

Construcción y Caracterización Físico-Biológica de un Andamio de Alcohol Poli Vinílico

Resumen— Utilizando la técnica de (congelamiento/descongelamiento) se prepararon andamios de alcohol polivinílico de 7% y 9% de concentración, donde las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de los andamios se evaluaron por medio de diferentes experimentos: grado de hinchamiento, módulo de Young, ósmosis y permeabilidad de la membrana, posteriormente se realizaron pruebas en un modelo vivo. Los resultados indican que los andamios de menor concentración presentan mejores propiedades biológicas pero menor módulo de elasticidad a comparación de los que son de mayor concentración, dichas características permiten clasificar a los andamios para diversas aplicaciones en la ingeniería celular y para pruebas en modelos in vivo.

Palabras Clave: Alcohol polivinílico, criogel, andamio

I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se ha estudiado una nueva clase de materiales denominados hidrogeles, los cuales son redes poliméricas tridimensionales capaces de adsorber líquidos [1]. Esta característica, junto con su biocompatibilidad, permeabilidad y bajo coeficiente de fricción los ha hecho aptos para ser usados en aplicaciones médicas como encapsulamiento de tejidos o células [5].

Las características de alcohol polivinílico (PVA) como son su concentración, temperatura y los ciclos de C/D determinan las propiedades mecánicas y dependiendo de la aplicación médica que se desee dar, dichas propiedades deben ser controladas.

Es por esto que en los años 90 comenzó la relación de ciertos polímeros involucrados en la práctica clínica, en la mayoría de los estudios realizados se dedicaron a caracterizar los hidrogeles de PVA a partir de mezclas con otros polímeros donde se obtenían diferentes propiedades elásticas, térmicas, capacidad de difusión y evaluar la biocompatibilidad de estos dentro de mamíferos.

En este trabajo se pretenden adaptar al máximo las características para que los hidrogeles creados de PVA sean ideales y funcionen como andamios celulares con un módulo de elasticidad ideal para la sobrevivencia y diferenciación de

un cultivo celular, que sea lo suficientemente permeables para el intercambio de sustancias, que se logre un equilibrio osmótico en la menor cantidad de tiempo y que sean lo más inertes posibles al ser implantados en un modelo vivo.

II. METODOLOGÍA

En este trabajo se usó alcohol polivinílico de peso molecular 85,000-124,000, grado de hidrólisis 99% (SigmaAldrich). Para preparar el gel de PVA se utilizó concentraciones de 7% y 9% en peso de PVA y agua desionizada de grado Mili-Q, se mantuvo en agitación continua a 88 °C durante 60 minutos. Posteriormente, el gel de PVA se sometió a congelamiento de -80°C durante 20 minutos y descongelamiento a temperatura ambiente durante 45 minutos, repitiendo este proceso hasta completar 4 ciclos de C/D. Las capsulas obtenidas de PVA, se sometieron a diferentes pruebas físicas para encontrar su módulo de elasticidad y capacidad de hinchamiento. Asimismo se hizo la caracterización biológica con pruebas de osmosis y permeabilidad de la membrana. Con un protocolo especial se realizó el implante en un conejo.

III. RESULTADOS

Se obtuvieron andamios de PVA en forma de cápsulas Fig. 1 y 2 con una Longitud = 10.5 mm y Diámetro = 5.5 mm con con diferente densidad de entrecruzamiento.



Fig. 1. $C_1 = 7\%$, $\rho = 1.10 \text{ g/cm}^3 \pm 0.44$



Fig. 2. $C_2 = 9\%$, $\rho = 1.19 \text{ g/cm}^3 \pm 0.42$

Se realizó un ensayo para determinar el módulo de elasticidad de las capsulas de PVA en sus dos concentraciones, de esta manera se indica el grado de rigidez que adquieren los andamios; en la tabla 1 se encuentran los valores promedio del módulo de Young para estas concentraciones. Posteriormente se obtuvo el grafico (Fig. 3) para el modulo de Young de los andamios de 7% y 9% de concentracion para comparar sus diferencias.

