran 12 lotes de muestras con 0, 1 y 3%^{v/v} de H₂O destilada y en cada caso el contenido de surfactante se varió entre: 20, 40, 60 y 80% en peso respecto al contenido de la solución del polímero. Cabe destacar que no se logra una emulsión estabilizada sin presencia de surfactante. En este caso la formación de la emulsión se logró mediante agitación mecánica, seguida de sonicación en el baño ultrasónico.

3.4.3. Caracterización

Morfología

Mediante esta técnica se obtuvieron membranas de 60 a 500 μm de espesor y un área de 10 cm x 10 cm. La limitación en la sección está dada exclusivamente por el tamaño de la batea de teflón del dispositivo empleado.

Para evaluar los tamaños de poros obtenidos en las diferentes condiciones se analizaron las micrografías SEM o de microscopía óptica mediante el programa Image J®. La medición se realizó en 3 micrografías por muestra y 20 valores por micrografía.

La Fig. 3.25 muestra las micrografías SEM de membranas obtenidas por evaporación de emulsiones con etanol y diferentes contenidos de surfactante.

La muestra sin surfactante (Fig. 3.25 a) posee poros de aspecto irregular y una superficie de apariencia rugosa, mientras que en las emulsiones con surfactante se observan superficies más regulares formadas por micropartículas en una disposición de empaquetamiento compacto. Existe un aumento del tamaño de poros con el contenido de surfactante tal como se observa en la Tabla 3.16. El tamaño de poro alcanzado en la muestra con mayor contenido de surfactante es igual al de la muestra con etanol solo. Sin embargo, las micrografías SEM permiten observar morfologías diferentes entre dichas muestras.

Tabla 3.16. Tamaño de poros de la superficie superior de las membranas de evaporación de emulsiones con etanol.

Muestra	% P surfact/ P PHBV	Tamaño de poro (μm)
E0	0	7 ± 2
E4	40	3 ± 1
E6	60	4 ± 1
E8	80	7 ± 2

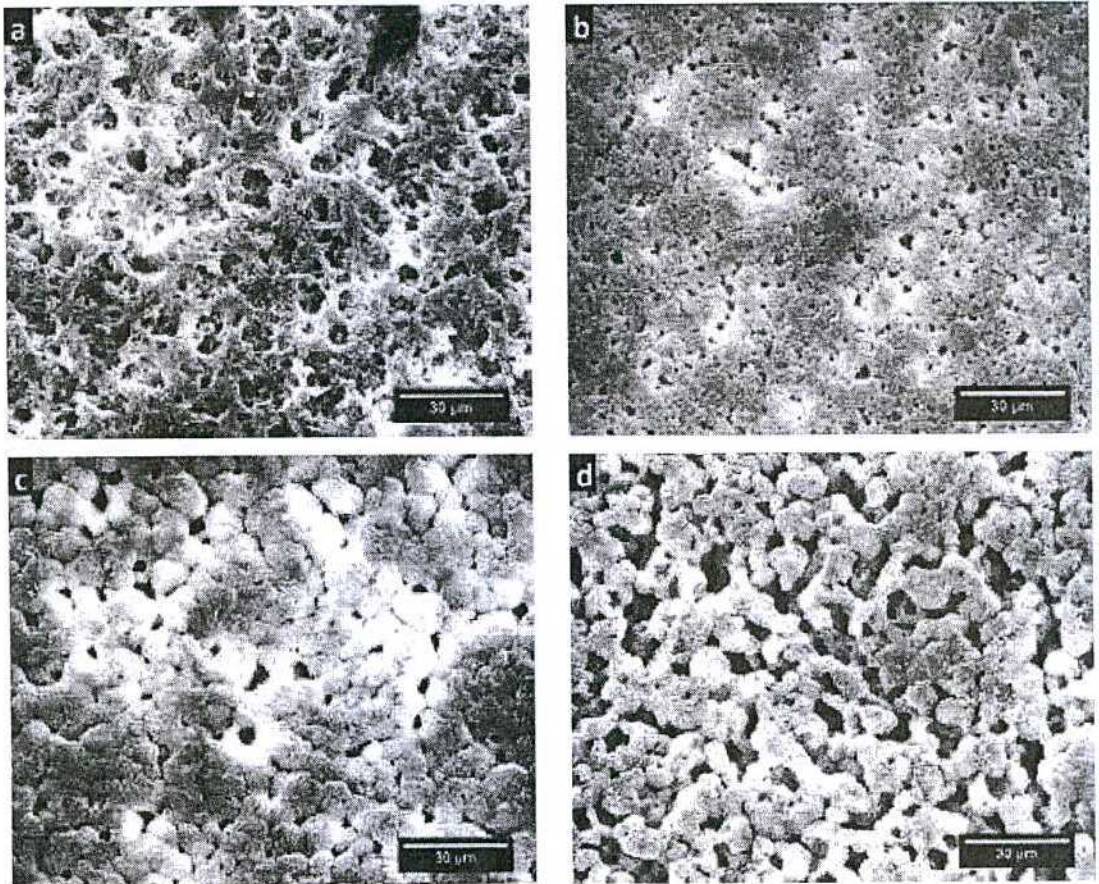


Fig. 3.25. Morfología de los sustratos obtenidos por evaporación de emulsiones: a) 0, b) 40, c) 60 y d) 80 % peso de surfactante /peso de PHBV.

Al analizar la superficie inferior de estas membranas, o sea, la superficie de la membrana en contacto con la placa de teflón del dispositivo extensor, se observó una morfología diferente a la superficie superior, como se exhibe en la Fig. 3.26. Si bien estas superficies están formadas por micropartículas en un empaquetamiento compacto al igual que en el caso de las superficies superiores, las micropartículas se distribuyen de manera tal que forman poros de mayor tamaño que la superficie superior, para las muestras con 40 y 80 % en peso de surfactante. Los valores de tamaño de poros se presentan en la Tabla 3.17. En el caso de las muestras sin surfactante o con 60% de surfactante no se aprecia diferencia de tamaño de poro con respecto a la superficie superior. Otra característica destacable de la membrana obtenida por la emulsión con 80% de surfactante es la presencia de microporos de 1 a 4 μm en el interior de los poros informados en la Tabla 3.17.

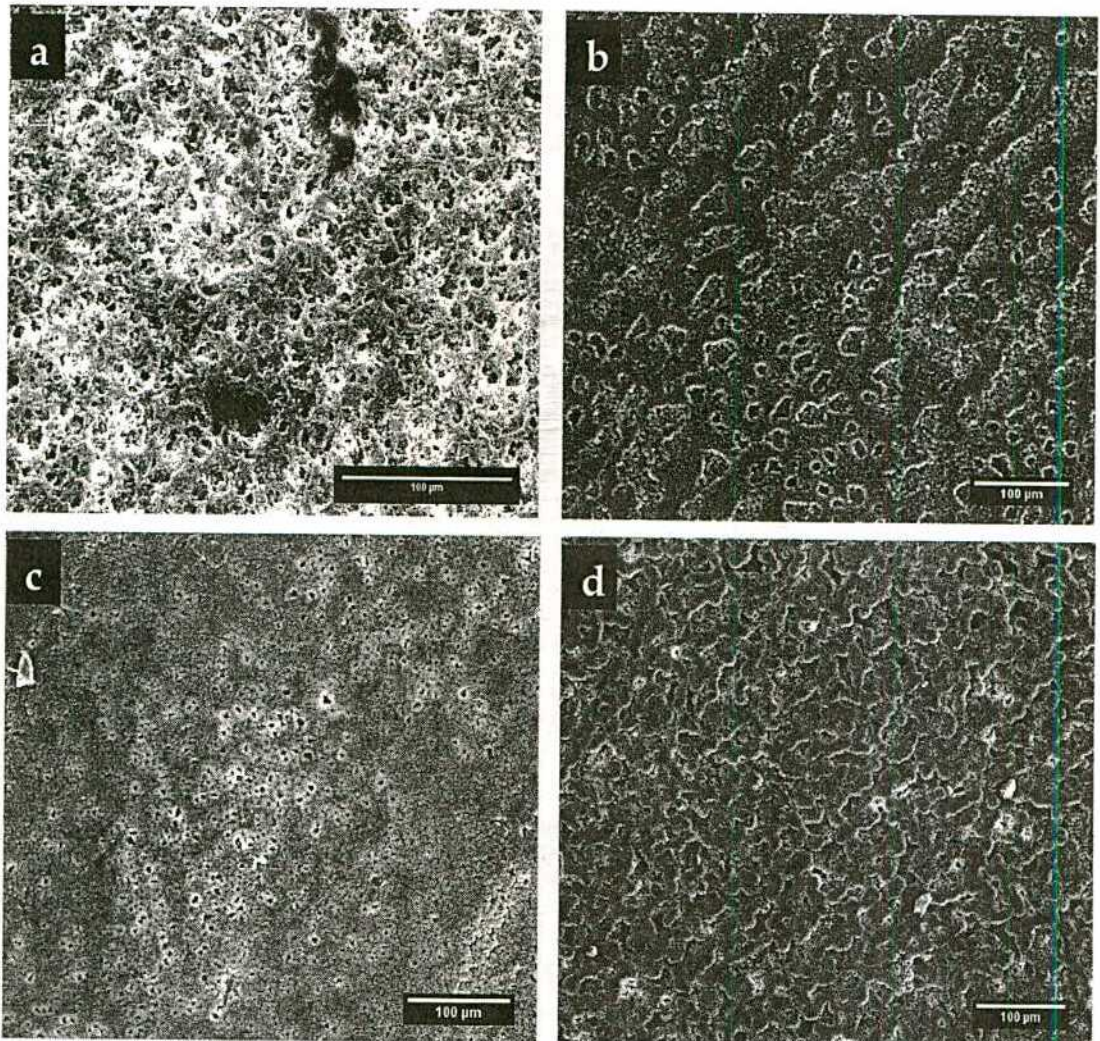


Fig. 3.26 Morfología de la superficie inferior de las membranas obtenidas por evaporación de emulsiones: a) 0, b) 40, c) 60 y d) 80 % peso de surfactante / peso de PHBV.

Tabla 3.17. Tamaño de poros de la superficie inferior de las membranas de evaporación de emulsiones con etanol.

Muestra	% P surfact/P PHBV	Tamaño de poro (μm)
E0	0	8 ± 3
E4	40	18 ± 4
E6	60	6 ± 1
E8	80	16 ± 5

Las membranas obtenidas de emulsiones con agua en su formulación se analizaron por microscopía óptica. Las micrografías ópticas se obtuvieron con un microscopio óptico binocular Mikoba® provisto de una cámara digital de 9 megapixels y se analizaron con el software Image Pro®. A partir de las diferencias de contraste entre los poros y el resto de la matriz fue posible evaluar los tamaños de poros y el porcentaje de la superficie porosa de los sustratos. La Fig. 3.27 ejemplifica la medición de los poros por medio de la característica de máscara del programa mencionado. Estas determinaciones no pudieron aplicarse a las micrografías de microscopía electrónica de barrido ya que las diferencias de contraste no fueron tan marcadas.

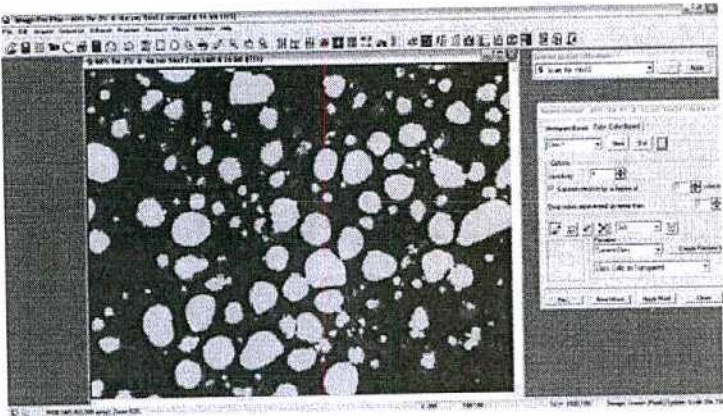


Fig. 3.27. Ejemplo de uso del programa ImagePro para la medición de los parámetros del sustrato.

La Fig. 3.28 muestran las micrografías de las membranas obtenidas con 60% de surfactante y ambos contenidos de agua. Los tamaños de poros de las muestras con diferente contenido de surfactante—medidos por el programa de análisis de imagen—se representan en la Fig. 3.29 y en la Tabla 3.18. Se observa una mayor dispersión en las membranas con mayor contenido de agua. En emulsiones con un mismo contenido de agua, la concentración de surfactante no es determinante del tamaño de poros para concentraciones de 20, 40 y 60% de surfactante. En cambio, para un mismo contenido de agua las emulsiones con un 80% de contenido de surfactante producen membranas

con menor tamaño de poros. Este resultado es evidente si se considera que, para un mismo contenido de agua, esto es, para un mismo volumen total de poros, la reducción del tamaño de los poros significa una mayor interfase y esto puede atribuirse al mayor contenido de surfactante.

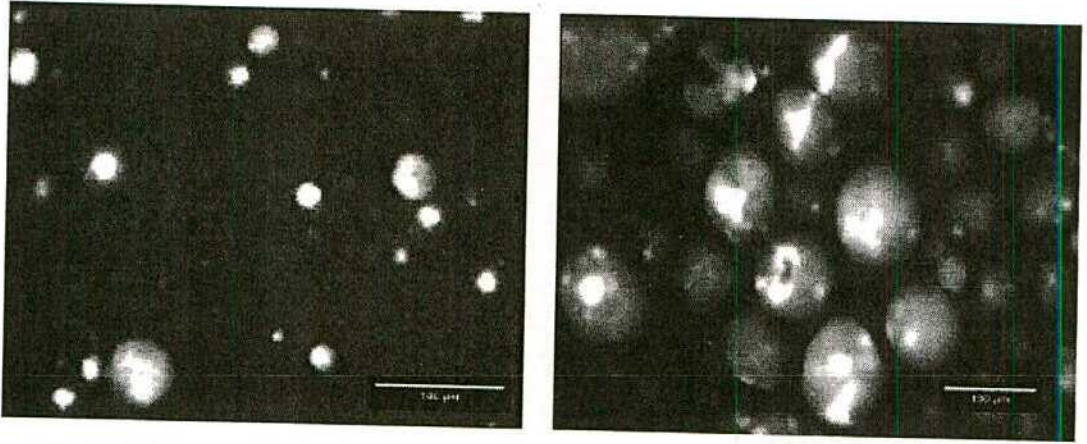


Fig. 3.28. Micrografías ópticas de películas por evaporación de emulsiones con 60 % de surfactante: (a) 1% v/v y (b) 3% v/v de agua. Se puede apreciar la diferencia de tamaños de poros y la superficie porosa total.

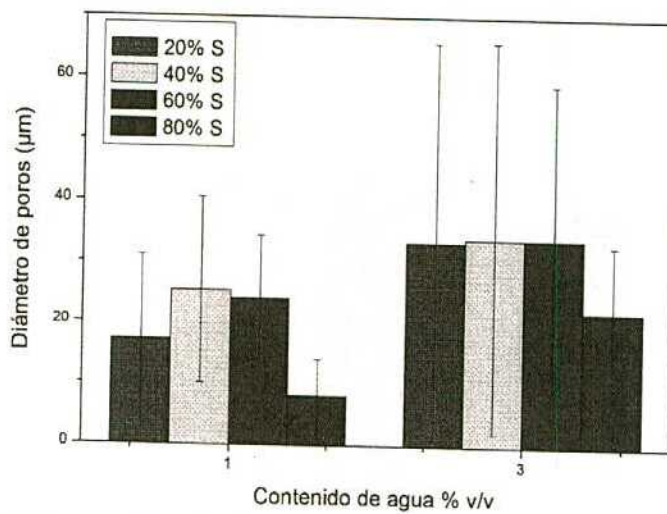


Fig. 3.29. Dependencia del diámetro de poros de las membranas en función del contenido de surfactante y agua.

Tabla 3.18. Diámetro de poros medidos de las micrografías

Surfactante (% P/P)	Cont. Agua (% V/V)	Diámetro de poros (μm)
20	0	<5
	1	17±14
	3	33±32
40	0	<5
	1	25±15
	3	34±32
60	0	<5
	1	24±10
	3	34±25
80	0	<5
	1	8±6
	3	22±11

Se determinó también la proporción superficial de poros con respecto a la superficie total o % de área porosa, ya que la observación de las micrografías mostró que no es completa la caracterización tan solo por el tamaño de poros. En la Tabla 3.19 se consignan los valores de porcentaje de área porosa.

Tabla 3.19. Porcentaje de área porosa.

Surfactante (% P/P)	Cont. Agua (% V/V)	% área porosa
20	0	0
	1	4
	3	23
40	0	0
	1	4
	3	11
60	0	0
	1	4
	3	23
80	0	0
	1	4
	3	21

Un análisis en detalle de las membranas permite observar que ambas caras no tienen la misma morfología. La Fig. 3.30 muestra una comparación de la superficie superior e inferior de la membrana obtenida con un 80% de surfactante y 3% de agua. La cara superior muestra los poros de mayor tamaño, cuyos valores medio se resumieron en la Tabla 3.18 mientras que los poros de la cara inferior son de menor

tamaño, independientes del contenido de surfactante o agua, como se indica en la Tabla 3.20.

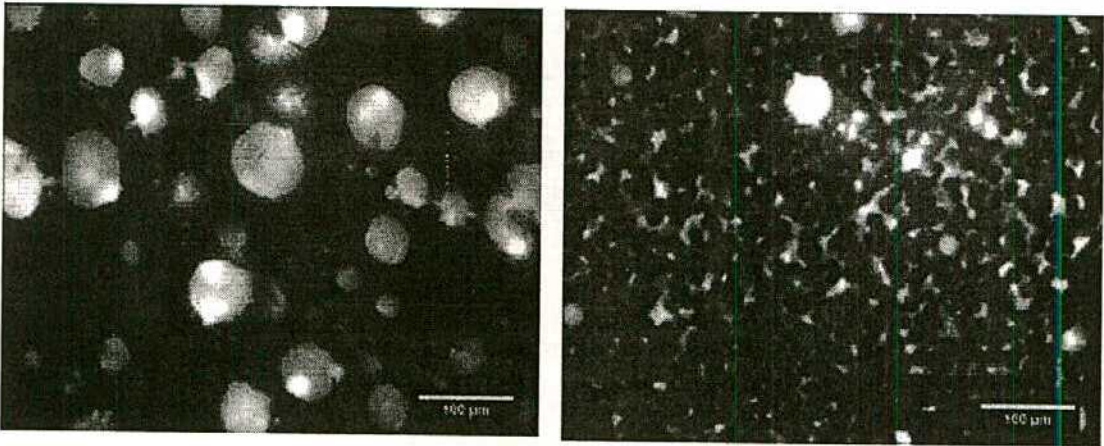


Fig. 3.30. Micrografía óptica de la membrana porosa obtenida con 80% de surfactante y 3 % de agua, (a) superficie superior (b) superficie inferior (en contacto con la base de teflón).

Tabla 3.20. Tamaño de poros de la superficie inferior de las membranas obtenidas de emulsiones con agua en su formulación.

