

**Tesista:** Florencia Montini Ballarin  
Ingeniera en Materiales, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata

**Título al que aspira:** Doctor en Ciencia de Materiales, UNMdP

**Tema:** “Estructuras poliméricas nanofibrasas biorreabsorbibles para ingeniería de tejidos vasculares”

**Director de tesis:** Dr. Gustavo A. Abraham

**Co-director:** Dra. Patricia M. Frontini

**Lugar de Trabajo:** Facultad de Ingeniería, UNMdP

**Fecha de Defensa:** 6 de marzo de 2015

**Jurados:** Dra. Marta Rosen (UBA)  
Dr. Edmundo I. Cabrera Fischer (Universidad Favaloro)  
M.Sc. María Marta Reboledo (Fac. Ingeniería, UNMdP)

## Resumen

En los últimos 60 años, el empleo de injertos sintéticos de Dacron® y ePTFE ha sido la única alternativa a los injertos autólogos y homólogos. Sin embargo, ninguno de estos injertos ofrece potencial de regeneración, y más aún, todos están asociados con diferentes niveles de trombogenicidad, estenosis y susceptibilidad a infecciones. La obtención de un injerto vascular de pequeño diámetro (< 6 mm) con un comportamiento apropiado y permanente aún representa un gran desafío. El desarrollo de un conducto para operaciones de *bypass* coronario que se encuentre inmediatamente disponible para su uso, sin tiempos prolongados de cultivos *in vitro*, y con las propiedades mecánicas y biológicas necesarias, es el principal desafío de las investigaciones actuales en el campo de la ingeniería de tejidos vasculares.

El injerto vascular ideal debe cumplir numerosos atributos: biocompatibilidad, no trombogenicidad, no toxicidad, *compliance* mecánica, resistencia a la hiperplasia neointimal, resistencia a la infección, facilidad para sutura, flexibilidad y elasticidad sin colapso por retorcimiento, facilidad de fabricación, características de manejo adecuadas para la implantación quirúrgica, disponibilidad en diversos tamaños y longitudes, capacidad para liberar localmente agentes terapéuticos, no inducción de malignidades, funciones biológicas y potencial de regeneración de tejidos. Con este panorama, la técnica de electrohilado constituye una tecnología ideal para diseñar injertos vasculares. Esta tesis estudia en profundidad la tecnología de electrohilado para la obtención de injertos vasculares bicapa de pequeño diámetro con un comportamiento biomimético.

El *primer capítulo* presenta una introducción general sobre la ingeniería de tejidos, las afecciones coronarias y los tratamientos actuales, la historia de la ingeniería de tejidos vasculares, y las técnicas de obtención de matrices porosas. El *capítulo 2* detalla los avances recientes en el desarrollo de injertos vasculares

mediante la técnica de electrohilado y presenta el trabajo experimental llevado a cabo para la producción de matrices electrohiladas e injertos vasculares por dicha técnica. Este capítulo está centrado en la fabricación de las matrices nanofibrosas y en la optimización de los parámetros del procesamiento para obtener estructuras reproducibles con morfología de fibras uniformes. Se utilizan dos polímeros biorreabsorbibles, poli(L-ácido láctico) y poli(éster uretano) segmentado sintetizado por nuestro grupo. Se producen injertos vasculares nanofibrosos monocapa y bicapa a partir de los polímeros puros y sus mezclas.

Los *capítulos 3, 4 y 5*, abarcan la caracterización de los diferentes injertos producidos a través de tres aspectos fundamentales para la ingeniería de tejidos. El *capítulo 3* estudia la caracterización térmica, físico-química y propiedades de superficie de los injertos y cómo las diferentes composiciones afectan estas propiedades. Se estudia también el comportamiento degradativo hidrolítico de los materiales poliméricos electrohilados empleados en el *capítulo 2*. En el *capítulo 4*, se realiza una caracterización mecánica completa de los injertos vasculares monocapa y bicapa mediante ensayos de tracción uniaxial, ensayos de sutura, ensayos de *compliance* dinámica, y ensayos de presión de reventado. El aspecto biológico es abordado en el *capítulo 5*, donde se analiza el efecto de diferentes estímulos (químicos, topográficos, mecánicos) en la proliferación celular. También, se estudia la citotoxicidad de las matrices electrohiladas *in vitro* mediante ensayos MTT de proliferación de células madre mesenquimales.

El *capítulo 6* presenta una primera aproximación del modelado mecánico, aplicando un modelo sencillo para observar la influencia de la composición y cantidad de las capas del injerto y sus dimensiones (espesor y diámetro interno) en la respuesta del mismo a presión interna.

El *capítulo 7* resume los resultados de esta tesis, presentando las conclusiones obtenidas y un panorama de los aspectos a explorar en el futuro para mejorar y optimizar los injertos vasculares de pequeño diámetro desarrollados.