Tabla 1. Resultados del Módulo de Young

Andamio de PVA	Módulo de Young (kPa)
Longitud: 10.5mm 7%	380.90±23.10
Longitud: 10.5mm 9%	518.89±23.94

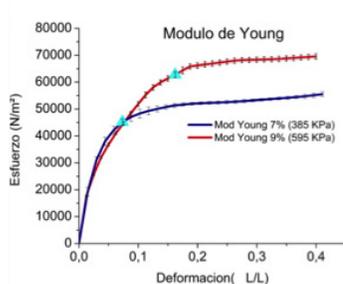


Fig. 3. Medición para 5 cápsulas de PVA (7% y 9%).

Se dejaron deshidratar las capsulas durante 12 horas a temperatura ambiente hasta que presentaron un peso mínimo constante de 56mg±0.12 para la concentración de 7% y 42mg±0.11 para el 9%, posteriormente fueron inmersas en agua des ionizada durante un tiempo de 198 horas hasta lograr un peso máximo constante, posteriormente se hizo el cálculo promedio del grado de hinchamiento de estas capsulas, en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2. Porcentaje del grado de hinchamientos adquiridos por los andamios de 7% y 9%

Andamio de PVA	% de Hinchamiento
Longitud: 10.5mm 7%	193%±7.1
Longitud: 10.5mm 9%	181%±6.8

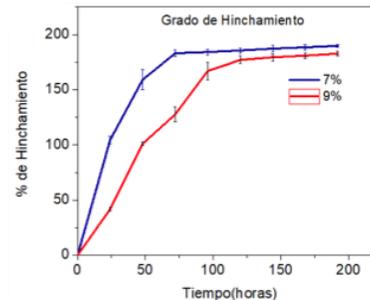


Fig. 4. Se compara las diferencias del grado de hinchamiento que adquieren las cápsulas en diferentes tiempos para recuperar su capacidad original.

La osmosis desplaza el agua a través de una membrana permeable desde un sitio de alta concentración de solutos hacia otro de baja concentración, para así igualar concentraciones en ambos lados, de esta manera se observó el tiempo de llegada al equilibrio osmótico en los diferentes andamios realizados (7% y 9%), se llevó a cabo a una temperatura de 23°C y una presión osmótica de 29.1atm (Fig. 5).

El mecanismo mediante el cual un solvente entra en la membrana permeable depende de la polaridad de este y de su tamaño molecular, en este experimento se observó el grado de permeabilidad de los andamios de 7% (Fig. 6) y 9% (Fig. 7) de concentración al ser sumergidos en diferentes solventes polares y no polares observando la liberación de los pigmentos rojos de la planta beta vulgaris denominados betacianinas.

IV. DISCUSIÓN

Cuando la solución del PVA con agua se calienta en un rango de temperatura entre 80-88°C durante 40 minutos ocurre el proceso de gelificación de PVA. Cabe mencionar que este gel no se encuentra en estado sólido por lo que posteriormente este se sometió a cuatro ciclos de congelación (-80°C)/descongelación en temperatura ambiente (23°C) para obtener el hidrogel, el entrecruzamiento es un enlace que une una cadena de polímero a otra, pueden ser enlaces iónicos o covalentes en estas etapas es fundamental el tiempo, el número de ciclos de c/d y el porcentaje de concentración de PVA ya que de ellos dependen las características físicas y mecánicas que adquieren los andamios. El entrecruzamiento se mide a menudo mediante experimentos de hinchamiento, los hidrogeles se colocan a una temperatura específica y se mide el cambio de masa o el cambio de volumen.