Surfactante (% P/P)	Cont. Agua (% V/V)	Diámetro de poros (µm)
20	1	7±7
	3	9±9
40	1	9±7
	3	7±6
60	1	6±4
	3	7±6
80	1	9±7
	3	10±7

La Fig. 3.31 corresponde a micrografías ópticas de una muestra obtenida con un contenido de surfactante del 20% y 3% de agua destilada. En la imagen de la derecha se enfocó el microscopio en la superficie superior de la membrana. Mientras que en la micrografía de la izquierda se pudo enfocar el interior de los poros. De esta manera se puede comprobar que la estructura porosa se encuentra interconectada.

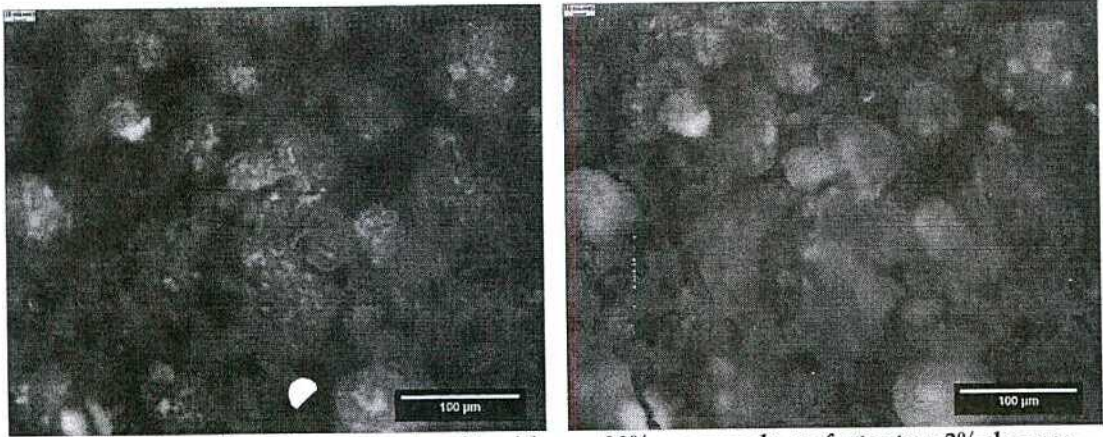


Fig. 3.31. Detalle de la membrana obtenida con 20% en peso de surfactante y 3% de agua.
Der. superficie de la membrana en foco. Izq. poros internos en foco.

Ángulo de contacto

En la medición del ángulo de contacto, la gota de agua se absorbió en sólo algunos segundos, es decir, en todos los casos las membranas fueron completamente hidrofílicas.

Propiedades mecánicas

Las muestras fabricadas a partir de emulsiones se sometieron a ensayos de tracción de acuerdo a la norma ASTM D1708 -Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics By Use of Microtensile Specimens-. Se utilizó una máquina de ensayos universales Instron 5500R con su correspondiente sistema de adquisición. Los ensayos se realizaron a una velocidad de cabezal de 0,2 mm/min y cada muestra se ensayó por triplicado.

La Fig. 3.32 corresponde a curvas tensión-deformación características para cada tipo de muestra. Se puede observar un aumento relativo de la deformación a rotura, así como también la disminución del módulo tensil con el aumento del contenido de surfactante en las muestras obtenidas a partir de emulsiones con etanol. La Tabla 3.21, que resume los valores más significativos de estos ensayos, permite una comparación cuantitativa de la respuesta mecánica de las membranas en función de la cantidad de surfactante. Se destaca el efecto plastificante del surfactante que por un lado reduce el módulo y la resistencia a la tracción y que, a la vez, incrementa la ductilidad de los sustratos.

La Fig. 3.32 presenta también la variación del comportamiento mecánico con el aumento del contenido de agua, en las muestras E4-1 y E4-3, elaboradas con un contenido de surfactante de 40%^{p/p} PHBV y 1% y 3%^{v/v} de agua, respectivamente.

Cabe destacar que las muestras con un contenido de surfactante del 20% presentaron fracturas extensas por lo que no pudo aplicarse el ensayo descrito para la determinación de sus propiedades mecánicas. La Fig. 3.33 ilustra en detalle las fracturas observadas en estas muestras.

La Tabla 3.22 permite una comparación cuantitativa de la respuesta mecánica de las membranas elaboradas con 1% y 3%^{v/v} de agua. Se observa la disminución del módulo tensil y el aumento de la deformación a rotura al incrementar el contenido de agua.

Tabla 3.21. Propiedades mecánicas de las membranas elaboradas a partir de emulsiones con etanol.

Muestra	% P surfac/ P PHBV	Módulo tensil (MPa)	Tensión de rotura (MPa)	Deformación de rotura
E0	0	460±14	6,4±0,6	0,016
E4	40	240±26	4,0±0,7	0,026
E6	60	146±48	2,3±0,1	0,025
E8	80	105±32	1,7±0,4	0,029

Tabla 3.22. Propiedades mecánicas de membranas elaboradas a partir de emulsiones con agua.

Muestra	% H ₂ O	Módulo tensil (MPa)	Tensión de rotura (MPa)	Deformación de rotura
E4-1	1	88±7	1,6±0,2	0,032
E4-3	3	54±3	1,3±0,5	0,039

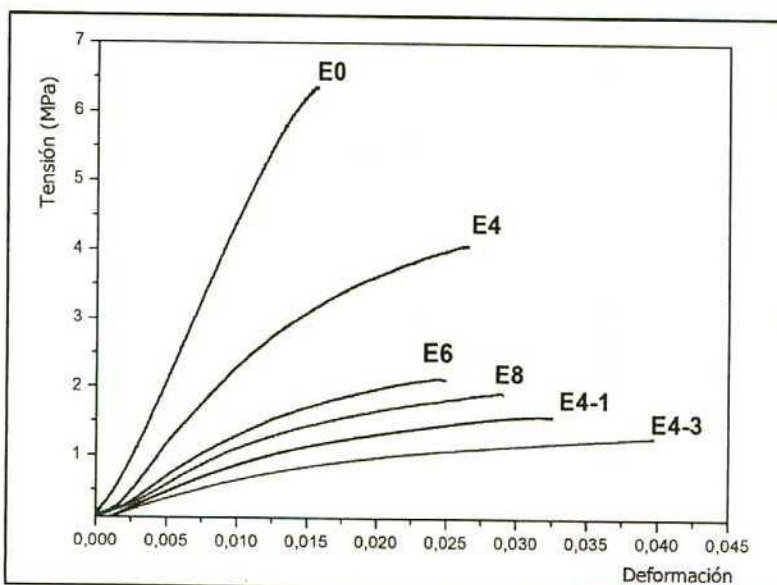


Fig. 3.32. Curva tensión-deformación de las membranas obtenidas por evaporación de emulsiones.

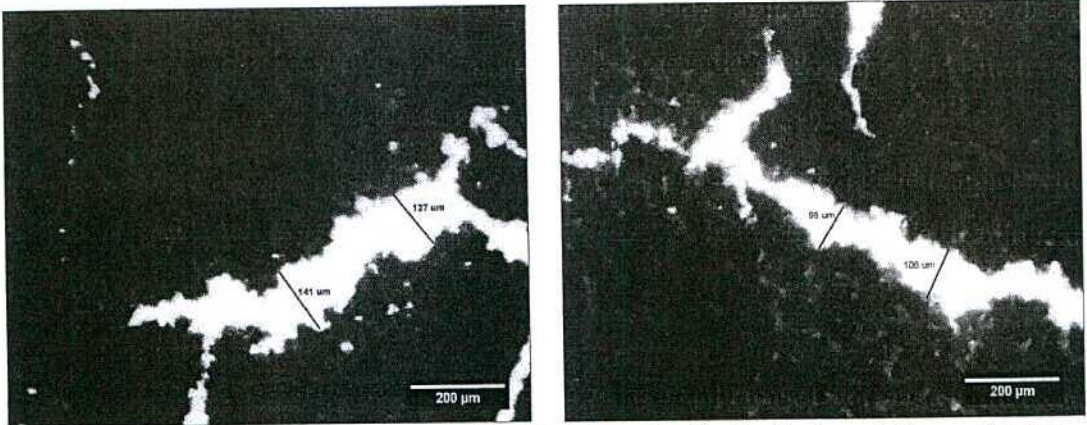


Fig. 3.33. Micrografías ópticas (magnificación 4x) que detallan las fracturas de las membranas obtenidas a partir de emulsiones con 20% de contenido de surfactante y 1% (izq.) y 3%v/v de contenido de agua.

3.5. Discusión

En este capítulo se presentó un método simple para la purificación del PHBV. La efectividad del método se vio reflejada en la desaparición de las señales de RMN ^1H que no son propias del polímero. El análisis físico-químico de la materia prima aporta información respecto a la identificación del PHBV y permite compararlos con datos publicados en la literatura.

A continuación se presentaron tres métodos de elaboración de membranas porosas: por lixiviado de sales, por separación de fases y por evaporación de emulsiones. Los procesos y las características de los sustratos que pueden obtenerse a partir de ellos presentan ventajas y desventajas propias, que serán analizadas a continuación, con el objetivo de elegir el o los procesos más adecuados para la producción de los sustratos para regeneración de piel.

El método de lixiviado de sales es el que presenta menor requerimiento desde el punto de vista de equipamiento. En efecto, se pueden obtener membranas de porosidad controlada mediante pasos simples de elaboración (molienda y tamización). Sin embargo, esta sucesión de pasos en cierto grado artesanal se torna una debilidad, en caso que se desee escalar el procedimiento para elaborar membranas. Efectivamente, cada paso posee más de una variable para controlar la morfología del sustrato, por lo que se debe abordar un sistema con múltiples variables para el control global de todas las etapas. La granulometría del agente porógeno fue aquella que

permitió obtener una superficie con la porosidad deseada. Otra de las desventajas de este método es que se requiere un proceso de hidrólisis de los sustratos para alcanzar la hidrofiliidad necesaria para la adecuada adhesión y proliferación celular. Vale destacar que sustratos altamente hidrofílicos pueden ser tan inconvenientes como los altamente hidrófobos [29], de modo que se requiere un balance hidrofílico/hidrófobo, dependiendo del tipo de aplicación [30,31].

Con el objeto de aumentar la hidrofiliidad de los sustratos se aplicaron dos métodos de hidrólisis, uno químico, mediado por una solución alcalina, y otro enzimático. Ambos tratamientos fueron efectivos, ya que permitieron controlar el carácter hidrófobo del sustrato de manera simple, en función de parámetros tales como tiempo de hidrólisis y concentración. Sin embargo, cuando se evalúa el escalado del método el manejo de soluciones alcalinas (fuertemente corrosivas) puede representar una desventaja frente a soluciones enzimáticas de pH 7,4.

Las membranas elaboradas por lixiviado de sales resultaron frágiles, cuando se intentó someterlas a ensayos de flexión. Esto es una limitación para su uso como sustrato para regeneración de piel en zonas que requieran alta flexibilidad, pero podrían emplearse en superficies con escasa movilidad. En síntesis, el método de lixiviado de sales combinado con una hidrólisis enzimática puede emplearse para producir sustratos para asistir a la regeneración de piel en superficies planas (espalda), zonas de huesos largos (antebrazo, brazo, etc.) u otros sectores donde la piel no se encuentre sometida a esfuerzos de flexión.

En segundo lugar, se presentó el método de separación de fases inducida térmicamente, que demostró ser versátil para obtener matrices porosas. El parámetro más importante para controlar el proceso es la velocidad de enfriamiento del sistema, que se correlaciona con el tamaño y la orientación de los poros. Las membranas producidas mediante esta técnica son las que presentaron menor resistencia a la flexión. Esta propiedad las hace poco adecuadas para una aplicación de ingeniería de tejido de piel; varios autores utilizan este tipo de sustratos para crecimiento de osteoblastos o condrocitos. [32-34]. En estos casos, la posibilidad de obtener sustratos con diferentes formas (cilindros, discos, paralelepípedos, etc.) según el recipiente utilizado, es una de las ventajas del proceso de fabricación.

El método de evaporación de emulsiones permitió la preparación de membranas flexibles y de porosidad controlada. Si se lo compara con el método de lixiviado de sales, es un método de menor complejidad. La etapa principal consiste en la formación

de la emulsión cuyos parámetros de control son la concentración de surfactante y el contenido de agua o etanol que determinan el tamaño de poros. La flexibilidad de estas membranas es una característica destacable que no limita el uso como sustrato en diferentes regiones del cuerpo. Las propiedades mecánicas medidas para estas membranas pueden controlarse a través del contenido de surfactante y sus valores resultan cercanos a los publicados para el módulo de Young y tensión de rotura de para la piel, 15-150 MPa y 5-30 MPa, respectivamente [35]. Ambas membranas con diferente contenido de agua mostraron módulos tensiles dentro de dicho intervalo, aunque con una resistencia a la tracción más baja que la de la piel.

En conclusión, los sustratos por evaporación de emulsiones tienen la ventaja de ser más flexibles y de no requerir un paso extra para mejorar su hidrofiliidad.

3.6. Referencias

1. Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y, Soga K. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules* 1986;19:2860-2864.
2. Wróbel-Kwiatkowska M, Zuk M, Szopa J, Dyminska L, Maczka M, Hanuza J. Poly-3-hydroxy butyric acid interaction with the transgenic flax fibers: FT-IR and Raman spectra of the composite extracted from a GM flax. *Spectrochimica Acta Part A* 2009; 73:286-294.
3. Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. *Polymer* 1993;35:1068-1077.
4. Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* 1993;14:323-330.
5. Barbantia SH, Carvalho Zavaglia CA, Aparecida de Rezende Duek E. Effect of Salt Leaching on PCL and PLGA(50/50) Resorbable Scaffolds. *Materials Research* 2008;11:75-80.
6. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet M. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 1999; 20:1177-1185.

7. Lee SB, Yong Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005;26:1961-1968.
8. Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials* 1998;19:1935-1943.
9. Liao C-J, Chen C-F, Chen J-H, Chiang S-F, Lin Y-J, Chang K-Y. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Material Research* 2002;59:676-681.
10. Zhang Q, Luo H, Zhang Y, Zhou Y, Ye Z, Tan W, Lang M. Fabrication of three-dimensional poly(ϵ -caprolactone) scaffolds with hierarchical pore structures for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 2013;33:2094-2103.
11. Murphy WL, Dennis RG, Kileny JL, Mooney DJ. Salt Fission: An Approach to Improve Pore Interconnectivity within Tissue Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* 2002;8:43-52.
12. Standard Practice for maintaining Constant Relative Humidity by means of Aqueous Solutions ASTM Standard E 104-8
13. Guebitz GM, Cavaco-Paulo A. Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalization of synthetic polymers. *Trends Biotechnology* 2008;26:32-38.
14. Wang Y-W, Wu Q, Chen G-Q. Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating. *Biomaterials* 2003;24:4621-4629.
15. Yu J, Plackett D, Chen L. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability* 2005;89:289-299
16. Kato K, Ikeda Y. Immobilization of DNA onto a polymer support and its potentiality as immunoadsorbent. *Biotechnology and Bioengineering* 1996;51:581-596.
17. Hu S-G, Jou C-H, Yang M-C. Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). *Carbohydrate Polymers* 2004;58:173-179.
18. Chen VJ, Ma PX. Polymer Phase Separation. In :Ma PX, Elisseeff J, editors. *Scaffolding in Tissue Engineering*. CRC Press, Taylor and Francis Group; 2006.
19. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529-2543.

20. Ferrer M C-H. Development and Characterisation of completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds, PhD Thesis, 2007.
21. Nam YS, Park TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Material Research* 1999;47:8-17.
22. Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, Hsien TY, Hou LT, Lai JY, Wang DM. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* 2004;25:129-138.
23. Zhijiang C, Guoxiang C, Mingming G, Zhiyuan T. Layered-lamination Preparing of Tissue Engineering Scaffolds via Emulsion Templates Method. *Journal of Polymer Research* 2004;11:225-230.
24. Zhijiang C, Guoxiang C. Novel method to produce poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds with controlled multi-pore size. *Journal of Materials Science Letters* 2003;22:153-155.
25. Nilkumhang S, Basit AW. The robustness and flexibility of an emulsion solvent evaporation method to prepare pH-responsive microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2009;377:135-141.
26. Pich A, Schiemenz N, Corten C, Adler H-J. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. *Polymer* 2006;47:1912-1920.
27. Lao HK, Renard E, Amani El Fagui A, Langlois V, Karine Vallée-Rehel, Linossier I. Functionalization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization: Comparison with the Conventional Free-Radical Grafting Procedure. *Journal of Applied Polymer Science* 2011;120:184-194.
28. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release* 2008;128:185-199.
29. Saltzman WM, Kyriakides TR. Chapter twenty: Cell Interactions with Polymers. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, Editors. *Principles of Tissue Engineering* (Third Edition). Burlington: Academic Press; 2007.
30. Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *Journal of Biomedical Material Research* 1994;28:783-789.

31. Hasson J, Wiebe D, Abbott W. Adult human vascular endothelial cell attachment and migration on novel bioabsorbible polymers. *Archives of Surgery* 1987;122:428-430.
32. Jack KS, Velayudhan S, Luckman P, Trau M, Grøndahl L, Cooper-White J. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle-polymer composite scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2009;5:2657-2667.
33. Wei GB, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:4749-4757.
34. Cao Y, Croll TI, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ. Systematic selection of solvents for the fabrication of 3D combined macro- and microporous polymeric scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition* 2006;17:369-402.
35. Ying TH, Ishii D, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Sudesh K, Samian R, Fujita M, Maeda M, Iwata T. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials* 2008;29:1307-1317.

4. Desempeño de los sustratos

Una vez lograda la morfología que emule a la matriz extracelular de la piel, es menester evaluar la interacción de los sustratos con las células dérmicas y epidérmicas, la posible biodegradación por acción enzimática y la respuesta *in vivo*. En este capítulo se presentarán dos experiencias *in vitro*: una para establecer la relación entre la cinética de biodegradación y la morfología de los sustratos, y otra para determinar la adhesión de queratinocitos. Finalmente se presentarán dos experiencias *in vivo* en ratas: por un lado, implantes subcutáneos de sustratos para evaluar su daño histológico y por otro lado, la evolución de heridas regeneradas con la asistencia de membranas producidas en este trabajo.

4.1. Biodegradación *in vitro*

Las principales enzimas responsables de la degradación de biopolímeros en el organismo humano son las enzimas no específicas del plasma. Estas incluyen las enzimas secretadas por los tejidos, por ejemplo amilasa, lipasa y fosfatasa [1]. Su concentración en el plasma es baja debido al continuo recambio de las células de tejidos que causan su liberación; por ello tienen una vida media corta dado que se renuevan rápidamente. Su concentración es dependiente del estado de salud, un alto nivel de enzimas puede ser indicativo de daño en tejidos o malfuncionamiento de determinados órganos. La Tabla 4.1 muestra valores de referencias de las principales enzimas no específicas del plasma presentes en el suero humano [1].

Tabla 4.1. Concentraciones de referencias y vida media de las principales enzimas no específicas del plasma en el suero humano.

Enzima	Concentración	Vida media (h)
α - Amilasa	46-244 U/l	9,3-17,7
Lipasa	30 -190 U/l	6,9-13,7
Fosfatasa alcalina (huesos)	11 mg/l	30-50

Cuando un biomaterial se implanta en el organismo es común observar inflamación que denota la absorción de proteínas de plasma, infiltración de neutrófilos y macrófagos, así como también la liberación de mediadores inflamatorios, radicales libres y enzimas proteolíticas. Existe una gran variedad de enzimas asociadas a esta

respuesta inflamatoria [2-4]. De este grupo, las enzimas especializadas en la hidrólisis de los poliésteres (como los PHAs) son las lipasas, un tipo de esterasas especializadas en la hidrólisis de triglicéridos en di o monoglicéridos y ácidos grasos. Existe evidencia de lipasas en macrófagos, neutrófilos y mioblastos en heridas lo cual sugiere un rol activo en la respuesta inflamatoria durante la cicatrización [5].

