

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

**DESARROLLO DE PELÍCULAS POROSAS
REABSORBIBLES PARA INGENIERÍA DE
TEJIDOS ÓSEOS (*)**

Por Ing. Jessica Sueldo

Director

Dra. Élide B. Hermida

**(*) Tesis para optar por el título de Master en Ciencia y Tecnología de los
Materiales**

República Argentina

2016



A mis padres, Lilia y Carlos
Mis hermanos Manuel y Carlos,
Mi pequeña Alina
Mi familia, lo son todo



Agradecimientos

Al Dr. Carlos Arregui y al personal científico del Instituto de investigaciones Biológicas de la Universidad de San Martín, por permitirme realizar allí los ensayos biológicos y por su guía a lo largo de los mismos.

Una muy especial mención a la Dra. Ana González Sánchez Wusener y su inmensa ayuda para todos los ensayos biológicos que se desarrollaron en este trabajo y gran paciencia para enseñarme todo sobre el tratamiento de líneas celulares y sus cuidados.

Un agradecimiento cordial al Doctor Aldo Boccaccini por su asistencia a la introducción del Bioglass y su disponibilidad para responder todas mis dudas.

Quisiera agradecer también a los integrantes del Laboratorio de Materiales Avanzados de la Comisión Nacional de Energía Atómica: al Ing. Claudio Arenas y Dr. Ignacio Ruiz por su predisposición a guiarme en las técnicas del laboratorio. Un agradecimiento especial a mi tutora Dra. Elida Hermida por su acompañamiento a lo largo de este trabajo y su motivación constante para finalizarlo.

No quisiera olvidarme de ninguno de las personas que con su apoyo diario me permitieron desarrollar mi trabajo, al personal administrativo del Instituto Sabato, a los técnicos de la Gerencia Materiales, a los profesores que brindaron todos sus conocimientos y su tiempo en enseñarme todo lo que he aprendido sobre Ciencia y Tecnología de los Materiales.

A mis compañeros de aventura, a los becarios de la maestría que vivieron día a día este proceso y agradecerles, las horas de clases compartidas, las horas de estudio y los ratos de distracción que me brindaron que atesoro para siempre.

Desarrollo de películas porosas reabsorbibles para ingeniería de tejidos óseos.

Resumen

Palabras claves: ingeniería de tejidos, poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), Bioglass, biocompatibilidad, biodegradación, Hidroxiapatita carbonada, citotoxicidad.

La ingeniería de tejidos es una disciplina que combina principios de la ciencia de los materiales y la biología para el desarrollo de dispositivos biomédicos, que tienen la finalidad de sustituir un tejido o un órgano del cuerpo humano. Uno de los campos más explorados por la ingeniería de tejidos es el de la regeneración ósea; esto se produce, entre otros factores, porque los tratamientos médicos convencionales empleados para paliar daños severos de hueso han tenido resultados muy pobres. Para lograr un tratamiento efectivo, un dispositivo diseñado deberá cumplir con varios requerimientos: resistencia mecánica, estructura acorde para la siembra y proliferación celular, fomentar la migración de células desde el organismo y ser biodegradables.

Los materiales elegidos para desarrollar andamios en este trabajo son: poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), 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 y como componente activo se emplearon partículas de Bioglass 45S5 por su bioactividad ya estudiada y detallada.

Durante este trabajo se emplearon dos tipos de métodos de fabricación: tridimensionales y bidimensionales; para desarrollar andamios tridimensionales se usó lixiviado de sales, y para la obtención de películas bidimensionales, evaporación de emulsiones. La caracterización de esos sustratos se realizó mediante ensayos de compresión y de tracción uniaxial, comprobando de esta manera que el compuesto cumple con los requerimientos mecánicos de los huesos naturales. Se realizaron además ensayos morfológicos, en los cuales se midió la porosidad y se ensayó la hidrofiliidad, determinando una estructura acorde para la interacción del andamio con el medio biológico. Finalmente se realizaron ensayos biológicos en los cuales se evaluó la biodegradación del andamio, la formación de hidroxiapatita carbonada, la citotoxicidad tanto directa como indirecta y la adhesión y proliferación celular.

Development of porous films resorbable bone tissue engineering.

Abstract

Keywords: tissue engineering, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB), bioglass, biocompatibility, biodegradation, carbon Hydroxyapatite, cytotoxicity.