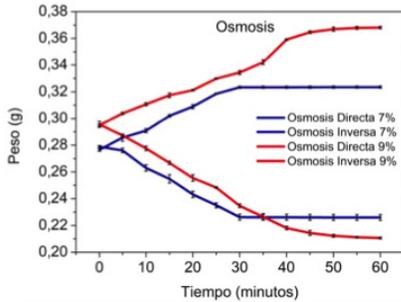


Fig. 5. Medición del peso para 4 cápsulas de PVA (7% y 9%) para observar el tiempo al que se llega al equilibrio osmótico.

De esta manera la red polimérica y el grado de entrecruzamiento aumenta cuando hay más ciclos c/d y mayor concentración ya que hay mayor número de cadenas poliméricas donde se fortalecen los enlaces que se habían formado en los ciclos anteriores y favorece la creación de nuevos enlaces en distintos puntos de las cadenas y con esto aumenta la densidad de reticulación que mejora las propiedades mecánicas de los andamios [6]. Lo anterior puede explicar el comportamiento de los andamios de 7% y 9% con 4 c/d mostrados en esta investigación, donde a mayor concentración se observaron dife-

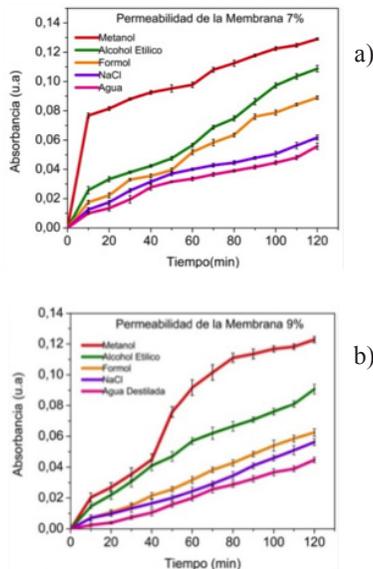


Fig. 6. Cápsulas de PVA 7% (a) y 9% (b) en su interior hay 80µL de una mezcla de betacianinas obtenidas de la planta beta vulgaris. Diferencia de permeabilidad frente a varios solventes.

rentes propiedades de elasticidad, hinchamiento y permeabilidad debido a una mayor densidad de reticulación que alberga menos cantidad de agua.

El modulo elástico del material es proporcional a la densidad de entrecruzamiento de los andamios, tal como se observa en la Fig. 3. En el ensayo se observa que los andamios de 9% de concentración tiene un módulo de Young mayor en relación al 7% de concentración, esto se debe a que hay un mayor número de cadenas y de enlaces formados durante la reticulación que hacen que los andamios adquieran propiedades elastoméricas debido a su comportamiento elástico y altas resistencias ya que en la figura no se alcanzó el punto de ruptura del material. En diversas investigaciones se ha mencionado que un mayor grado de rigidez es una función ideal para la diferenciación celular, ya que se ha comprobado que de esta característica depende el tipo de línea celular a diferenciar, ya que módulos más rígidos diferencian células osteogénicas mientras que módulos más suaves neurogénicas o miogénicas [4]. El porcentaje del grado de hinchamiento fue el promedio de cuatro capsulas que fueron sumergidas en agua durante 198 horas, este porcentaje se incrementa con el tiempo hasta obtener un valor máximo, es decir, un hinchamiento máximo como se observa en la Fig. 4 en este los andamios de 7% tienen un grado de hinchamiento mayor a comparación de los andamios del 9% de concentración, esto se debe a que los andamios de menor concentración tienen menor cantidad de cadenas poliméricas y con ello presentan menor densidad de reticulación por lo que pueden albergar mayor cantidad de agua en los poros generados entre cada entrecruzamiento, lo cual en los andamios de mayor concentración sucede un fenómeno contrario debido a una mayor densidad de reticulación hay mayor cantidad de poros y de menor tamaño generados entre cada entrecruzamiento lo cual deja menos cantidad de agua porque hay menos espacio disponible para el hinchamiento de los andamios. En la fig 6. Se observa el tiempo en el que le tomo a los diferentes andamios lograr el equilibrio osmótico, esta prueba se realizó a cinco andamios de 7% con un peso de $55\text{mg} \pm 0.12$ mientras que los de 9% $43\text{mg} \pm 0.11$ de acuerdo a la concentración donde se obtuvieron resultados muy parecidos. Para el caso de los andamios al 7% el equilibrio osmótico tanto directo como indirecto se llegó al paso de 30 minutos aproximadamente mientras que para los andamios al 9% se logró en 50 minutos, es decir los andamios de 9% tienen menor cantidad de agua lo cual la salida de esta es en menor cantidad y con ello mayor tiempo para lograr el equilibrio osmótico.