Existen múltiples ejemplos en la literatura de estudios de biodegradación *in vitro* de PHA en presencia de lipasas de diferentes orígenes, así como también en presencia de diferentes microorganismos. Mukai *et al.* [6] en un trabajo clásico realizó la hidrólisis de diferentes PHAs en presencia de 16 lipasas de diferentes orígenes. Encontraron una dependencia de la longitud de la cadena con la capacidad de las lipasas a hidrolizar estos polímeros; además encontraron lipasas especializadas en la hidrólisis de PHAs específicos.

Los estudios de biodegradación *in vitro* se deben llevar a cabo en un medio en el que el polímero se comporta de manera similar que en el fluido biológico al que estará expuesto. Se debe tener en cuenta la complejidad de los sistemas *in vivo* para llegar a condiciones similares en el diseño de un experimento *in vitro*. Por ejemplo, existen estudios de biodegradación *in vitro* en los que se usan PHA depolimerasas. Estas enzimas son las responsables de la biodegradación de los PHAs en condiciones ambientales, son enzimas extracelulares distribuidas en la tierra o compost. Sin embargo no existen evidencias de estas enzimas *in vivo* [7]. Por lo tanto para experimentos en un contexto biomédico las PHA depolimerasas no serían una elección adecuada.

En general, las velocidades de degradación de muchos polímeros es mayor *in vivo* que *in vitro*. Esto puede explicarse teniendo en cuenta la compleja dinámica que experimenta el material durante el período de implantación. Sin embargo, los estudios *in vitro* son una herramienta de gran utilidad que sirven como guía para la planificación de estudios *in vivo*.

A continuación se presenta un modelo de degradación *in vitro*, que se aplicó a las membranas porosas obtenidas por lixiviado de sales y por evaporación de emulsiones, técnicas descriptas en el Capítulo 3.

4.1.1. Procedimiento

Se utilizaron dos tipos de sustratos porosos: obtenidos por lixiviado de sales y por evaporación de emulsiones. Las primeras se obtuvieron mediante la técnica descrita en la sección 3.2.2 con fusión parcial de gránulos durante 18 hs. Las muestras de evaporado de emulsiones se elaboraron según la técnica descrita en la sección 3.4.2 con un contenido de surfactante del 40% en peso y un contenido de agua del 1% en volumen del solvente.

Se cortaron muestras se sección cuadrada de 1 cm de lado y espesor variable según la técnica de fabricación empleada. Las muestras de lixiviado de sales fueron de un espesor de $651 \pm 20 \mu\text{m}$, mientras que las muestras de evaporación de emulsiones fueron de $101 \pm 12 \mu\text{m}$. Se dispusieron en tubos de ensayo en solución buffer salina de fosfatos (PBS) cuya preparación se describe en el Apéndice 3 y en PBS con lipasa de *Candida rugosa* a una actividad enzimática de 190 U/l. Dicha actividad es similar a la concentración de referencia de lipasa en el suero humano [8]. Con el fin de mantener la concentración enzimática y la capacidad reguladora del buffer constante se renovaron las soluciones cada 48 h. La temperatura de 37°C se mantuvo constante por medio de un baño termostático.

A intervalos regulares de tiempo se extrajeron muestras que fueron enjuagadas con abundante agua destilada, secadas en desecador bajo vacío y pesadas para hacer el seguimiento de la pérdida de peso. Además, las muestras se analizaron mediante cromatografía de permeación en geles (GPC) en las condiciones detalladas en el Apéndice 3. Este análisis permitió determinar la evolución de masa molecular relativa en peso y en número, así como la variación de la polidispersión durante el proceso de degradación. También al finalizar la experiencia de biodegradación *in vitro* se evaluaron los cambios morfológicos observados por microscopía electrónica de barrido.

4.1.2. Resultados y discusión

La evolución del peso seco de las muestras se representa en la Fig. 4.1. A tiempos cortos la variación de peso seco fue más acentuada en las muestras de sustratos obtenidas por emulsión frente las obtenidas por lixiviado de sales, mientras que a mayores períodos de tiempo la mayor pérdida se observó en las muestras en contacto con soluciones PBS adicionadas con lipasa. Se observó un aumento de la pérdida de

masa en ambos tipos de muestras por efecto de la enzima adicionada al medio. Cabe destacar que las muestras se fragmentaron mucho a partir de los 60 días de biodegradación por lo cual se dificultó la determinación del peso seco a tiempos más largos.

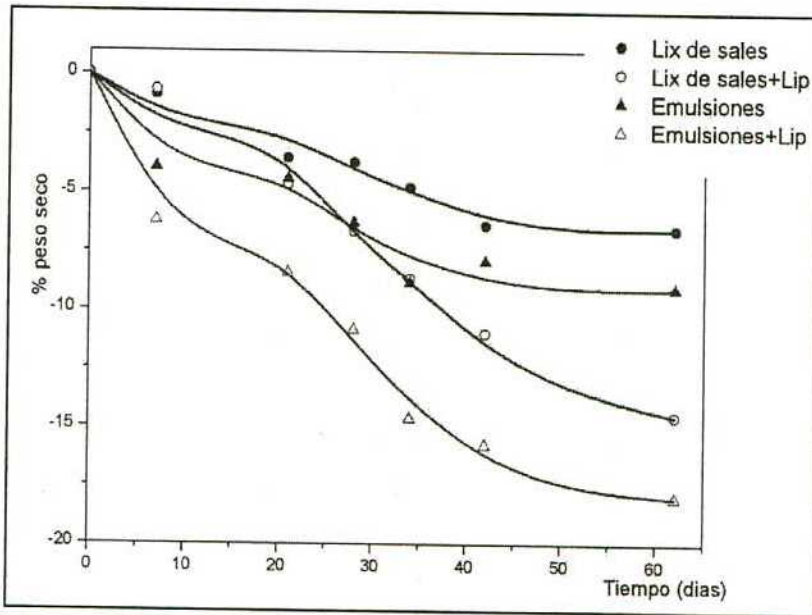


Fig. 4.1. Evolución del peso seco de las muestras de lixiviado de sales (SL) y emulsiones (EM): en ausencia y presencia de lipasa (Lip).

Las micrografías SEM de las muestras biodegradadas al cabo de 107 días en ambas condiciones revelan que las muestras sufrieron erosión superficial. La Fig. 4.2 exhibe la morfología de las muestras originales: (a) elaborada por lixiviado de sales y (b), por evaporación de emulsiones. Como se puede ver en la Fig. 4.3(a) la muestra de lixiviado de sales expuestas a PBS adicionado con lipasa resulta erosionada y se observa la formación de poros de mayor dimensión y profundidad que los originales (Fig. 4.2(a)). Las membranas obtenidas por evaporación de emulsiones, en cambio, adquirieron una morfología menos rugosa con aparición de poros superficiales, tal como se ilustra en la Fig. 4.3 (b), como consecuencia de su biodegradación en la solución buffer adicionada con lipasa.

Por otro lado, las muestras sometidas sólo a PBS también exhibieron erosión superficial (Fig.4.4) aunque menos pronunciadas que en el caso anterior. En el caso de la muestra de lixiviado de sales – Fig. 4.2(a) y 4.4(a) – se observó la aparición de poros, aunque de menor tamaño que los manifestados en la biodegradación con la solución enzimática. En cambio, la comparación de las Fig. 4.2 (b) y 4.4 (b) destaca que

si bien la muestra de evaporación de emulsiones biodegradada en PBS exhibe una superficie menos rugosa, no se aprecian cambios en el tamaño ni densidad de poros.

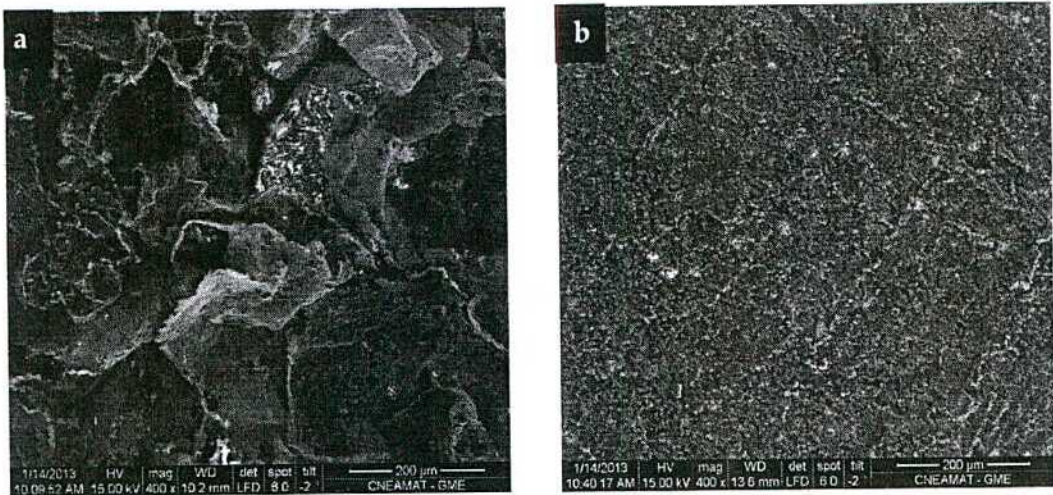


Fig. 4.2. Muestras originales de lixiviado de sales (a) y evaporación de emulsión (b).

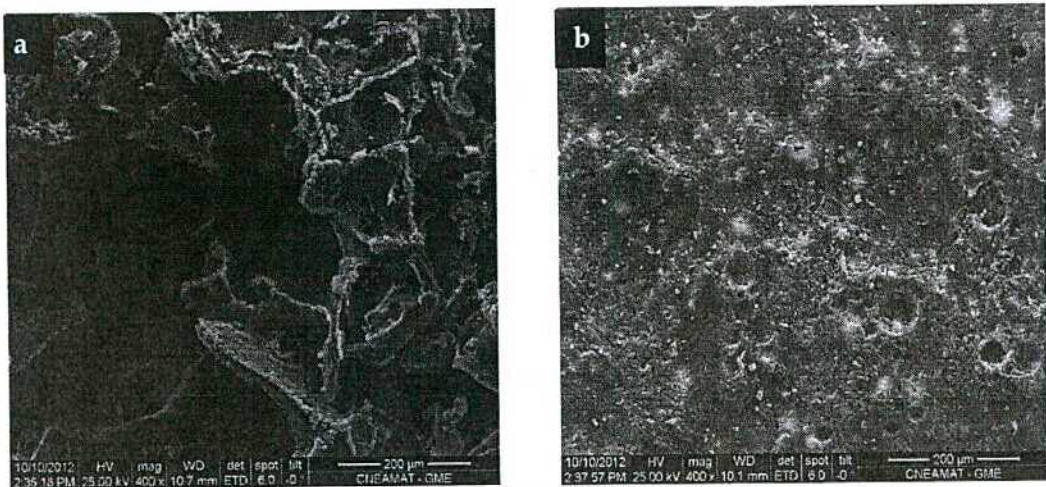


Fig. 4.3. Muestras por lixiviado de sales (a) y evaporación de emulsión (b) sometidas a biodegradación en solución salina buffer de fosfatos adicionado con lipasa por 107 días.

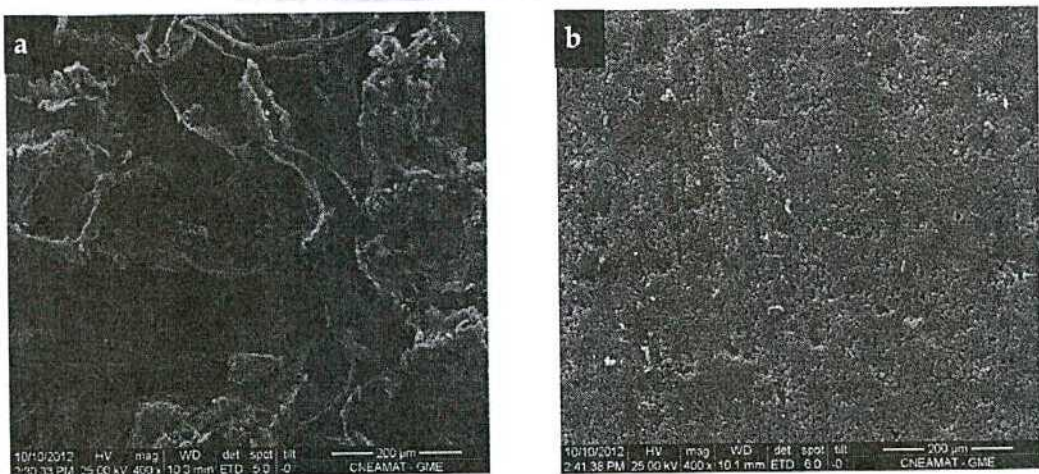


Fig. 4.4. Muestras de lixiviado de sales (a) y evaporación de solvente (b) sometidas a biodegradación en solución salina buffer de fosfatos por 107 días.

En cuanto a la variación del peso molecular promedio de las muestras, los datos completos de las determinaciones por GPC se encuentran en el Apéndice 3. En la Fig. 4.5 se observa la evolución del Mw determinado por GPC. Resulta evidente que las mayores variaciones de Mw corresponden a las muestras de evaporación de emulsiones. En el caso de estar expuesta a PBS adicionado con lipasa, al cabo de 107 días registra una pérdida total del 48,2% de su Mw inicial, mientras que en el caso de estar expuesta sólo a PBS la pérdida es del 20,1 % en el mismo período. Para las muestras de lixiviado de sales se observa una disminución ligeramente mayor del Mw para la condición de PBS adicionado con lipasa comparado con la muestra expuesta sólo a PBS; al cabo de los 107 días, la disminución del Mw es de 10% y 8,5%, para las condiciones PBS +lipasa y PBS solo, respectivamente.

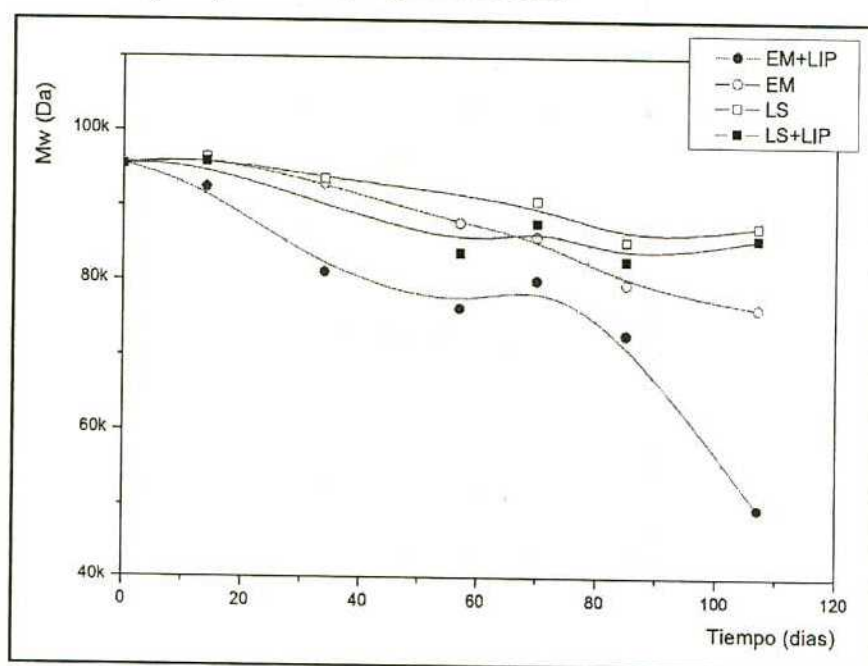


Fig. 4.5. Evolución de la masa molecular de los sustratos sometidos a biodegradación.

Por otro lado, la polidispersión (PD) de las muestras no se vio mayormente modificada a lo largo del tiempo de degradación. En efecto, el polímero original presenta una PD de 1,8 y su variación no mostró ninguna tendencia a lo largo de todo el experimento (ver Apéndice 3).

Dado que la cinética de la biodegradación de los sustratos mostró un comportamiento diferente para cada proceso de elaboración, se procedió a comparar las características morfológicas de los sustratos obtenidos por ambos métodos, por medio de la medición del tamaño de poro, el ángulo de contacto y el grado de cristalinidad. Los resultados se resumen en la Tabla 4.2. Para la determinación del

grado de cristalinidad se utilizó el método descrito en el Apéndice 3. Se observó una clara diferencia en la hidrofiliidad, siendo el sustrato obtenido por evaporación de emulsiones completamente hidrofílico. Una alta hidrofiliidad promueve la degradación del polímero ya que la difusión de moléculas de agua y de otras especies presentes en el medio de ensayo se realiza más rápidamente que en un sustrato con carácter hidrofóbico.

Tabla 4.2. Características de los sustratos utilizados en el ensayo de biodegradación *in vitro*.

	Evaporación de Emulsiones	Lixiviado de sales
Tamaño de poros	11±4 µm	139±36 µm
Angulo de contacto	0 °	105±7 °
Cristalinidad	14 %	24 %

La diferencia de cristalinidad también es un factor importante a considerar ya que la literatura consigna que la biodegradación del PHBV se manifiesta mayormente en las regiones amorfas [9]. Se puede apreciar el sustrato obtenido por evaporación de emulsiones posee menor cristalinidad, por ello su cinética de biodegradación es mayor que la del sustrato obtenido por lixiviado de sales. Además, las regiones amorfas son las más susceptibles a la degradación y, en consecuencia, al transcurrir el tiempo de biodegradación aumenta la cristalinidad, y por ende, la fragilización de las muestras, tal como se observó.

4.2. Adhesión de queratinocitos *in vitro*

El objetivo fue evaluar la adhesión de los queratinocitos sobre sustratos esterilizados. La adhesión celular se divide en diferentes estadios: (1) *adhesión temprana*: es el período en que las células se adhieren pero no proliferan; (2) *adhesión intermedia*: cuando existe proliferación sin el desarrollo de fibras y (3) *adhesión tardía*: caracterizada por proliferación celular con desarrollo de fibras [10]. La primera etapa, la adhesión temprana, es la etapa más importante ya que es el primer paso de anclaje al sustrato que determinará el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular. La Fig. 4.6 ilustra en forma esquemática la velocidad de adhesión y proliferación celular. El parámetro $\%I_{\max}$ determina el máximo número de células adheridas a la superficie expresada como porcentaje del número de células en suspensión utilizada para el ensayo. Notar que el $t_{1/2}$, que representa el tiempo para alcanzar el 50% de la $I_{\max}$ se

encuentra en un valor menor a 1 hora desde la siembra de las células. Dicho intervalo de tiempo es consistente con el método utilizado por Zorlutuna *et al.* en el que 45 min. son suficientes para la adhesión de células epiteliales en sustratos porosas. [11].

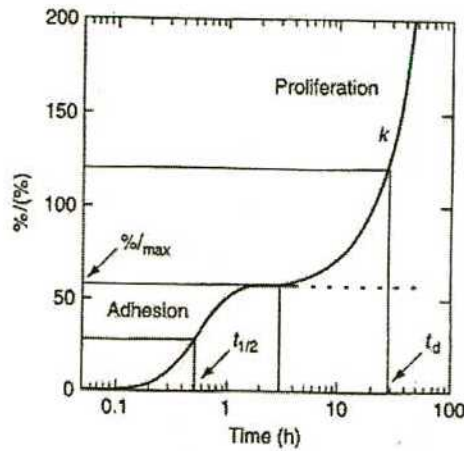


Fig. 4.6 Representación esquemática de la adhesión y proliferación celular, se grafica el porcentaje de células adheridas respecto a las células sembradas en función de tiempo $%I$.