Los estudios efectuados permitieron la obtención de injertos vasculares bicapa nanofibrosos mediante el electrohilado secuencial de soluciones de mezclas poliméricas. En general, las estructuras tubulares bicapa preparadas presentaron: a) un comportamiento mecánico que imita la respuesta frente a regímenes de presión pulsátil de arterias coronarias y los vasos sanguíneos utilizados para su reemplazo; b) una velocidad de degradación hidrolítica equivalente para sus dos capas y con un tiempo de degradación coincidente con el tiempo de regeneración del tejido *in vitro*; c) una biocompatibilidad aceptable, demostrada por la proliferación de células madre mesenquimales, con valores superiores al control positivo para la capa externa. Todas estas cualidades son altamente deseadas para el diseño de una matriz polimérica para ingeniería de tejidos vasculares. Por lo tanto, los injertos bicapa electrohilados resultan estructuras con un alto interés para la ingeniería de tejidos vasculares como dispositivos degradables de pequeño diámetro para reemplazo de arterias coronarias. Además, los resultados del modelado indicaron que el agregado de una tercera capa externa más rígida, en conjunto con el incremento del espesor de pared conduce a una mayor distensibilidad. Por otro lado, el modelo es capaz de predecir que un menor diámetro, como el encontrado en arterias coronarias más pequeñas, también presenta propiedades biomiméticas.

## *Abstract*

In the last 60 years, the use of synthetic grafts like Dacron® and ePTFE has been the only alternative to autografts and homografts. However, none of these grafts presents a regeneration potential. Even more, all are associated with different levels of thrombogenicity, stenosis, and infection susceptibility. To these days, the production of a small diameter vascular graft (< 6 mm) with an appropriate and permanent response still presents a challenge. The development of an off-the-shelf conduit, without long *in vitro* culture periods, with proper biological and mechanical properties for coronary bypass surgery is the principal challenge of vascular tissue engineering current studies.

The ideal vascular graft must achieve numerous attributes: biocompatibility, no thrombogenicity, no toxicity, mechanical compliance, resistance to neointimal hyperplasia, resistance to infection, suturability, flexibility and elasticity without twisting collapse, ease of manufacture, proper handling characteristics for surgery implantation, availability in different sizes and length, capacity of locally therapeutic agents release, no induction of malignancies, biological functions and potential tissue regeneration. Within this overview, the electrospinning technique constitutes an ideal technology for vascular grafts design. This thesis deeply studies the electrospinning technique for the production of bilayered small-diameter vascular grafts with a biomimetic behavior.

The *first chapter* presents a general introduction to tissue engineering, coronary diseases and its current treatments, the history of vascular tissue engineering, and scaffolds production techniques. *Chapter 2* reviews recent advances in vascular grafts development by the electrospinning technique and presents the experimental work done in the production of electrospun scaffolds and vascular grafts by this technique. This chapter is focused on nanofibrous scaffold production and the optimization of the processing parameters in order to obtain reproducible structures with bead-free uniform nanofibers. Two bioreabsorbable polymers are used, poly(L-lactic acid) and segmented poly(ester urethane) synthesized by our group. Monolayered and bilayered nanofibrous vascular grafts are produced from the polymers and its blends.

*Chapters 3, 4 and 5* focus on the different grafts characterization through three fundamental aspects for tissue engineering. *Chapter 3* studies the grafts thermal, physico-chemical and surface properties and how the different compositions affect them. The hydrolytic degradation behavior of the electrospun polymeric materials used in *chapter 2* is also studied. In *chapter 4*, a complete mechanical characterization of the monolayered and bilayered vascular grafts is made by uniaxial tension, suture, dynamical compliance and burst pressure tests. The biological aspect is boarded in *chapter 5*, where the effect of different stimulus (chemical, topographic, mechanical) in cell proliferation is analyzed. The cytotoxicity of the electrospun scaffolds is studied by studying mesenchymal stem cells proliferation by *in vitro* MTT tests.

*Chapter 6* presents a first approach of mechanical modeling, by applying a simple model to observe the graft dimensions (thickness and internal diameter), composition and number of layers influence in its response to internal pressure.

*Chapter 7* resumes the main results of this thesis, presenting the final conclusions and an outlook of the aspects to explore in the future, in order to improve and optimize the small-diameter vascular grafts developed.

The performed studies allowed the fabrication of bilayered nanofibrous vascular grafts by sequential electrospinning of polymeric blend solutions. In general, the obtained bilayered tubular structures presented: a) a mechanical behavior that mimics the response to pulsatile pressure regimes of coronary arteries and vessels used for its replacement; b) an equivalent hydrolytic degradation rate for both of the grafts layers with a degradation time in agreement with the *in vitro* tissue regeneration time; c) an acceptable biocompatibility, as proved by mesenchymal stem cells proliferation, with higher values respect to the positive control for the external layer. All these qualities are highly desired for vascular tissue engineering scaffold production. Hence, the electrospun bilayered grafts are structures with a deep interest for vascular tissue engineering as small-diameter degradable devices for coronary arteries replacement. Moreover, the modeling results showed that the incorporation of a third layer with higher stiffness, along with a thickness increase leads to a higher compliance. On the other hand, it is foreseen that a smaller diameter, as found in smaller coronary arteries, also presents biomimetic properties.