En la Fig. 7 y Fig. 8 se muestran los resultados de la afinidad de diferentes solventes (Metanol, Alcohol Etilico, Formol, NaCl y Agua Destilada) ante una mezcla de betacianinas donde se observa que la penetración de los solventes en los andamios depende directamente de la polaridad y de su tamaño molecular, ya que aquellos solventes o compuestos no polares pueden ingresar a las membranas con mayor facilidad y más rápido que aquellos compuestos polares [3].

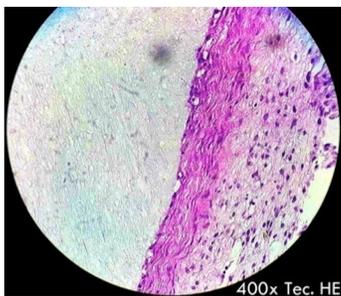


Fig. 7. Cápsula de PVA 7% colocada en peritoneo a un mes de la cirugía de implante.

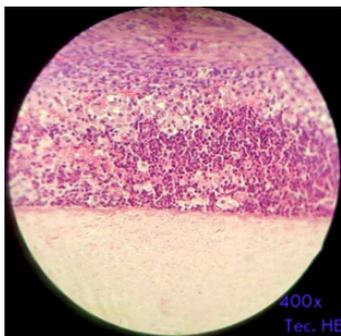


Fig. 8. Cápsula de PVA 7% después de 8 semanas de la implantación en peritoneo.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agraden al HGMDL por el apoyo con insumos (DI/14/204/4/057) y Conacyt (N° 206574).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jiménez Vázquez, J. (2016). *Síntesis de nanofibras por electrospinning aplicada en ingeniería de tejidos de piel*.
- [2] Colombo P. Et al. 1985. *A surface crosslinking of compressed polymeric mini matrices for drug release control*. Journal of Controlled Release, 1: 283-289.
- [3] Blalock JE, Harbour-McMenamin D, Smith EM. *Peptide hormones shared by the neuro endocrine and immunologic systems*. 1985; 135: 858s-861s
- [4] Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*. Biophys J 2000;79:144e52.
- [5] Callister, Jr., William D (2005), *Fundamentals of Materials Science and Engineering* (2ª edición), United States of America: John Wiley & Sons, p. 199, ISBN 9780471470144.
- [6] Yoshii, F.; Makuuchi, K.; Darwis, D.; Iriawan, T.; Razzak, M. T. and Rosiak, J. M. (1995). "Heat resistance poly(vinyl alcohol) hydrogel". Radiation Physics and Chemistry, vol. 46, pp. 169-174.
- [7] Radisic, M. V., & Linares, L. (2016) *Solid Organ Transplantation. In Transplant Infections* (pp. 795-820). Springer International Publishing.

V. CONCLUSIÓN

- Las propiedades mecánicas y el % de hinchamiento están determinadas por la concentración de PVA y los ciclos de c/d en la que son realizados.
- Los andamios de 9% tienen mayor módulo de elasticidad
- El PVA permite la difusión de soluciones del medio exterior al interior y viceversa.
- Los andamios son biocompatibles y no son degradados al ser inmersos dentro de un modelo vivo al lapso de 1 mes.