Los sustratos porosos ensayados fueron los elaborados por: i) lixiviado de sales según la técnica descrita en la Sección 3.2.2., hidrolizados mediante hidrólisis alcalina (muestras H6) e hidrólisis enzimática (muestras E6) y ii) evaporación de emulsiones según la técnica descrita en la Sección 3.4.2 con tres tamaños de poros; estas muestras se rotularon: EM 1, EM 2 y EM 3. No se emplearon sustratos elaborados por separación de fases ya que resultaron extremadamente frágiles para su aplicación en regeneración de piel.

4.2.1. Materiales

Placas multipocillos de 24 pocillos. Pipetas, tubos, cápsulas de cultivo, medio y suero.

Solución stock de tripsina, 2,5% adquirida de Invitrogen®.

Solución stock de 0,5 M de EDTA, pH 7,0 diluido en H_2O .

Solución de Tripsina/EDTA: 0,06 %/1 mM en PBS estéril.

Solución de BSA, 10 mg/ml preparada de la siguiente manera: disolver BSA en PBS (preparar 10ml), filtrar (en filtro de $0.22 \mu m$) y guardar a $4^\circ C$ hasta usar.

Solución stock de fibronectina (FN), $10 \mu g/ml$ en PBS estéril. Paraformaldehído. Filtros estériles. Medio de montaje Vectashield®.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), colorante fluorescente para ADN.

Las células utilizadas fueron obtenidas a partir de una biopsia de piel. El aislamiento de los queratinocitos se realizó por medio de la técnica descrita por Rheinwald y Green [12].

Sustratos

El grado de hidrofiliidad de los sustratos se determinó por medio de la medición del ángulo de contacto, descrito en la Sección 3.2.4. En todos los casos las muestras absorbieron la gota de agua en segundos, es decir fueron completamente hidrofílicas.

La medición de tamaño de poros se realizó a partir de las micrografías electrónicas del barrido. Sus valores se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Tamaño de poros de las muestras para cultivo de queratinocitos *in vitro*.

	Tamaño de poros (μm)
H6	154 $\pm$ 33
E6	164 $\pm$ 52
EM 1	5 $\pm$ 1
EM 2	1,4 $\pm$ 0,4
EM 3	6 $\pm$ 3

Esterilización

Se cortaron discos de 10 mm de diámetro y se los colocaron en placas de Petri plásticas de 50 mm de diámetro que posteriormente se envasaron en bolsas dobles de PE selladas herméticamente. Las placas de Petri envasadas se esterilizaron con una dosis de radiación gamma de 25 kGy a una tasa de dosis de 10kGy/h, en la Planta de Irradiación Semi Industrial (P.I.S.I.) del Centro Atómico Ezeiza de la CNEA.

4.2.2. Procedimiento

Los ensayos con queratinocitos se realizaron en el Instituto de Investigación Biotecnológicas (UNSAM-CONICET) bajo la supervisión del Dr. Carlos Arregui y con la participación de la Dra. Ana González Wusener.

Pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) y los sustratos se evaluaron en tres condiciones: (a) sin tratamiento, (b) recubiertos con FN (control positivo) y (c) bloqueados con BSA (control negativo). El ensayo consistió en evaluar

la adhesión de los queratinocitos, a los sustratos al cabo de 40 minutos. Para cada sustrato se sembraron 20000 células/pocillo. Los detalles del protocolo de preparación de los cultivos y el posterior análisis celular pueden consultarse en el Apéndice 5. El recubrimiento de los sustratos con BSA tiene como objetivo neutralizar las interacciones de origen electrostático entre el polímero y las células, para que la adhesión de las mismas se deba sólo a la afinidad con la superficie porosa del sustrato.

4.2.3. Resultados y Discusión

La Fig. 4.7 compendia micrografías de los diferentes sustratos cultivados con los queratinocitos; se ha empleado un colorante lipofílico (Vybrant® DiO) que permite teñir selectivamente la membrana celular. El control positivo corresponde a un sustrato recubierto con fibronectina, condición para inducir la adhesión de los queratinocitos. Mientras que los sustratos sin recubrimiento son los utilizados para la cuantificación. De estas imágenes resulta que la mayor densidad celular corresponde al sustrato EM 3, que a su vez presenta menor densidad de células que el control positivo.

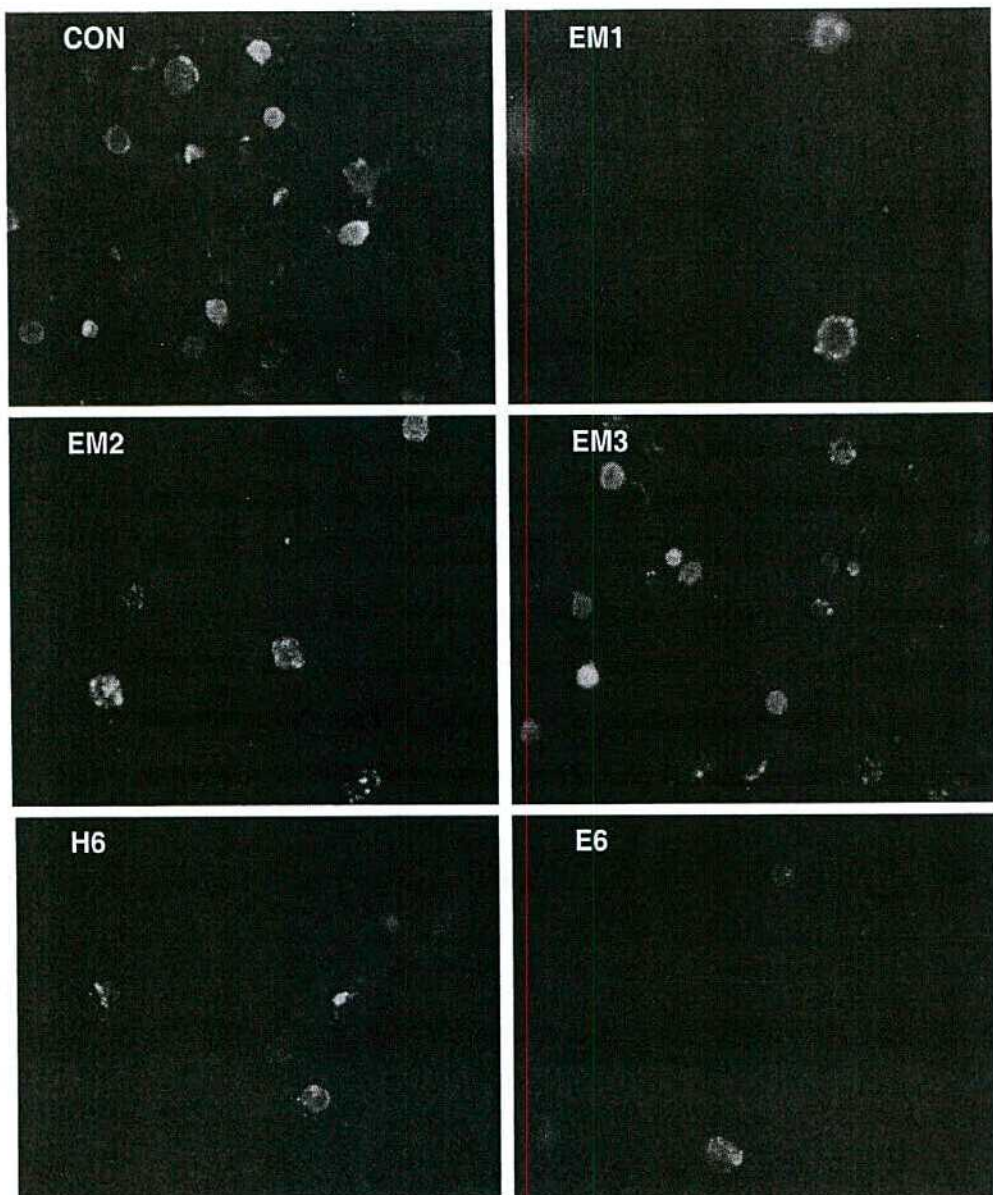


Fig. 4.7. Queratinocitos teñidos con DiO observados a 200x en microscopio óptico de fluorescencia.

La Fig. 4.8 resume los resultados de la cuantificación de los queratinocitos sobre los sustratos ensayados. Se observa que la mayor adhesión celular tuvo lugar en el sustrato EM 3, obtenido por evaporación de emulsiones. Le sigue en número de células el sustrato EM 2, que posee una cantidad similar al sustrato por lixiviado de sales E6. Mientras que los sustratos EM 1 y H6 fueron los que peor comportamiento tuvieron frente a la adhesión de los queratinocitos.

Las muestras de lixiviado de sales, E6 y H6, fueron ambas completamente hidrofílicas y su morfología, presentada en la Fig.4.9, muy similar, con tamaños de poros para E6 y H6 de $154\pm33\text{ }\mu\text{m}$ y $164\pm33\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente. Luego, la diferente respuesta en la adhesión de queratinocitos se puede atribuir al tipo de tratamiento de hidrólisis que recibieron. En efecto, la hidrólisis alcalina es menos selectiva (a diferencia de la hidrólisis enzimática) y reacciona dejando un sustrato con un carácter más ácido que la hidrólisis enzimática.

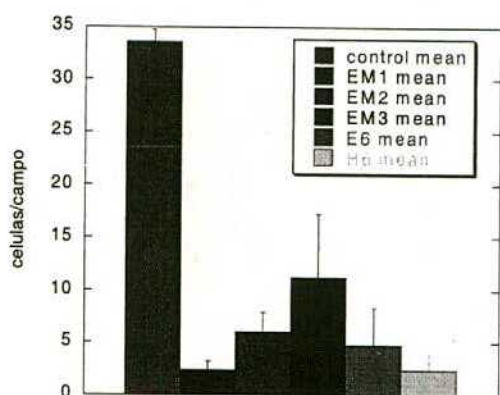


Fig. 4.8. Cuantificación de queratinocitos adheridos a los sustratos.

Por otro lado, la Fig. 4.10 compara micrografías SEM de las muestras de evaporación de emulsiones; se observa una tendencia de superficies con menor densidad de poros en el orden EM 1, EM 2 y EM 3, esto es, a medida aumenta el contenido de agua. Es decir, que no sólo el tamaño de los poros sino también la separación entre ellos son características morfológicas relevantes para la adhesión celular. Y estas características pueden controlarse a través de los parámetros del proceso de fabricación de sustratos por emulsiones.

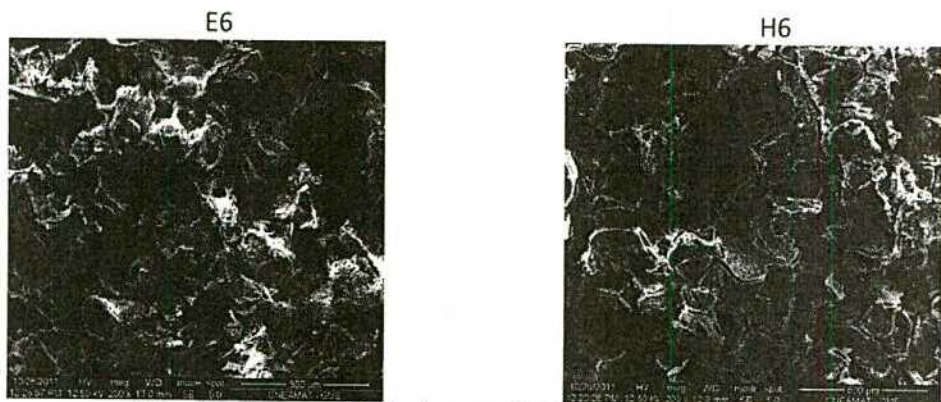


Fig. 4.9. Micrografía de la superficie de los sustratos E6 y H6.

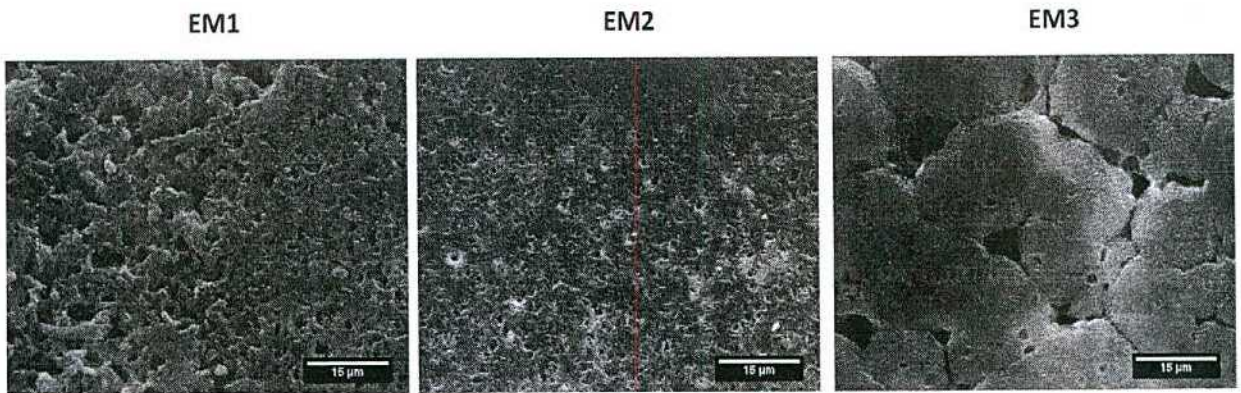


Fig. 4.10. Micrografías SEM de las muestras de evaporación de emulsiones utilizadas para el ensayo *in vitro*.

4.3. Evaluación de la respuesta histológica de los sustratos *in vivo*

El objetivo de este ensayo *in vivo* fue el de evaluar el daño histológico frente a sustratos implantados en los animales de laboratorio en las condiciones descriptas a continuación.

4.3.1. Elaboración de los sustratos

Con PHBV en las condiciones en que lo entregó el proveedor se elaboraron sustratos porosos por medio de la técnica de lixiviado de sales (SL), y sustratos no porosos por medio de la técnica de evaporado de solvente (SC). La técnica de evaporado de solvente consistió simplemente en dejar evaporar una solución de PHBV 5%^P/_V en una placa de Petri de vidrio. Se obtuvo luego de la evaporación una película no porosa, que en este experimento sirvió de control negativo.

Las muestras se someten a hidrólisis alcalina para mejorar su carácter hidrofílico. Se las dispone en placas de Petri plásticas y se las colocan en bolsas de PE doblemente selladas, que se esterilizan mediante radiación gamma a una dosis de 25kGy y una tasa de 10kGy/h.

4.3.2. Procedimiento

Los ensayos se realizaron en el Bioterio de la CNEA bajo la supervisión de la Dra. Erica Kreimann y el Dr. Guillermo Juvenal. El informe histológico estuvo a cargo de la Dra. Gladys Hermida.

Se utilizaron 5 ratas Wistar de 250 gr. cada una aproximadamente, alimentadas en condiciones estándar y con agua ad libitum. Luego de anestesiarlas con una inyección intramuscular de ketamina/xilazina (36,5/5,4 mg/kg del animal), se realizaron dos incisiones en la piel de la espalda de 1 cm de longitud entre los hombros de forma paralela a la columna vertebral (una incisión para el sustrato SL y otra para el SC). En cada una estas incisiones se implantaron subcutáneamente muestras cuadradas de 5 mm de lado de cada uno de los sustratos. Se les insertó a las muestras un alambre de platino de unos milímetros de longitud y 0,5 mm de diámetro con el fin de que los sustratos puedan ser ubicados por radiografía luego del sacrificio del animal. Después del implante las ratas estuvieron medicadas con amoxicilina (Clamoxyl LA®) 0,05 ml/rata cada 48 hs durante 5 días. Se sacrificaron ratas luego de 1 y 4 semanas del implante y se procedió con el análisis histológico de las heridas.

Se fijaron las muestras en 10% formalina y se deshidrataron por medio de soluciones de concentraciones ascendentes de etanol (de 50% a 96%). Se las clarificó con xileno y se las embebió en parafina. Se realizaron cortes transversales de 6 a 7 μ m de espesor, los que se montaron en portaobjetos para observación en microscopio óptico. Las tinciones se realizaron mediante hematoxilina y eosina (H&E) para la exanimación citológica e histológica.

4.3.3. Resultados y discusión

Luego de una semana de implantación el análisis histológico mostró una densa cápsula de tejido conectivo alrededor del sustrato no poroso (Fig. 4.11). Se puede apreciar en la figura una respuesta inflamatoria crónica con un elevado número de leucocitos granulados (g), linfocitos (l) y macrófagos (m). Estas células tienen la capacidad de producir especies químicas oxigenadas altamente reactivas como su peróxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido hipocloroso (Hilo) [2]. Además se observa una gran cantidad de capilares (c) cargados de eritrocitos, lo cual indica congestión.

La respuesta inflamatoria es más exacerbada y activa en el caso del sustrato SL en donde se observa un encapsulado por una cubierta densa de tejido conectivo y también se observa la presencia de células gigantes de reacción a cuerpos extraños, tal como se ilustra en la Fig. 4.12.

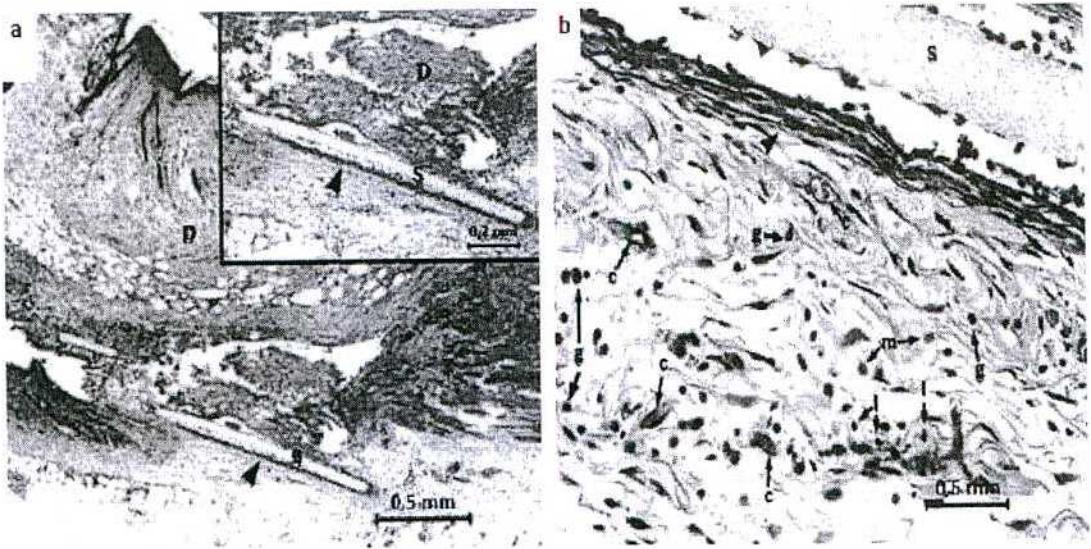


Fig. 4.11. Corte histológico del sustrato SC luego de 1 semana de implantación por debajo de la dermis (D). a) Se observa el sustrato rodeado de una densa cápsula de tejido conectivo (►). b) Detalle del tejido conectivo debajo de la cápsula.

