

Tesista: Matthäus Davi Popov Pereira da Cunha

Título al que aspira: Doctor en Ciencia de Materiales, UNMDP

Tema: "Sistemas Poliméricos Basados en Proteína de Soja para Ingeniería de Tejidos "

Director de tesis: Dr. Gustavo A. Abraham

Lugar de Trabajo: División Polímeros Biomédicos, INTEMA (UNMDP-CONICET)

Fecha de Defensa: 2 de junio de 2023

Jurados:

Dra. Tamara Oberti (INIFTA, UNLP/CONICET)

Dra. Nancy Salvatierra (IIBYT/CONICET)

Dra. Guadalupe Rivero. (CDS, INTEMA/UNMDP-CONICET)

Resumen

En los últimos años, la ciencia e ingeniería de biomateriales, con el enfoque de obtener matrices que mimetizan la estructura de la matriz extracelular para la ingeniería de tejidos, ha avanzado en el desarrollo de estructuras a niveles micro- y/o nanométricos. El electrohilado es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de matrices micro-y/o nanofibras que presentan propiedades topográficas de gran interés, como: estructura con porosa con poros interconectados, gran área superficial y alta relación entre el largo y el diámetro de las fibras; que favorecen la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular. Dependiendo de la morfología, porosidad y composición de las matrices, es posible modular la interacción entre las células y la interfaz e inducir la regeneración o formación de un tejido.

En el Capítulo 1, se introduce el trabajo en general y se definen el objetivo general, los objetivos específicos y la hipótesis de esta tesis doctoral.

En el Capítulo 2, se definen los biomateriales y la ingeniería de tejidos. Se presentan las técnicas de obtención de matrices porosas utilizadas cuando se busca la regeneración de tejidos y órganos; entre ellas, se describe la técnica de electrohilado que fue usada para el desarrollo de esta tesis. Además, se describe la proteína de soja, biopolímero foco de este trabajo, y sus propiedades.

En el Capítulo 3, se describen todos los avances publicados hasta la fecha de matrices electrohiladas basadas en proteína aislada de soja (SPI) que luego sirvieron como base para la obtención de las matrices propuestas por este trabajo. Las primeras pruebas se llevaron a cabo con soluciones alcalinas de hidróxido de sodio (NaOH) que luego fueron sustituidas por soluciones en ácido acético. Las soluciones se caracterizaron en cuanto a sus propiedades intrínsecas para determinar la influencia de la composición polimérica en su electrohilabilidad. De esta manera, las matrices obtenidas fueron caracterizadas por SEM, FTIR, DSC y TGA; a partir de las micrografías SEM se observó la microestructura fibrosa, se calcularon los diámetros de fibras y se determinó la influencia de algunos parámetros de procesamiento en la morfología de las fibras. También se estudió la

influencia de la humedad relativa (HR) en la obtención de las fibras electrohiladas. Por último, debido a la extensión de tiempo que requiere el procesamiento de las soluciones y pequeño espesor obtenido en las matrices, se propuso el sistema bicapa para mejorar la manipulación de las membranas, por lo que la capa inferior se preparó con policaprolactona (PCL) nanofibrosa.

En el Capítulo 4, se proponen diferentes sistemas de entrecruzamiento de las cadenas de SPI, para evitar la disolución de las matrices desarrolladas. Se emplearon tripolifosfato de sodio (STPP) y trimetafosfato de sodio (STMP) como entrecruzantes físicos. Estos sistemas indujeron una gran cantidad de defectos en las fibras electrohiladas y no mejoraron la estabilidad en medio acuoso. Luego, se propusieron dos entrecruzamientos químicos de la SPI, una modificación química para obtener una proteína fotoentrecruzable (SPIMA) y el uso de sacarosa oxidada (SO) como entrecruzante químico. Se describen los procesos de modificación química de la SPI y de la oxidación de la sacarosa y sus respectivas optimizaciones. Las matrices basadas en SPIMA y entrecruzadas presentaron una mejor su estabilidad en medio acuoso, pero no lo suficiente para la aplicación en ingeniería de tejidos. Por otro lado, el entrecruzamiento de las cadenas de SPI con SO aumentó la estabilidad en medio acuoso y fue el método elegido para continuar los estudios de la tesis.

En el Capítulo 5, se presentan sistemas nanofibrosos diseñados con membranas con fibras orientadas al azar y alineadas a partir del electrohilado coaxial. Para el núcleo se empleó PCL, mientras que la coraza se utilizó SPI, PEO y SO. Las propiedades de las fibras fueron caracterizadas por SEM, FTIR, DSC y TGA. Además, se caracterizaron las membranas por TEM, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal para verificar si existía de la configuración núcleo/coraza. Aunque los resultados de los estudios realizados proporcionaron algunos indicios de la presencia de SPI-SO sobre la superficie, no fueron conclusivos en la determinación de una estructura núcleo-coraza.

En el Capítulo 6, se propone el uso de la radiación ultravioleta germicida (UVC – 254 nm) para la esterilización de las membranas electrohiladas. Posteriormente, se estudia el efecto de la radiación sobre las matrices. No se observaron cambios morfológicos a partir de las micrografías SEM, pero se produjo un aumento de la hidrofiliidad de la capa de SPI-OS dependiente del tiempo de exposición a la radiación. Por otro lado, la capa de PCL no presentó cambios en la hidrofiliidad, pero sí una reducción del tamaño de cadena y un aumento de la cristalinidad. Por último, el ensayo de validación de esterilidad confirmó que la exposición de 10 minutos a la luz UV fue suficiente para garantizar la esterilidad del material.