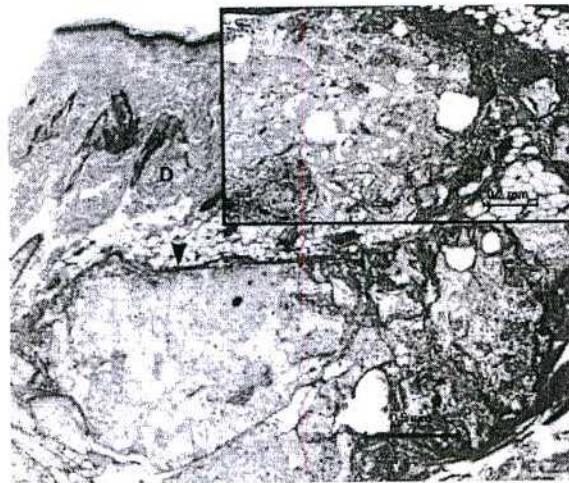


Fig. 4.12. Sustrato SL luego de 1 semana de implantación. Se observa el encapsulado por tejido conectivo denso (►) al igual que células gigantes debidas al material extraño.

Los cortes histológicos de los sustratos al cabo de 4 semanas de implantación se observan en la Fig. 4.13. La cápsula de tejido conectivo alrededor del sustrato SC no se modificó. En cambio, en el caso del sustrato SL sólo se observan algunos fragmentos del material implantado. Además se observó la formación de tejido adiposo y de fibras musculares. La inflamación observada luego de la semana de implantación desapareció al igual que las células gigantes por la presencia de un cuerpo extraño.

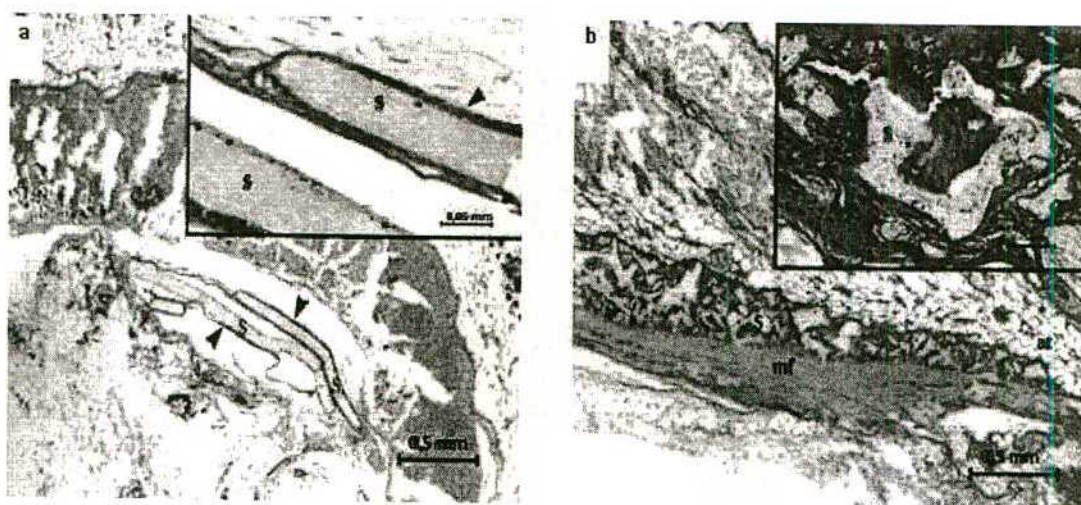


Fig. 4.13. Cortes histológicos luego de 4 semanas de implantación. a) La densa cápsula de tejido conectivo sigue sin modificación alrededor del sustrato no poroso (S). b) Se observan sólo algunos fragmentos del sustrato SL rodeados de tejido adiposo (blanco, at) y fibras musculares (mi).

4.4. Regeneración de piel *in vivo*

El objetivo fue evaluar la capacidad de regeneración de piel de los sustratos. Se comparó el proceso de cicatrización de dos heridas generadas en la dermis de ratas: una de ellas fue cubierta por una gasa vaselinada y la otra por un sustrato. El sustrato elegido para este ensayo fue aquel que mejor respuesta tuvo en los cultivos de queratinocitos *in vitro* (Sección 4.2), esto es, el sustrato obtenido a partir de evaporación de emulsiones EM 3.

4.4.1. Protocolo

El protocolo seguido fue elaborado *ad hoc*; los ensayos se realizaron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Los investigadores responsables de este experimento fueron la Dra. Gladys Hermida y el Dr. Alberto Bolgiani.

Esterilización de los sustratos

Los sustratos se cortaron en discos de 5 mm de diámetro. Se dispusieron en placas de Petri plásticas y se colocaron en bolsas de PE para su esterilización mediante radiación gamma de 25 kGy. La Fig. 4.14 muestra la presentación de los sustratos para el procedimiento de implante.

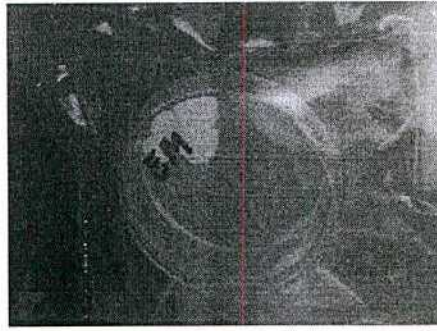


Fig. 4.14. Presentación de los sustratos para los ensayos de regeneración de piel.

Procedimiento

Se utilizaron 10 ratas Wistar, 5 machos y 5 hembras, de entre 200 y 300 gramos. Los animales recibieron una dieta *ab libitum*. En cada rata se rasuró y desinfectó la zona dorsal de cada rata a fin de practicar, con un sacabocados de 6 mm, dos lesiones similares separadas 1 cm entre sí. Se colocó un sustrato sobre la primera lesión y sobre la segunda una gasa vaselinada como control. El experimento tuvo una duración de 12 días. Se evaluó la movilidad y respuesta a estímulos del animal, así como la lesión al segundo, cuarto y séptimo día y luego diariamente hasta la cicatrización de las 2 lesiones, documentando estado del animal y el tiempo de cicatrización de cada lesión en días. La Fig. 4.15 ilustra las etapas del procedimiento de implante.

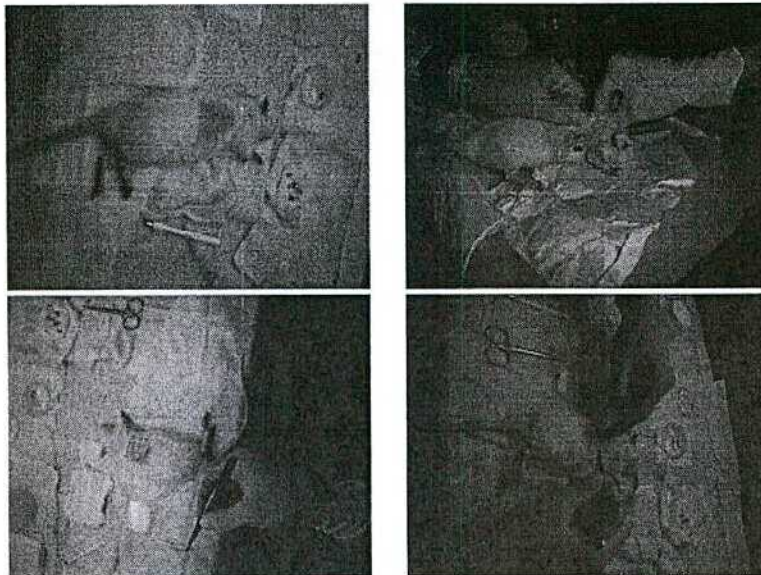


Fig. 4.15. Etapas principales del procedimiento de implante de los sustratos.

Histología

Se realizó un estudio histológico de las heridas mediante la técnica descrita en la Sección 4.3.2

4.4.2. Resultados y Discusión

La evolución de las heridas se evaluó después de 4, 7 y 10 días de la operación. En todos los casos el estado de los animales fue muy bueno, no advirtiéndose cambios en la movilidad, ni en la respuesta a estímulos ni en los hábitos alimentarios.

La Fig. 4.16 ilustra la evolución de las heridas en una rata macho; la herida superior ha sido cubierta con el sustrato mientras que la inferior sólo se cubrió con una gasa vaselinada que se retiró para tomar la imagen y luego se repuso una limpia para continuar el experimento. Las imágenes denotan la buena movilidad que exhibía el ejemplar, al que debía sostenerse firmemente para tomar las fotografías.

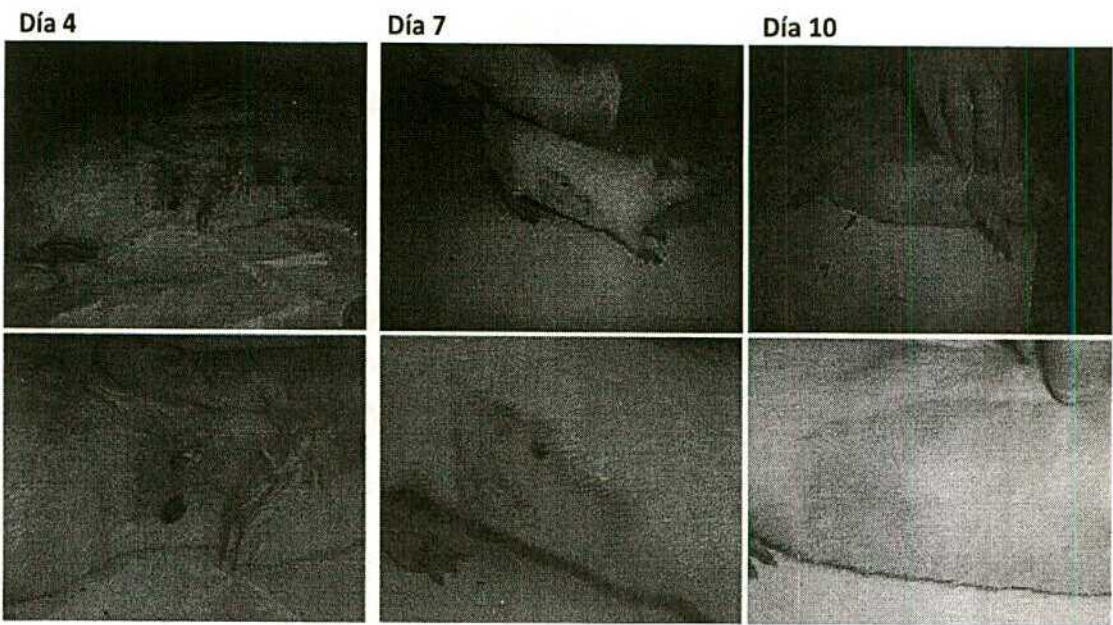


Fig. 4.16. Evolución de las heridas en una rata macho. Las fotografías superiores muestran el aspecto general de los animales y las inferiores el detalle de la evolución de las heridas.

Cuantificación de los tiempos de cicatrización

Nomenclatura	
x	herida abierta
xx	herida con formación de epitelio
xxx	herida cerrada
-	sin cambios

Rata 1	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	x	x
Día 7	xx	x
Día 10	xxx	xx

Rata 2	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xxx	xx
Día 10	-	xxx

Rata 3	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xxx	x
Día 10	-	xxx

Rata 4	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	x	x
Día 7	xx	x
Día 10	xxx	xxx

Rata 5	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xx	xx
Día 10	xxx	xxx

Rata 6	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	x	x
Día 7	xx	xx
Día 10	xxx	xxx

Rata 7	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xxx	xx
Día 10	-	xxx

Rata 8	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xx	xx
Día 10	xxx	xxx

Rata 9	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	xx	x
Día 7	xx	xx
Día 10	xxx	xxx

Rata 10	Herida con membrana	Herida sin membrana
Día 4	x	x
Día 7	xx	x
Día 10	xxx	xxx

El análisis de cuantificación de los tiempos de cicatrización permitió extraer una serie de observaciones que comprueban la funcionalidad del sustrato en la regeneración de la piel:

- 6 de las 10 ratas implantadas con el sustrato mostraron la formación de epitelio a los 4 días de cicatrización, mientras que ninguna de las ratas del grupo control mostró dicho comportamiento.
- 7 de las 10 ratas implantadas con el sustrato presentaron formación de epitelio a los 7 días, en el grupo control fueron 6 las ratas con formación de epitelio.
- 3 ratas implantadas con el sustrato cicatrizaron por completo a los 7 días de la implantación.

Finalmente, las 7 ratas restantes implantadas con el sustrato y las 10 ratas del grupo control cicatrizaron por completo a los 10 días.

Histología

En las comparaciones realizadas al momento de las biopsias entre las zonas tratadas con membranas y el control sin las membranas, no aparecen diferencias en el proceso de cicatrización. La histología destaca la similitud en la aparición de folículos pilosos en cantidad y calidad, como así también el grosor del epitelio. La Fig. 4.17 muestra las micrografías correspondientes a los cortes histológicos.

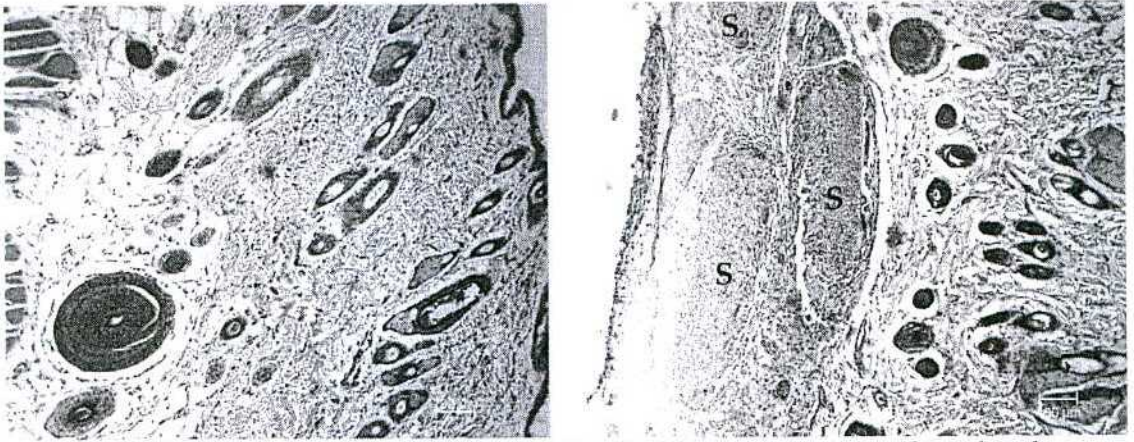


Fig. 4.17. Secciones de la herida teñidas con hematoxilina-eosina luego de 10 días de cicatrización, sin (izq.) y con (der.) el sustrato (S) que está bioabsorbiéndose.

El estudio de regeneración de piel en ratas demostró que el sustrato seleccionado promueve la cicatrización de las heridas, sin que se observen respuesta inflamatoria ni rechazo del material. Los estudios histológicos permitieron observar que no hay diferencias en la calidad de la cicatrización de las zonas tratadas con el sustrato y el grupo control. El desempeño del sustrato se destaca sobre el grupo control en promover una curación más rápida.

4.5. Referencias

1. Price NC, Stevens L. Fundamentals of Enzymology. The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins 3rd edition. Oxford: Oxford University Press,1999.
2. Azevedo HS, Reis RL. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. In: Reis RL, San Roman J. Editors. Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. CRC Press; 2005.
3. Price NC, Stevens L. Fundamentals of Enzymology. The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins, Third Ed. Oxford: Oxford University Press; 1999.
4. Cassim B, Mody G, Bhoola KD. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. Pharmacology & Therapeutics 2002; 94:1-2.
5. Wen-Xiang M, et al. Time-dependent expression and distribution of monoacylglycerol lipase during the skin-incised wound healing in mice. International Journal of Legal Medicine 2011;125 549-558
6. Mukai K, Doi Y, Sema Y, Tomika K. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. Biotechnology Letters 1993; 15 601-604

7. Williams SF, Martin, DP. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. Biopolymers Online;2005.
8. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Fourth Ed. Philadelphia:WB Saunders &Co; 1996.
9. Marchesault RH, Monasterios CJ, Jesudason JJ, Ramsay B, Saracovan I, Ramsay J, et al. Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacteria and synthetic poly-beta-hydroxyalkanoates. Polymer Degradation and Stability 1994;45:187-196.
10. Ikada Y. Tissue Engineering: Fundamentals and Applications. United Kingdom: Interfase Science and Technology, Elsevier; 2006.
11. Zorlutuna P, Tezcaner A, Hasirci V. A novel construct as a cell carrier for tissue engineering. Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition 2008;19:399-410.
12. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975;6:331-343.

5. Conclusiones

El material elegido para este desarrollo fue el poli(3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato) (PHBV), un polímero de origen bacteriano de la familia de los polihidroxialcanoatos. Sus probadas propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad lo convierten en una buena alternativa frente a otros polímeros bioabsorbibles aprobados para aplicaciones biomédicas. La técnica de purificación de PHBV presentada en esta tesis fue efectiva para eliminar las impurezas identificadas por RMN de ^1H .

Se presentaron tres métodos de elaboración de los sustratos para la regeneración de tejido: lixiviado de sales, separación de fases inducida térmicamente y evaporación de emulsiones. Se determinó la porosidad de los sustratos elaborados, así como también los parámetros críticos de los procesos de elaboración. La evaluación de desempeño de los sustratos se realizó tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

El método de lixiviado de sales mostró ser útil para la producción de membranas de porosidad controlada. Sin embargo, dichas membranas presentaron un alto carácter hidrófobo, característica que limita su aplicación como sustrato para Ingeniería de tejidos. Para superar ese inconveniente se aplicaron dos métodos de hidrólisis, uno mediado por enzimas y otro por álcalis. Ambos procesos de hidrólisis demostraron ser efectivos y controlables en función de los tiempos de tratamiento y concentración de los reactivos. De ambos métodos el más conveniente desde el punto de vista de aplicación a escala es el método enzimático. A diferencia del uso de álcalis las condiciones de reacción son más suaves ($\text{pH} \sim 7$) por lo que no sería necesario la manipulación de soluciones altamente corrosivas ($\text{pH} \sim 13$). Otra ventaja es que las enzimas son reactivos compatibles con el medio ambiente y con el organismo, de modo que si quedaran trazas residuales de los mismos luego del tratamiento no representaría riesgos para la salud.

Si se evalúan las propiedades mecánicas de las membranas obtenidas por lixiviado de sales, se encuentra otra limitación. La baja resistencia a la flexión es un inconveniente que no se pudo superar. Sin embargo, estos sustratos podrían utilizarse en regiones de la piel en donde una alta flexibilidad no sea un requerimiento excluyente.

Por otro lado, también se elaboraron membranas porosas por el método de separación de fases inducida térmicamente. El tamaño de poros de estos sustratos pudo ser controlado por la temperatura de separación de fases. La principal desventaja

de este método es la baja resistencia a la flexión de los sustratos, aun más baja que la de las piezas obtenidas por lixiviado de sales. Esta característica las hace inadecuadas para la aplicación buscada. Un aspecto destacable de esta técnica es la posibilidad de obtener sustratos de formas variadas modificando el recipiente de elaboración. En sustratos para la regeneración de otro tipo de tejido esta característica puede ser de gran utilidad.