En el Capítulo 7, se presentan los resultados de los estudios *in vitro* realizados con las membranas obtenidas por electrohilado coaxial y uniaxial. Los resultados fueron compatibles con una alta viabilidad celular y que los fibroblastos dérmicos humanos presentaron morfología citotípica sobre las membranas, lo que indica una buena adhesión celular. Además, se observó el efecto de la topografía en las membranas con fibras alineadas, sobre las cuales las células se alinearon preferentemente en la dirección de las fibras. Por último, en el Capítulo 8, se presentan las conclusiones más importantes de esta tesis y algunas propuestas de trabajos futuros, necesarios para seguir el desarrollo de un potencial producto.

Abstract

In recent years, the science and engineering of biomaterials, with a focus on obtaining matrices that mimic the structure of the extracellular matrix for tissue engineering, has advanced in the development of structures at micro- and/or nanometric levels. Electrospinning is a widely used technique for obtaining micro- and/or nanofibrous matrices that exhibit topographical properties of great interest, such as interconnected porous structure, high surface area, and high aspect ratio of fibers, which promote cell adhesion, proliferation, and differentiation. Depending on the morphology, porosity, and composition of the matrices, it is possible to modulate the interaction between cells and the interface and induce tissue regeneration or formation.

Chapter 1 introduces the general work and defines the overall objective, specific objectives, and hypothesis of this doctoral thesis.

Chapter 2 defines biomaterials and tissue engineering, presenting different techniques for obtaining porous matrices used when tissue and organ regeneration is desired. Among them, the electrospinning technique is described, and used for the development of this thesis. Additionally, soy protein and its properties are described as the biopolymer used in this work.

Chapter 3 describes all published up-to-date advances of electrospun matrices based on isolated soy protein (ISP) that then served as the basis for the matrices proposed by this work. The first tests were conducted with alkaline solutions of sodium hydroxide (NaOH), which were later replaced by solutions in acetic acid. The solutions were characterized in terms of their intrinsic properties to determine the influence of the polymeric composition on their electrospinnability. In this manner, the obtained matrices were characterized by SEM, FTIR, DSC, and TGA. From the SEM micrographs, the fibrous microstructure was observed, the fiber diameters were calculated, and the influence of some processing parameters on the morphology of the fibers was determined. The influence of relative humidity (RH) on the electrospinning of the fibers was also studied. Finally, due to the time-consuming processing of the solutions and the small thickness obtained in the matrices, a bilayer system was proposed to improve the manipulation of the membranes, and a polycaprolactone (PCL) nanofibrous bottom layer was prepared.

In Chapter 4, different cross-linking systems for the SPI chains are proposed to avoid dissolution of the developed matrices. Sodium tripolyphosphate (STPP) and sodium trimetaphosphate (STMP) were used as physical crosslinkers. These systems induced many defects in the electrospun fibers and did not improve stability in aqueous media. Then, two chemical crosslinking methods of SPI were proposed, a chemical modification to obtain a photo-crosslinkable protein (SPIMA) and the use of oxidized sucrose (SO) as a crosslinker. The processes of chemical modification of SPI and sucrose oxidation and their respective optimizations are described. The crosslinked matrices based on SPIMA exhibited an improved stability in aqueous media, but not enough for application in tissue engineering. On the other hand, crosslinking of SPI chains with SO increased stability in aqueous media and then it was the method chosen for the next studies of this thesis.

In Chapter 5, membranes with randomly oriented and aligned fibers processed using coaxial electrospinning are presented. The core composition is PCL, while the sheath contains SPI, PEO, and SO. The properties of the fibers were characterized by SEM, FTIR, DSC, and TGA. In addition, the membranes were characterized by TEM, fluorescence microscopy, and confocal microscopy to verify if the fibers indeed possess the core/sheath configuration. Although the results indicate that the performed studies evidence the presence of an SPI-SO phase on the surface, they were inconclusive in determining a core/sheath structure.

In Chapter 6, the use of germicidal ultraviolet radiation (UVC - 254 nm) is proposed for the sterilization of electrospun membranes. The effect of radiation on the matrices was then studied. No morphological changes were observed from SEM micrographs, but an increase in the hydrophilicity of the SPI-OS layer was dependent on the exposure time to radiation. On the other hand, the PCL layer did not show changes in hydrophilicity, but a reduction in chain size and an increase in crystallinity were observed. Finally, a sterility validation assay confirmed that exposure to UV light for 10 minutes was sufficient to guarantee material sterilization.

In Chapter 7, the results of *in vitro* studies conducted with membranes obtained by coaxial and uniaxial electrospinning are presented. The results were consistent with high cell viability and human dermal fibroblasts presenting cytotypic morphology on the membranes, indicating good cell adhesion. In addition, the effect of topography on membranes with aligned fibers was observed, with cells preferentially aligning in the direction of the fibers. Lastly, Chapter 8 presents the most relevant conclusions of this thesis and proposals for future work, which would be necessary to continue the development path of a potential product.