El método de evaporación de emulsiones fue el mejor de los métodos probados para la elaboración de sustratos porosos, fundamentalmente por tres razones: sencillez de la manufactura, hidrofiliidad y flexibilidad. En efecto, mediante pasos sencillos de elaboración fue posible la obtención de membranas flexibles y porosas. Los parámetros evaluados fueron la concentración de surfactante, el contenido de agua y de etanol. El contenido de agua en las emulsiones provocó poros de mayor tamaño en la mayoría de los sustratos. Se pudieron obtener poros desde 3 a 34 μm y espesores de membranas de 60 a 500 μm . Los sustratos obtenidos fueron completamente hidrofílicos, sin necesidad de pasos extras como en el caso del método de lixiviado de sales. Por otro lado, la morfología observada en ambas caras de los sustratos fue diferente. Esta característica es de gran utilidad para la proliferación de queratinocitos y fibroblastos de manera simultánea en el mismo sustrato. Según se encontró en literatura un tamaño óptimo para el crecimiento y proliferación de fibroblastos es de 20 μm ; además, no debe existir contacto entre fibroblastos y queratinocitos para un correcto desarrollo de ambos tipo de células. Por lo tanto, una morfología de variados tamaños de poros que sirva de barrera pero que a la vez permita el intercambio de materia entre ambos tipos de células es esencial. Esta característica puede lograrse por medio de sustratos obtenidos por evaporación de emulsiones.

Las propiedades mecánicas son otro aspecto a destacar de estos sustratos. Los parámetros determinados mediante los ensayos de tracción: módulo tensil y tensión y deformación de rotura, son del orden a los valores publicados para la piel; de modo que los sustratos producidos por emulsiones pueden proveer una resistencia mecánica comparable a la piel. Además, la excelente flexibilidad de estos sustratos no limitaría su aplicabilidad en diferentes regiones de la piel.

El desempeño de los sustratos elaborados por los diferentes métodos fue evaluado por técnicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Por un lado, se planteó un experimento de biodegradación *in vitro* con una lipasa de origen bacteriano a una actividad similar a la presente en el suero humano en condiciones de pH fisiológico y 37°C. Este modelo

simple de biodegradación resultó útil para evaluar el desempeño de los sustratos obtenidos por evaporación de emulsiones y lixiviado de sales en un ambiente similar al fisiológico. La mayor velocidad de degradación de los sustratos obtenidos a partir de las emulsiones es atribuible a su menor porcentaje de cristalinidad y a su mayor hidrofiliidad. Es un hecho aceptado por muchos autores que la degradación actúa más rápidamente en las regiones amorfas debido a la mejor difusión de agua y especies hidrolíticas que en las regiones cristalinas de los sustratos.

Por otro lado, se evaluó *in vitro* la capacidad de adhesión de queratinocitos sobre sustratos diferentes sustratos. El mejor grado de adhesión celular se logró fue en un sustrato obtenido por evaporación de emulsiones para una concentración de surfactante de 40%_{P/P} de polímero y contenido de agua de 2%. Dicha información fue útil para seleccionar el sustrato para subsiguientes pruebas de desempeño *in vivo*.

Con respecto a los experimento *in vivo* se realizó en primera instancia una evaluación de la respuesta inflamatoria y eventual daño histológico en animales de laboratorio. Para ello se insertaron subcutáneamente sustratos porosos y no poroso. Este experimento permitió apreciar las mejores propiedades de biocompatibilidad de los sustratos porosos a través de la reacción ante un cuerpo extraño. Los sustratos no porosos fueron encapsulados por el organismo lo cual impidió su bioabsorción y biodegradación, a diferencia del sustrato poroso que presentó baja respuesta inflamatoria y mostró una bioabsorción significativa al cabo de un mes de implantado.

Finalmente, mediante ensayos *in vivo* en ratas, se analizó la capacidad de cicatrización en un par de heridas generadas en cada ejemplar: una cubierta sólo por una gasa vaselinada (control) y la otra cubierta por una membrana obtenida por evaporado por emulsiones. Las heridas cubiertas con el sustrato no tuvieron respuesta inflamatoria ni alteraron el comportamiento de los animales. Si bien en promedio las heridas con el sustrato cicatrizaron en un mismo período de tiempo que el experimento control, la presencia del sustrato aceleró el proceso de regeneración de piel en algunos animales. En base a estos resultados preliminares, se deberán diseñar ensayos *in vivo* con un número adecuado de animales que permita un estudio estadístico de la respuesta de los sustratos de manera aguda y crónica.

Los resultados presentados en este trabajo concerniente a la elaboración y al análisis del desempeño de sustratos para regeneración de piel podrán aplicarse para escalar el proceso de elaboración de los sustratos para este fin. También podrán emplearse para avanzar en el diseño de métodos de fabricación de sustratos para

ingeniería de otro tipo de tejidos, para desarrollo de soportes para biología celular, entre otras aplicaciones. Se puede mejorar el desempeño de los sustratos para ingeniería de tejidos si se funcionaliza el PHA con el fin de incorporar a su estructura moléculas como fibronectina o ácido hialurónico, sustancias que contribuyen a la regeneración y cicatrización de tejidos. Los avances realizados en este sentido se presentan en el Apéndice 2 que complementa el cuerpo principal de la presente tesis.

Finalmente, si bien este trabajo se ha focalizado en aspectos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales tanto en la producción de sustratos como en su caracterización, durante su desarrollo ha requerido de la interrelación con la Química, la Bioquímica, la Biología y la Medicina. En este sentido, esta tesis pretende contribuir a la generación del abordaje transdisciplinar al que nos desafía la Ingeniería de Tejidos.

6. Trabajos presentados en congresos y publicaciones

1. Congresos

Avances en el Desarrollo de Sustratos Bioabsorbibles de poli(hidroxibutirato-co-hidroxiclavalato) para tejido dérmico y epidérmico

I. Ruiz, E. Hermida y A. Baldessari

Presentado en:

9° Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET2009. Buenos Aires, 19-23 de Octubre 2009.

Trabajo publicado en CD: ISBN 978-987-1323-13-5.

Desafíos en el desarrollo de sustratos bioabsorbibles aptos para ingeniería de tejidos dermo-epidérmicos

I. Ruiz, A. Baldessari, A. Bolgiani, A. Cauerhff, E.B. Hermida

Presentado en:

IX Feria-Congreso Latinoamericano y IV Congreso Argentino de Biotecnología, Biolatina 2010. Buenos Aires, 18 - 20 de octubre 2010.

Taylorling Bioabsorbable Scaffolds Suitable for Skin Regeneration

Ruiz I, Baldessari A, Hermida EB

Presentado en:

Annual Meeting of Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society, TERMIS EU 2011. Granada, España 7-10 de Junio 2011.

Biodegradation and Histological Response of PHBV Porous Scaffolds

É. B. Hermida, I. Ruiz, A. Baldessari, E. Kreimann, R. Cabrini, G. Juvenal, G.N.

Hermida y M. Fungueiro.

Presentado en:

2^{do} Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos-OB1 2011. Mar del Plata, 28-30 de septiembre 2011.

Resumen Libro de Actas del Taller: ISBN: 978-987-27301-0-9 y Trabajo Completo en el CD ISBN: 978-987-27301-0-9.

Elaboración y Caracterización de Sustratos Biodegradables de PHBV por Separación de Fases

I. Ruiz, M.Gómez, E. Hermida

Presentado en:

11° Congreso Binacional de Metalurgia y Materiales SAM / CONAMET2011. Rosario, 18- 21 de Octubre de 2011.

Trabajo Completo en CD: ISBN: 987-27308-0-2.

2. Publicaciones

Fabrication and characterization of porous PHBV scaffolds for tissue engineering.

I. Ruiz, É.B. Hermida, A. Baldessari.

Journal of Physics: Conference Series **332** (2011) 012028.

(<http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/332/1/012028>)

Tayloring bioabsorbable scaffolds suitable for skin regeneration.

I. Ruiz, A. Baldessari, É.B. Hermida.

Histology and histopatology, 26 suppl. 1 (2011) 374.

Biodegradation and histological response of PHBV porous scaffolds.

É.B. Hermida, I. Ruiz, A. Baldessari, E. Kreimann, R. Cabrini, G. Juvenal, G.N. Hermida, M. Fungueiro.

Biocell 36 (2012) A9.

7. Agradecimientos

A mis directores de tesis la Dra. Élide Hermida y la Dra. Alicia Baldessari por brindarme su tiempo, experiencia y apoyo profesional para hacer posible este trabajo.

A mis compañeros de CNEA: Oxana, Sara y Claudio, y de la FCEN: Paula y Pupe, por generar un buen clima de trabajo y estar siempre dispuestos a dar una mano.

A la Lic. Paula Prados por su estudio de excelente estudio de mercado acerca de las matrices para regeneración de piel en el mercado actual.

Al Dr. Carlos Arregui y la Lic. Ana González Wusener por los ensayos de cultivos *in vitro* fundamentales para la evaluación de los sustratos.

A la Dra. Gladys Hermida y el Dr. Alberto Bolgiani por llevar a cabo los ensayos *in vivo* y por sus sustanciales aportes al proyecto.

Al personal del Servicio de Microscopia del Departamento de Materiales y de la Gerencia Química por la preparación y toma de las micrografías electrónicas de barrido.

Al personal del taller por satisfacer nuestros requerimientos tan eficientemente.

Al Instituto Sabato por brindar el marco académico de excelencia para lograr una formación sólida.

A los compañeros del FER por los cumpleaños y las reuniones compartidas, tan necesarias para distenderse del trabajo de todos los días.

A mi familia por el apoyo, por enseñarme a ser una persona de bien y que los logros son producto del trabajo y del esfuerzo.

A mi Negrita por brindarme cariño y apoyo en todo momento, en especial en las etapas de mayores incertidumbres.

Apéndice 1-Fisiología de la piel

La piel está constituida por tres capas, que desde la superficie hasta la profundidad son:

- Epidermis
- Dermis
- Hipodermis o tejido graso subcutáneo

Se agregan los siguientes anexos cutáneos: folículo pilosebáceo, glándulas sudoríparas y las uñas.

a) Epidermis

Epitelio de superficie, avascular. Es un epitelio plano poliestratificado, queratinizado con 4 capas, que con excepción de la capa basal comprenden cada vez mas capas de células. El orden de los estratos desde el interior a la superficie el siguiente:

- estrato basal
- estrato espinoso
- estrato granulosos
- estrato corneo

El espesor de la epidermis varía según la región cutánea entre 0,04 y 0,4 mm. Está constituida por aproximadamente un 90% por células epidérmicas (queratinocitos) pero además contiene células de Langerhans (sistema inmune), melanocitos (sistema pigmentario) y células de Merkel (sistema nervioso).

A nivel funcional se pueden distinguir 3 regiones en la epidermis que se renuevan desde la base de modo permanente.

- a. Zona proliferativa (estrato basal): renovación celular (epidermopoyesis)
- b. Zona de diferenciación (estrato espinoso y granuloso): diferenciación y maduración celular.
- c. Zona funcional (estrato corneo): formación de una capa protectora, eliminación celular.

Queratinización y crecimiento de la epidermis

En las células recién formadas en el estrato basal ocurre un proceso de desarrollo llamado queratinización conforme estas emigran a la superficie. Los

queratinocitos acumulan cada vez más queratina al pasar de una capa epidérmica a la siguiente. Posteriormente tiene lugar su apoptosis (su núcleo se fragmenta, desaparecen otras organelas y la célula muere). Tarde o temprano, las células queratinizadas se descaman y las reemplazan otras de capas subyacentes, las cuales a su vez se queratinizan. El proceso de formación de las células en el estrato basal, su ascenso hacia la superficie, su queratinización y su descamación tarda unas 4 semanas en la epidermis. La velocidad de división celular en el estrato basal aumenta cuando se arrancan las células de las capas externas de la epidermis, como ocurre en las abrasiones y quemaduras.

b) Dermis

Está compuesta sobre todo por tejido conectivo que contiene colágeno y fibras elásticas. Las pocas células que hay aquí son fibroblastos, macrófagos y algunos adipocitos. La dermis posee vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos. De acuerdo con su estructura tisular la dermis se divide en capas papilar superficial y reticular profunda.

Capa papilar: es la porción superficial de la dermis y le corresponde la quinta parte del grosor total de la dermis. Consiste en tejido conectivo areolar que contiene fibras elásticas finas. Su área superficial aumenta considerablemente gracias a pequeñas protuberancias digitoformes llamadas papilas dérmicas. Estas estructuras penetran en la epidermis y contienen asas capilares. Algunas papilas dérmicas también incluyen receptores táctiles denominados corpúsculos táctiles o de Meissner, que son terminaciones nerviosas sensibles al tacto. En las papilas dérmicas también existen terminaciones nerviosas libres, o sea, dendritas que carecen de especialización estructural apreciable. Dichas terminaciones envían impulsos que finalmente se traducen en sensaciones de frío, dolor, cosquilleo y comezón.

Capa reticular: consiste en tejido conectivo denso e irregular con haces de fibras de colágeno y fibras elásticas gruesas. Los haces de fibras de colágeno de esta región se entrelazan a manera de red. Los espacios entre las fibras están ocupados por unos cuantos adipocitos, folículos pilosos, nervios o así como glándulas sebáceas y sudoríparas. La combinación de fibras de colágeno y elastinas en la para reticular proporcionan a la piel su resistencia extensibilidad y elasticidad.

c) Hipodermis

Grasa subcutánea sirve como: almohadilla absorbente de golpes, protegiendo estructuras vitales manteniendo la temperatura corporal; soporte de vasos sanguíneos y nervios que pasan de los tejidos subcutáneos hacia la dermis. Los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas se originan a ese nivel.

Cicatrización de las heridas

La cicatrización de heridas tiene 3 fases: inflamación, proliferación y maduración.

Inflamación

La curación de la herida se inicia con la hemostasia, la cual se manifiesta clínicamente por el blanqueamiento local de la piel circundante, la formación de un coagulo y el cese del sangrado. Los mediadores celulares más importantes que intervienen en la hemostasia son: la fibrina, las plaquetas, ambas formadoras del coagulo y los vasos sanguíneos.

El coagulo, una vez formado, constituye una matriz dinámica y viable de proteínas y células que contribuye no solo a la hemostasia sino también a la llegada de células inflamatorias, fibroblastos y factores de crecimiento indispensables para que tenga lugar el proceso de cicatrización. Así, la fibrina es capaz de inducir la subsiguiente fase inflamatoria de la cicatrización tras unirse a receptores que se encuentran en la superficie de los monocitos y los neutrófilos, y sirve de reservorio de ciertos factores de crecimiento, y de citoquinas que estimulan la proliferación de los fibroblastos y la angiogénesis.

Tras la hemostasia, sobreviene la inflamación, cuyos signos y síntomas clínicos son: la aparición de eritema, hinchazón y dolor, clara consecuencia de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los capilares que, inicialmente, habían presentado vasoconstricción para conseguir la hemostasia. Estos procesos facilitan la extravasación de las proteínas del suero al interior de la herida, así como la diapédesis de las células inflamatorias. Los polimorfonucleares, son las primeras células de esta clase que llegan al lugar de la herida, atraídas por diversos factores de crecimiento y citoquinas. De igual manera, los macrófagos también eliminan detritus, partículas extrañas y bacterias, pero alcanzan el pico máximo de población más tarde, a las 48-72 horas, permanecen más tiempo, días a semanas, y participan en fases mucho más complejas de la curación de la herida.

Proliferación

En esta fase, que ocurre aproximadamente a los 4 días de la herida, tienen lugar dos eventos fundamentales: la formación de un tejido de granulación y la epitelización. La génesis del tejido de granulación implica la migración y la proliferación de fibroblastos, la producción de una matriz extracelular y la formación de nuevos capilares (angiogénesis) que, en conjunto, conducirán finalmente a la regeneración de una dermis funcional. Durante el proceso de epitelización, ocurre, en primer lugar, la eliminación de cualquier costra o residuo y, finalmente, el restablecimiento de una epidermis intacta sobre el tejido de granulación.

Los fibroblastos circulan entre la matriz extracelular bajo la dirección, por un lado, de las integrinas presentes en su superficie celular, que interaccionan con los diversos componentes de la matriz (fibrina, fibronectina, vitronectina y ácido hialurónico), y, por otro, de las metaloproteinasas, enzimas capaces de degradar cualquier componente de la matriz extracelular y eliminar, así, cualquier obstáculo que se interponga en la migración ordenada de estas células mesenquimales.

El fibroblasto es la célula mesenquimal más importante en el proceso de cicatrización de las heridas, ya que actúa no solo como fábrica en la elaboración de la matriz extracelular, sino también como maquinaria especializada que permitirá, gracias a sus propiedades contráctiles, re aproximar los bordes de la herida durante la fase madurativa de la cicatrización.

El colágeno formado no sirve solo para conferir fuerza a la cicatriz, sino que también facilita el movimiento de otras células, como la de los endotelios y los macrófagos.

La elastina, componente habitual de la dermis normal, no se produce durante la cicatrización de una herida. La ausencia de este componente, podría explicar la firmeza y la falta de elasticidad de las cicatrices.

A medida que el proceso de epitelización progresa, una masa de queratinocitos en forma de cuña, se desplaza cruzando el tejido de granulación. El extremo en cabeza de esta cuña está constituido por queratinocitos que migran y dejan en su camino una capa estratificada de queratinocitos que proliferan. Este proceso continua hasta que los queratinocitos de los extremos opuestos de la herida restablecen el contacto.

Maduración

Finalmente, en la fase madurativa tiene lugar la contracción de la cicatriz, al tiempo que disminuye el enrojecimiento, el grosor y la induración de esta y se incrementa su resistencia. La contracción de la herida se inicia a los 4-5 días y se produce debido a la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos, que deben su capacidad contráctil a la presencia de filamentos de actina.

En una cicatriz reciente, las fibras de colágeno se encuentran dispuestas al azar, lo que explica que resulte poco resistente, a pesar de su elevada concentración. Con el tiempo las fibrillas aumentan su grosor, se incrementan las uniones interfibrilares y se organizan de manera ordenada, con lo que maximiza su resistencia. Todo este proceso de maduración ocurre de forma más activa durante los primeros 6 meses. La cicatriz a medida que madura, se torna menos rojiza debido a la disminución de la densidad de capilares.

Cuando los bordes de la herida se encuentran muy próximos y la contaminación y los traumatismos son mínimos, la herida cicatriza por la primera intención. La cicatrización por segunda intención tiene lugar cuando los bordes no están lo suficientemente próximos como ocurre en las heridas infectadas o cuando el traumatismo o la pérdida de tejido han sido muy importantes. La cicatrización tiene lugar gracias al relleno de la herida por tejidos de granulación, lo que requiere un intervalo más largo y produce una cicatriz más grande. La cicatrización por tercera intención se produce cuando existe una demora entre la producción de la lesión y el cierre de la herida. Cuando se produce un cierre demorado de la herida, dos superficies opuestas de tejido de granulación deben reunirse para cicatrizar juntas.

Referencias

Tortora GJ, Reynolds Grabowsky S. Principios de anatomía y fisiología. México: Oxford University Press;2002.

Ghosh K, Clark RAF. Chapter seventy-six -Wound repair. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, Editors. Principles of Tissue Engineering (Third Edition). Burlington: Academic Press; 2007.

Apéndice 2- Funcionalización química del PHBV

Como ya fue expresado en capítulos anteriores una de las desventajas del PHBV y otros polímeros de la familia de los PHAs es su elevado carácter hidrófobo. Se han citado múltiples estrategias para superar este inconveniente tales como: la implantación de iones, los tratamientos con plasma de diferentes gases, la hidrólisis enzimática o alcalina y la implantación de grupos funcionales hidrofílicos.

Entre los grupos funcionales más estudiados se encuentran los carboxilos y los grupos aminos [1,2]. Ambos grupos tienen la capacidad de actuar como un enlace químico para inmovilizar macromoléculas y mejoran la hidrofiliidad del sustrato.

En el presente capítulo se describirán los estudios relacionados con la hidrólisis del PHBV para la formación de grupo polares como carboxilos e hidroxilos y la aminólisis del PHBV por medio de etilendiamina. Se llevaron a cabo métodos de funcionalización del PHBV en solución con el fin de obtener materiales en los que sus propiedades en volumen sean lo más homogéneas posible. Además, es menester evaluar la cinética de estos métodos de funcionalización ya que muchas veces los procesos de modificación superficial tienen una duración limitada porque los grupos implantados tienden a migrar hacia el volumen del polímero para minimizar la energía libre superficial [3].

A2.1.Hidrólisis alcalina

Con el objeto de aumentar la hidrofiliidad del PHBV se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis alcalina en medio alcohólico sobre el polímero original. La disolución de la base (KOH) se realizó en un solvente miscible con el solvente de disolución del PHBV.

A2.1.1. Procedimiento

A 20 ml de solución de PHBV 5%^{p/v} en cloroformo se le agregaron 10 ml de solución de KOH en etanol de diferentes concentraciones. Se agitaron a 30°C y 200 rpm durante 60 minutos. La muestra se acidificó con una solución de HCl 10%^{p/v} hasta neutralidad y luego con agua destilada. Se separó la fase orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó en evaporador rotatorio.

Para evaluar la capacidad de formación de películas, se prepararon soluciones 4%^{p/v} en cloroformo de PHBV hidrolizado a diferentes concentraciones de la base, luego se extendió la solución sobre un vidrio portaobjetos y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente.

Posteriormente se determinó el Mw de los productos de reacción y el ángulo de contacto en las películas formada.

A2.1.2. Resultados y discusión

En primera instancia se evaluó la capacidad de formar películas de los polímeros obtenidos después del tratamiento hidrolítico. Se observó que el polímero tratado con 0,01 N de KOH en etanol formó una película quebradiza y a concentraciones mayores de base fue imposible lograr la formación de películas. La Tabla A2.1.muestra la capacidad de formación de película del polímero hidrolizado.

Tabla A2.1. Capacidad de formación de películas.

[KOH] et. (N)	Capacidad de formar films
0,1	-
0,05	-
0,01	+
5.10 ⁻³	+++
5.10 ⁻⁴	+++

La Fig. A2.1 muestra la reducción del peso molecular Mw con el aumento de la concentración de KOH. Además se pudo observar una disminución del Mw del polímero en solución a etanol solo (0 N en la Fig. 5.1) respecto al del producto recibido (Mw=97.600 Da); esto puede deberse a una degradación hidrolítica provocada por trazas de agua en los solventes de reacción.

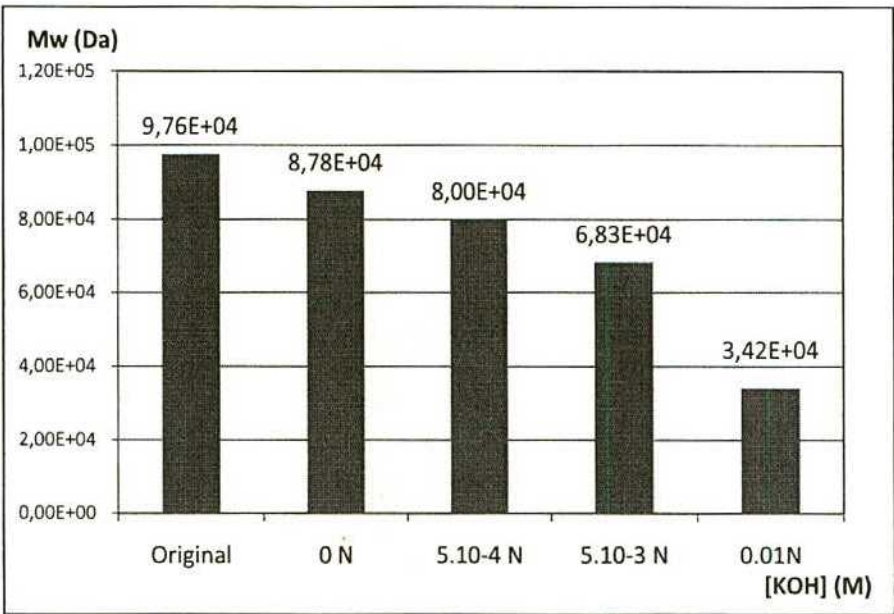


Fig. A2.1. Variación del Mw de los productos de hidrólisis.

En lo que respecta a la hidrofiliidad, se observó una disminución del ángulo de contacto de las películas obtenidas de los productos de hidrólisis a medida que aumentaba la concentración del KOH en etanol, tal como se ilustra en la Tabla A2.2.

Tabla A2.2. Ángulo de contacto de las muestras hidrolizadas.

[KOH] _{et} (N)	Angulo de contacto (°)
Original	106±2
0	100±4
5.10 ⁻⁴	82±4
5.10 ⁻³	84±3
0,01	72±3

A2.2 Aminólisis

Existen trabajos en la literatura referidos a la funcionalización de PHBV para la introducción de grupos aminos a través de reacciones de aminólisis ya sea por medio de plasma generado por radiofrecuencias en atmósfera de amoníaco [4] o de química tradicional con etilendiamina [5]. Sin embargo, una de las limitaciones de estos métodos es su escasa penetración cuando se realizan sobre la superficie del producto terminado.

A continuación se presentarán los resultados de funcionalización de PHBV por aminólisis en películas (modificación superficial) y en solución (funcionalización en volumen). Los estudios de aminólisis en solución se efectuaron con el objeto de lograr un material de propiedades más reproducibles que los obtenidos a través de la modificación de películas, para la posterior manufactura de los sustratos. Se estudiaron las modificaciones en el Mw por medio de cromatografía de permeación en geles y microanálisis. Además se cuantificó la densidad de grupos aminos presentes en las películas mediante una técnica de adsorción de un colorante ácido (Acid Orange 7) [6,7] aplicada por algunos autores para la caracterización de superficies funcionalizadas de poliésteres. La variación en la hidrofiliidad se evaluó a través de la determinación del ángulo de contacto.

A2.2.1. Materiales y métodos

Se utilizó poli(3-hidroxiбутирато-3-hidroхивалерато) (PHBV) adquirido a Sigma Aldrich con 12 % en peso de ácido 3-hidroхивалérico y etilendiamina (EDA) adquirida a Biopack. Todos los solventes utilizados fueron de grado analítico.

Procedimientos

Aminólisis sobre películas de PHBV

Se elaboraron películas de PHBV a partir de una solución del polímero de 5% ^P/_V por evaporación de solvente. Se cortaron muestras cuadradas de 2 cm de lado aproximadamente que fueron sometidas a dos condiciones de tratamientos por inmersión:

- (a) Solución acuosa 1 M de EDA (Tratamiento A)
- (b) Solución acuosa 1M de EDA en 0,5 N de KOH (Tratamiento B)

durante diferentes períodos de tiempo a 55°C y 200 rpm de agitación. Terminado el período de reacción, las muestras se enjuagaron con abundante agua destilada, se secaron con papel absorbente y luego en desecador con bajo vacío.

Aminólisis de PHBV en solución

En este caso se estudiaron las reacciones de aminólisis: a) a tiempo constante con diferentes concentraciones de EDA y b) a distintos tiempos a una determinada concentración de EDA.

(a) Alícuotas de 12 ml de solución 2,5%^P/_V de PHBV en cloroformo reaccionaron con diferentes concentraciones de etilendiamina (EDA) a 55°C y 200 rpm en el agitador durante 15 min. La Tabla A2.3 resume las condiciones de reacción ensayadas.

Tabla A2.3. Condiciones de reacción para aminólisis en solución.

Vol. Solución (ml)	Vol. EDA (ml)	[EDA] (M)
12	0,20	0,25
12	0,04	0,05
12	0,02	0,025

Luego de finalizada la reacción se lavó la fase orgánica con agua destilada hasta neutralidad para eliminar el exceso de EDA y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se eliminó el cloroformo en evaporador rotatorio.

(b) Se repitieron las reacciones con solución 2,5%^P/_V de PHBV en cloroformo y una concentración de 0,25 M de EDA a diferentes tiempos: 30, 45 y 60 min.

Se elaboraron películas por evaporación y se evaluó la capacidad de formación de películas con los productos obtenidos en cada una de las condiciones mencionadas.

También se determinó la densidad de grupos aminos, el Mw por GPC y el ángulo de contacto de las películas.

Determinación de la densidad de grupos aminos

La densidad de los grupos aminos sobre las películas se determinó por tinción con un colorante ácido. Para ello, se sumergieron las películas en una solución 0,01 g/ml de Acid Orange 7 a pH 3 a 30 °C por 5 hs. Al cabo de ese tiempo, se enjuagaron las películas con agua destilada y luego con HCl 1mM. Se desorbió el colorante asociado con NaOH 1 mM recogiendo el eluido en un recipiente aforado y se determinó su concentración por espectrofotometría UV-vis a través de una curva de calibración determinada a 485 nm. Se asume que cada molécula de colorante se absorbe por un grupo amino presente en la superficie. Se calculó la densidad superficial de grupos aminos presente en la muestra considerando el área de la superficie analizada. La Fig. A2.2 muestra una curva de calibración del colorante Acid Orange 7 utilizada para la determinación.

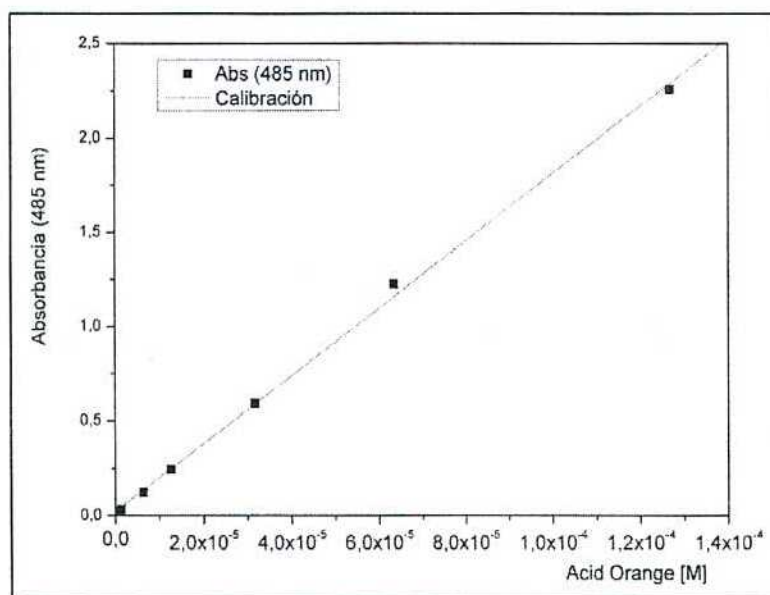


Fig. A2.2. Curva de calibración del colorante Acid Orange.

A2.2.2 Resultados y discusión

Aminólisis sobre películas de PHBV

Se observó un aumento en la densidad superficial de grupos aminos de las películas tratadas con las soluciones de EDA. La Fig. 5.3 ilustra la evolución de la

densidad de los grupos aminos con el tiempo de reacción para ambas condiciones de reacción. Se puede apreciar que el aumento de la densidad de grupos aminos es mucho más marcado para la reacción con KOH. Además en este último caso se observa una dependencia casi lineal con el tiempo de reacción a diferencia de la reacción llevada a cabo sólo en EDA acuoso. Esto permitiría tener un mejor control de la reacción. A partir de las 3 horas de reacción para el caso del tratamiento llevado a cabo en solución de EDA con KOH no se observó aumento de la densidad de grupos aminos superficiales.

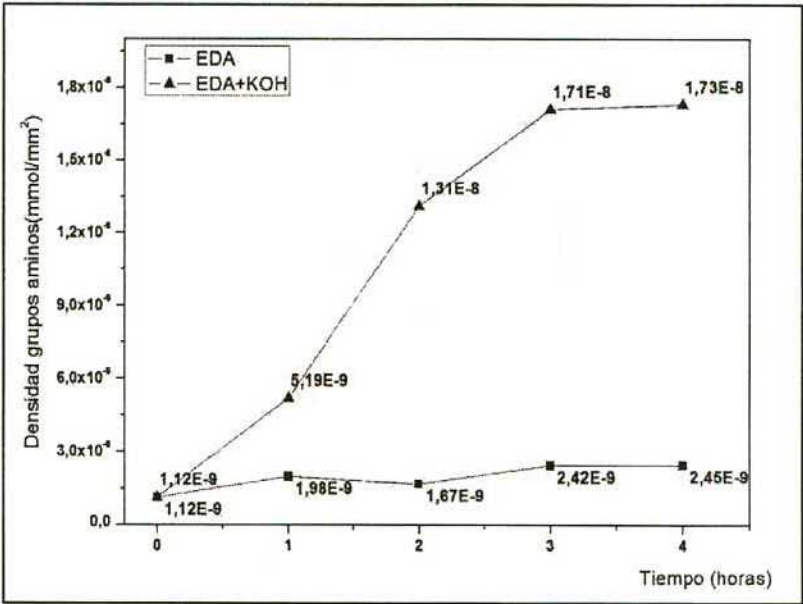


Fig. A2.3. Aumento de la densidad de grupos aminos en las películas tratadas por aminólisis.

Los valores de ángulo de contacto, presentados en la Tabla A2.4, disminuyen de manera constante observándose una disminución más acentuada en el caso se los tratamientos con KOH.

Tabla A2.4. Ángulo de contacto de películas tratadas por aminólisis.

Tiempo (h)	Ángulo de contacto (°)	
	1M EDA	1M EDA+0,5 M KOH
0	88±1	88±1
1	62±4	55±3
2	55±2	52±4
3	49±3	37±3
4	40±3	32±4

Con respecto a la Mw, no se observaron modificaciones, lo que evidencia que el tratamiento superficial fue poco penetrante.

Aminólisis en solución

Fue posible obtener películas del polímero funcionalizado en todas las condiciones de reacción ensayadas. A partir de dichas películas se determinaron las densidades de grupos aminos.

Los resultados se representan en la Fig. A2.4. Se observa un aumento de la densidad hasta la concentración de 0,05 M de EDA y luego para 0,25 M permanece prácticamente sin cambios.

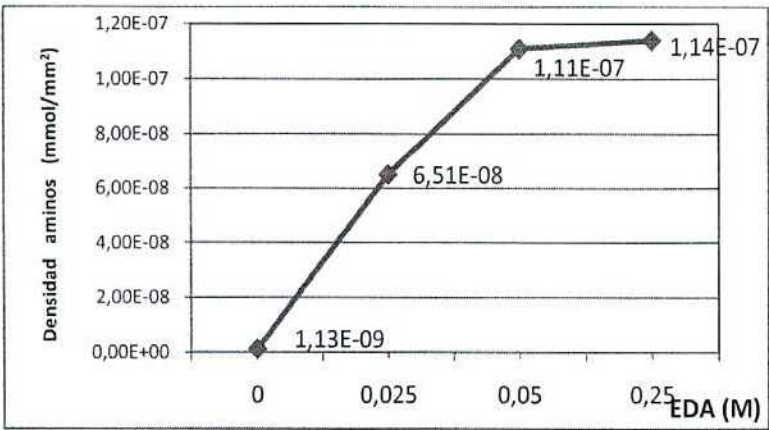


Fig. A2.4. Densidad superficial de grupos aminos en función de la concentración de EDA.

Como era de esperar, el Mw de las muestras sufrió una disminución por efecto de la reacción de aminólisis que aumentó con la concentración de EDA, como se aprecia en la Fig. A2.5.

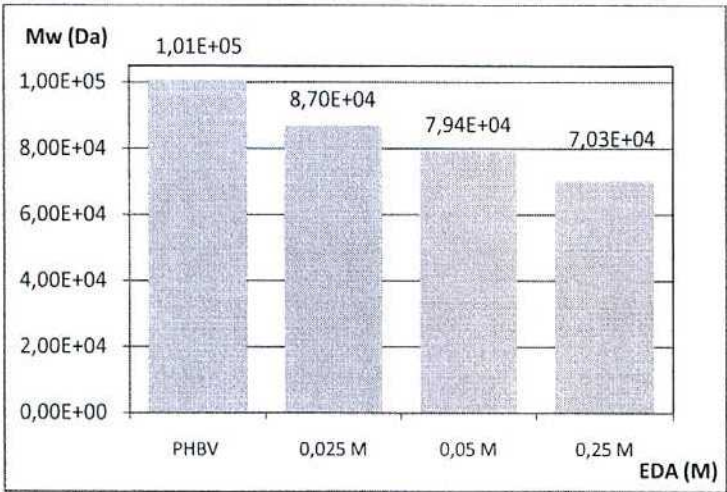


Fig. A2.5. Variación de la Mw con la concentración de EDA.

El aumento de la concentración de EDA también es consistente con la disminución del ángulo de contacto tal como puede observarse en la Tabla A2.5.

Tabla A2.5.Ángulo de contacto para diferentes concentraciones de EDA.

[EDA] M	Ángulo (°)
0	88±1
0,025	72±4
0,05	65±3
0,25	51±3

En el caso de las reacciones a diferentes períodos de tiempo a 0,25 M de EDA se observaron valores de densidad de grupos aminos que aumentaron hasta los 45 min de reacción y que luego disminuyeron a los 60 min. Este hecho podría indicar que a tiempos mayores podrían reaccionar ambos grupos aminos presentes en EDA mostrando una disminución en la detección de estos grupos. Los valores de densidad de grupos aminos se representan en la Fig. A2.6.

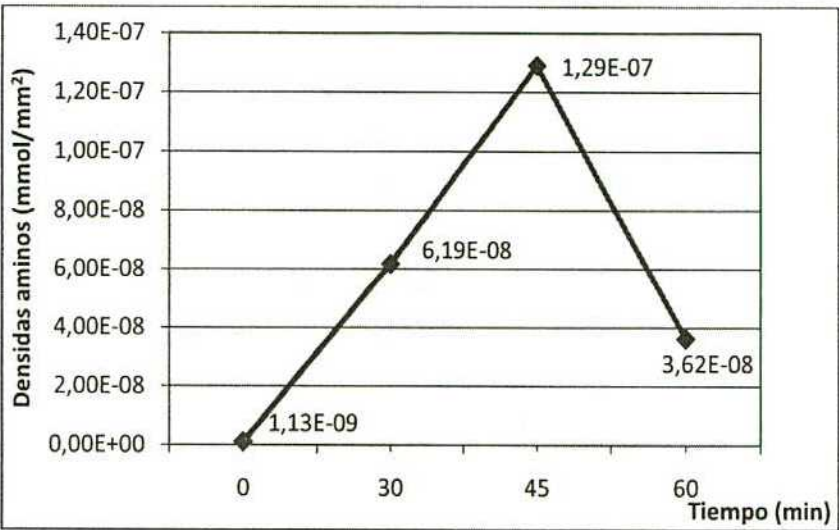


Fig. A2.6. Densidad de grupos aminos en función del tiempo de reacción para 0,25 M de EDA.

Con respecto al comportamiento de la Mw en estas reacciones, se puede observar una disminución hasta los 30 min de reacción, luego de los cuales el Mw se mantiene prácticamente constante. La Fig. A2.7 muestra la variación del Mw con el tiempo de reacción. Por otro lado, se observó también la disminución del ángulo de contacto con el tiempo de reacción, como se exhibe en la Tabla A2.6.

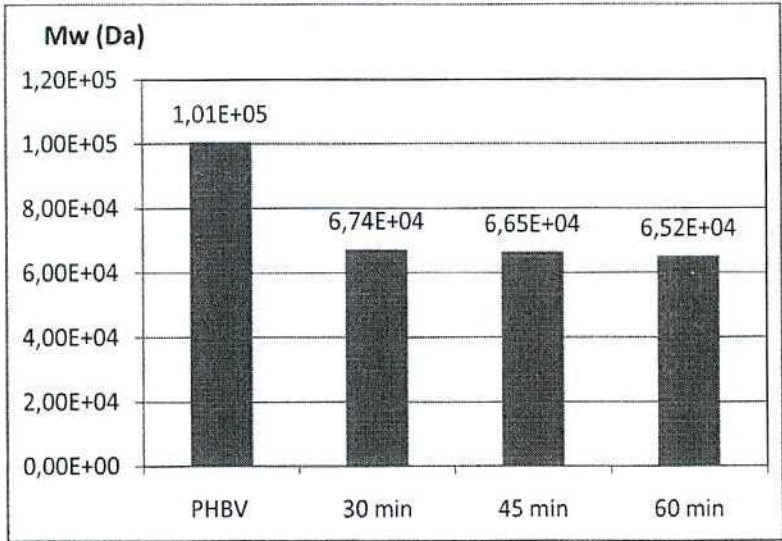


Fig. A2.7. Variación de la Mw con el tiempo de reacción con 0,25 M de EDA.

Tabla A2.6. Ángulo de contacto a diferentes tiempos de reacción con 0,25 M de EDA.

Tiempo(min)	Ángulo (°)
0	88±1
30	59±1
45	45±5
60	38±3

El análisis elemental del polímero tratado por aminólisis en solución por 60 min comprueba la presencia de N en la composición. El aumento del %C y %H es consistente con la introducción de moléculas de etilendiamina al PHBV.

Tabla A2.7. Comparación del análisis elemental del PHBV original con el producto de aminólisis de 60 min con 0,25 M de EDA.

	PHBV original	Aminólisis 60 min
%C	56,14	56,48
%H	7,01	7,42
%N	--	0,89
%O	36,85	35,21

Los productos de reacción de aminólisis en solución muestran en general mayor densidad de grupos aminos que las muestras tratadas en forma de películas. Además exhiben solubilidad en solventes mas polares que el PHBV original. El producto de reacción de 60 min de aminólisis es completamente soluble en cloroformo:metanol 1:1 (50 mg en 4 ml de solvente).

A2.3. Referencias

1. Zhong Luk J, Rondeau E, Trau M, Cooper-White J, Grøndahl L. Characterisation of amine functionalised poly(3-hydroxybuturate-co-3-hydroxyvalerate) surfaces. *Polymer* 2011; 52:3251-3258.
2. Siow KS, Britcher L, Kumar S, Griesser HJ. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Processes and Polymers* 2006; 3:392-418.
3. Yamada K, Takeda S, Hirata M. Improvement of autoadhesive and adhesive properties of polyethylene plates by photografting with glycidyl methacrylate. *Journal of Applied Polymer Science* 2007; 103: 493-500
4. Keen I, Broota P, Rintoul L, Fredericks P, Trau M, Grøndahl L. Introducing Amine Functionalities on a Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface: Comparing the Use of Ammonia Plasma Treatment and Ethylenediamine Aminolysis. *Biomacromolecules* 2006; 7:427-434.
5. Lao H-K, Renard E, El Fagui A, Langlois V, Vallee-Rehel K, Linossier I, Functionalization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) Films via Surface-Initiates Atom Transfer Radical Polymerization: Comparison with the Conventional Free-Radical Grafting Procedure. *Journal of Applied Polymer Science* 2011; 120:184-194.
6. Hu S-G, Jou C-H, Yang M-C. Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). *Carbohydrate Polymers* 2004; 58:173-179.
7. Kato K, Ikada Y. Immobilization of DNA onto Polymer Support and Its Potentiality as Immunoabsorbent. *Biotechnology and Bioengineering* 1996;51:581-590.

Apéndice 3 -Técnicas experimentales

A. Preparación de solución buffer salina de fosfatos

La solución buffer salina de fosfatos se preparó con agua destilada y las sales que se describen en la Tabla A3.1 para 1000 ml de solución:

Tabla A3.1 Concentraciones final de sales y preparación de solución buffer salina para 1000 ml de solución.

	Concentración final (mM)	Masa (g)
NaCl	138	8.06 g
KCl	3	0.22 g
Na ₂ HPO ₄	8.1	1.15 g
KH ₂ PO ₄	1.5	0.20 g

Se disuelven las sales en un vaso de precipitados con un agitador magnético en un volumen menor al volumen final de la solución. Se ajusta el pH a 7.4 con 1N de HCl o 10 N de NaOH gota a gota, monitoreando con un pH metro hasta llegar al valor. Por último se enrasa la solución a 1000 ml en un matraz aforado. Se almacena la solución en heladera entre 4 a 8°C aproximadamente para mejor conservación.

B. Cromatografía Líquida de partición en gel

Se utilizaron dos columnas Phenomenex de Phenogel™ en serie de SDVB de 5 µm de tamaño de partícula con porosidades de 10⁴Å y 10⁵Å montadas en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Waters. Estas columnas poseen un rango de Mw de 5 a 500 kDa y de 10 a 1.000 kDa respectivamente. El solvente de elución y dilución de las muestras fue cloroformo. La detección se realizó mediante un detector de índice de refracción. Se utilizaron estándares de calibración de poliestireno (PS) de Mw de bajo rango. Los parámetros K y α de Mark-Houwink –Sakurada utilizados son:

$$K_{PS} = 4.9 \times 10^{-3} \text{ ml/g}$$
$$K_{PHBV} = 16.6 \times 10^{-3} \text{ ml/g}$$

$$\alpha_{PS} = 0.794$$
$$\alpha_{PHBV} = 0.76$$

Las condiciones cromatográficas se optimizaron con un flujo de 1 ml/min de solvente y una temperatura de 30°C para el detector y la columna. El volumen de

inyección fue de 20 µl. La Fig. A3.1 muestra una curva de calibración obtenida por el sistema descrito.

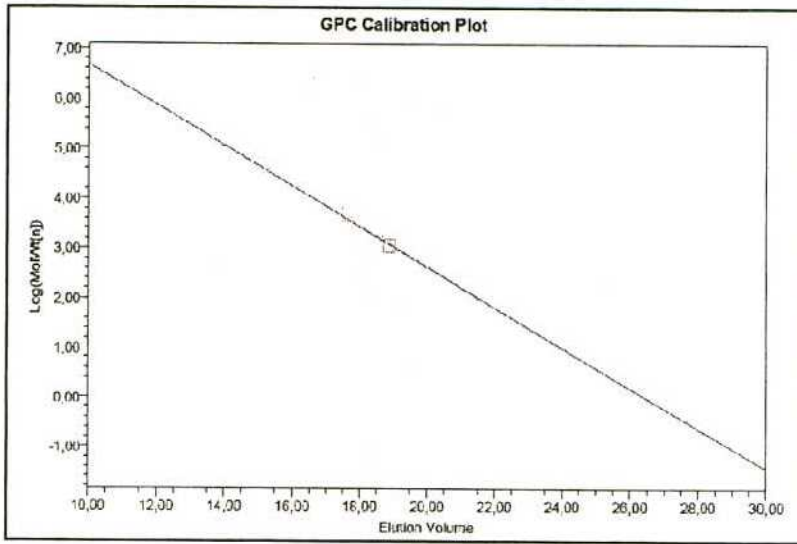


Fig. A3.1. Curva de calibración del sistema cromatográfico utilizado.

Los parámetros de la curva de calibración son los siguientes:

$$\log (Mw) = 10,7 - 0,406 V$$

$$R = 0,9968 \quad R^2 = 0,9984$$

donde V es el volumen de elusión en mililitros.

C. Determinación del % de cristalinidad por difracción de rayos X

Para determinar la cristalinidad de las muestras se utilizó un difractómetro Philips PW3710 con un tubo generador de rayos X de cobalto (Co). Los difractogramas se recogieron a temperatura ambiente en un rango de $2\theta = 10-70^\circ$ con un paso de $0,03^\circ$. El grado de cristalinidad se calculó ajustando una curva gaussiana a la base de los picos del difractograma tal como se aprecia en la Fig. A3.2. El área debajo de dicha curva representa la proporción amorfa A_a de la muestra ya que no toma en cuenta a los picos cristalinos. La diferencia del área total A_t del difractograma y el área amorfa A_a representa el área cristalina A_c y expresada como razón porcentual respecto al área total da como resultado el porcentaje de cristalinidad, de acuerdo con la Ecuación A3.1.

$$\% \text{ cristalinidad} = \frac{A_t - A_a}{A_t} \times 100 \quad (\text{A3.1})$$

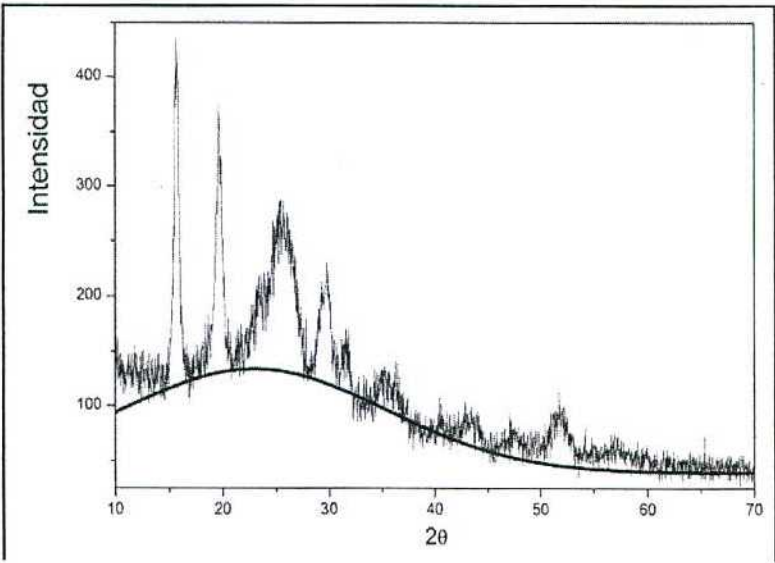


Fig. A3.2 Difractograma con el ajuste de la curva gaussiana para la determinación del % de cristalinidad

D. Masa molecular de las muestras sometidas a biodegradación *in vitro*
Evaporado de emulsiones

PBS				
Días	Mn (Da)	Mw (Da)	MP (Da)	PD
0	52794	95562	100790	1,8
14	61706	96450	102341	1,6
34	59041	92903	93914	1,6
57	53836	87745	95391	1,6
70	52360	85876	85975	1,6
85	45563	79533	78950	1,7
107	40594	76337	80109	1,9

PBS+Lipasa				
Días	Mn (Da)	Mw (Da)	MP (Da)	PD
0	52794	95562	100790	1,8
14	56122	92389	95587	1,6
34	47622	81113	83726	1,7
57	45130	76332	70213	1,7
70	47380	80018	83726	1,7
85	33243	72822	85975	2,2
107	33000	49500	54313	1,5

Lixiviado de sales

PBS				
Días	Mn (Da)	Mw (Da)	MP (Da)	PD
0	53336	95375	96436	1,8
14	56594	96334	97790	1,7
34	50485	93597	94734	1,7
70	44489	90688	97859	2,2
85	46646	85274	89463	1,8
107	45304	87284	89278	1,9

PBS+Lipasa				
Días	Mn (Da)	Mw (Da)	MP (Da)	PD
0	53336	95375	96436	1,8
14	50431	95774	97291	1,9
57	36894	83763	96884	2,3
70	46236	87722	89463	1,9
85	46305	82678	90543	1,9
107	45505	85678	93513	1,9

Apéndice 4 - Separación de fases líquido – líquido

Cuando la temperatura de cristalización del solvente es mucho más baja que la temperatura de separación de fases, ocurre una separación de fase líquido-líquido. La Fig. A4.1 representa esquemáticamente un diagrama de fase para el sistema binario polímero-solvente. En esta figura la temperatura se grafica en función de la concentración del polímero en la solución. A altas temperaturas se tiene un sistema homogéneo. A bajas temperaturas tiene lugar una separación en una fase rica en polímero y otra pobre en polímero. Este sistema se caracteriza por tener una temperatura de punto crítico alta.

El límite de la separación líquido-líquido se lo llama habitualmente curva binodal, pero para polímeros polidispersos se usa el término "curva de punto nube". Usualmente, la región bifásica esta subdividida en una región de separación espinodal y dos regiones de nucleación y crecimiento entre las curvas espinodal y binodal.

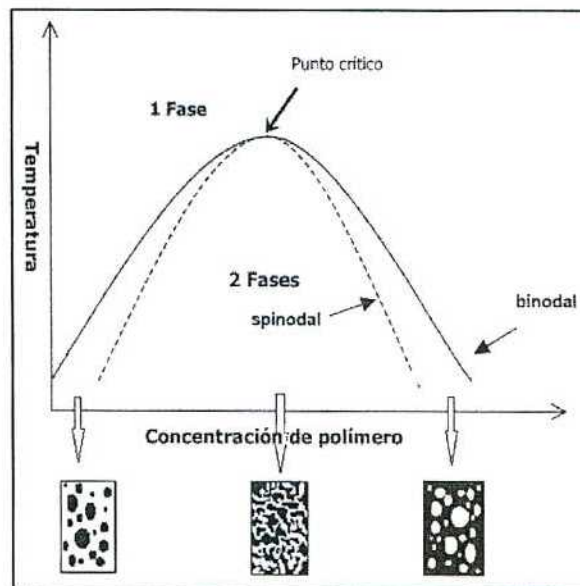


Fig. A4.1 Representación esquemática del diagrama de fases binario de una solución de polímero donde se ilustra la región de separación líquido-líquido. Se indican las posibles estructuras formadas en cada parte de la curva por: nucleación y crecimiento de la fase rica en polímero (izq. del diagrama), descomposición espinodal (al centro) y nucleación y crecimiento en una región pobre en polímero (der. del diagrama).

Dependiendo de la concentración del polímero en la solución, la separación líquido-líquido procederá de acuerdo a diferentes mecanismos.

La separación líquido-líquido ocurre por nucleación y crecimiento de gotas de una fase pobre en concentración del polímero cuando la concentración original de la solución es mayor a la del punto crítico. Resulta entonces, una matriz de polímero con gotas del solvente ocluido. En el caso de soluciones con una concentración menor a la del punto crítico se forman gotas ricas en polímero y así estas pueden crecer por la presencia de un gradiente de concentración hacia las mismas. Se obtienen partículas separadas del polímero como polvo.

Las soluciones enfriadas en la región delimitada por la curva espinodal son inestables. La fluctuación de la composición resulta en una disminución de la energía libre y dispara una onda de fluctuación a través de la solución. Se desarrollan fluctuaciones de la concentración de diferentes longitudes de onda y amplitud. La amplitud de las fluctuaciones disminuye porque las moléculas de ambos componentes se mueven de una región de baja concentración hacia otra de alta concentración. Cuando la fracción de la fase minoritaria es lo suficientemente alta la descomposición espinodal ocurre a través de la formación de una estructura bicontinua. Así la fase rica en concentración y pobre en concentración del polímero resulta completamente interconectada. Como se puede observar en la figura el área espinodal puede alcanzarse solo a través del punto crítico del sistema. En cualquier otro caso se debe atravesar primero una región metaestable. Una alta velocidad de enfriamiento se puede aplicar para evitar la separación en el área metaestable.

Referencias

1. van de Witte P, Dijkstra PJ, van den Berg JWA, Feijen J. Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science* 1996; 117,1-31.
2. Chen VJ, Ma PX. *Polymer Phase Separation* Cap. 9. Scaffolding in Tissue Engineering. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006.
3. Nam YS, Park TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Material Research* 1999; 47, 1 8-17.

Apéndice 5-Protocolo para Ensayo de Adhesión de queratinocitos in vitro

El protocolo de ensayo consistió en pasos que deben realizarse el día anterior o el mismo día del experimento según se indique

a. Bloqueo de pocillos y de los sustratos con BSA desnaturalizada

Desnaturalizar la BSA en baño térmico a 85°C hasta que la solución comience a tornarse opaca (no lechosa). Dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 0,5 ml de BSA desnaturalizada/pocillo de la placa e incubar durante 1h a 37°C. Lavar con PBS y usar inmediatamente o guardar a 4°C para usar el siguiente día. Bloquear un disco del sustrato con BSA desnaturalizada del mismo modo. Lavar con PBS.

b. Cubrimiento de pocillos y de los sustratos con fibronectina (el mismo día del experimento)

Disolver el stock de FN a 10 µg/ml en PBS. Agregar 200 µl por pocillo e incubar 1 h a 37°C. Lavar con PBS y usar. Cubrir un disco con 300 µl de FN, incubar 1 h a 37°C. Lavar con PBS.

c. Preparación de los pocillos con los sustrato (el mismo día del experimento)

Agregar los discos de matriz (a) no tratado, o tratados con (b) BSA (control negativo) y (c) FN (control positivo) en pocillos bloqueados con BSA a los pocillos de la placa multipocillos. La Fig. A5.1 muestra la disposición esquemática de los sustratos en los pocillos de la placa. Se siembran las células tal como se detalla a continuación.

		Pocillos bloqueados con BSA			
Pocillos con 20.000 células →	BSA	FN	Sustrato (a)	Sustrato (b)	Sustrato (c)

Fig. A5.1. Esquema de disposición de los sustratos en la placa multipocillos.

d. Preparación de las células y análisis (el día del experimento)

Utilizar una cápsula de 60 mm con queratinocitos en estado de subconfluencia.

Lavar con PBS y agregar tripsina/EDTA (0.5 ml), incubar hasta visualizar células en suspensión. Agregar inhibidor de tripsina en PBS (25 μ l de stock 10 mg/ml) e incubar a 37°C por 2 min aproximadamente. Diluir con PBS y resuspender las células. Ponerlas en un tubo de 15 ml y centrifugar. Resuspender el pellet en medio sin suero. Contar en cámara de Neubauer. Sembrar 20.000 células/pocillo. Incubar 40 min. a 37°C. Lavar con PBS hasta que no queden células en el pocillo del control negativo. Fijar con 4% paraformaldehído y 4% sacarosa en PBS, a temperatura ambiente. Teñir con DAPI (250 mg/ml) 1 a 3 min. a temperatura ambiente. Retirar los sustratos de los pocillos y pasarlas a pocillos nuevos, con PBS (500 μ l/pocillo).

Fotografiar varios campos en microscopio de fluorescencia invertido a 20x (verificar la presencia de células en múltiples planos en las matrices variando el foco en el eje z). Cuantificar el número de núcleos/células/campo empleando ImageJ®. Se fotografiaron y cuantificaron 10 campos para cada una de las condiciones ensayadas.

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
CENTRO DE INFORMACION CAC