Tissue engineering is a discipline that combines Materials Science and Biology for the development of biomedical devices, which are intended to replace a tissue or an organ of the human body. In tissue engineering one of the most explored fields is bone regeneration; this occurs because, among other factors, conventional medical treatments used to alleviate severe damage bone have had very poor results. To achieve an effective treatment, a designed device must accomplish several requirements: suitable mechanical strength, appropriate structure for cell adhesion and proliferation and tailoring biodegradation kinetics.

Materials chosen to develop scaffolds in this work are: poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV), a naturally occurring biopolymer, due to its biocompatibility, biodegradation under physiological conditions and suitable mechanical properties, and Bioglass 45S5, an active component already studied and considered due to its remarkable bioactivity.

During this work, two types of manufacturing methods were used: three-dimensional and two-dimensional, to develop the three-dimensional scaffolds leached salt was employed, and for obtaining two-dimensional films evaporation of emulsions. Once obtained, we proceeded to the characterization them, using uniaxial compression and tensile tests, thus proving that the compound fulfills the mechanical requirements of natural bone. Morphological tests were also held to determine the porosity and the hydrophilicity of the scaffolds; the main result of these tests was that the scaffold has an appropriated structure for the interaction with the biological environment. Finally bioassays were made to evaluate biodegradation, direct and indirect cytotoxicity and cell adhesion and proliferation.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
INGENIERÍA DE TEJIDOS	1
TEJIDO ÓSEO	3
ESTADO ACTUAL DE LA REGENERACIÓN ÓSEA	5
BIOMATERIALES	8
MORFOLOGÍA	11
MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SUSTRATOS POROSOS	13
OBJETIVO DEL TRABAJO	16
EVALUACIÓN DEL SUSTRATO	17
<i>Ensayos mecánicos</i>	17
<i>Ensayos morfológicos</i>	18
<i>Ensayos biológicos</i>	18
2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS	22
MATERIALES	22
PELÍCULAS BIDIMENSIONALES	22
ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES	25
3. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	26
ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAxIAL	26
ENSAYO DE COMPRESIÓN UNIAxIAL	31
4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	36
HIDROFILIDAD	36
MORFOLOGÍA SUPERFICIAL - POROSIDAD	39
5. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	46
BIODEGRADACIÓN	46
<i>Materiales</i>	46
<i>Procedimiento</i>	47
<i>Pérdida de peso</i>	50
<i>Cambios de pH</i>	53
<i>Formación de hidroxiapatita carbonada</i>	55
CITOTOXICIDAD	62
<i>Materiales</i>	62
<i>Citotoxicidad indirecta</i>	62
<i>Citotoxicidad directa</i>	69
ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN	74
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	79
7. APÉNDICE 1	84
LOS POLIHIDROXIALCANOATOS – PHBV	84
HIDROXIAPATITA SINTÉTICA Y BIOLÓGICA	86
BIOGLASS® 45S5	88
8. APÉNDICE 2	93
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE HA	93
9. APÉNDICE 3	95

PUESTA A PUNTO DE LOS ENSAYOS EN VITRO.....	95
<i>Cantidad óptima de células a sembrar.....</i>	<i>95</i>
<i>Optimización del sistema buffer.....</i>	<i>96</i>
10. REFERENCIAS.....	98

1. Introducción y antecedentes

Ingeniería de tejidos

Para introducirnos en el tema a tratar en este trabajo, comenzaremos por presentar los conceptos en los que se basó la investigación. La ingeniería de tejidos es una disciplina que combina principios de la ciencia de los materiales y la biología para el desarrollo de dispositivos biomédicos, que tienen la finalidad de sustituir un tejido o un órgano del cuerpo humano. Es decir, la ingeniería de tejidos busca controlar las características del producto que va a servir de apoyo físico para las células del órgano o tejido dañado, y que propiciará el desarrollo celular para, de esa manera, regenerar el tejido en forma eficaz y con la menor cantidad de efectos secundarios para el paciente.

Actualmente son vastos los campos donde se desarrolla la ingeniería de tejidos; son ampliamente conocidos los trabajos de regeneración ósea, de cartílagos, neuronal y hasta de órganos vitales como corazón, hígado o riñones. El auge que se evidencia en este área de investigación está fundado en dos pilares muy marcados: el primero es el avance tecnológico que ha acompañado a la medicina luego de la Segunda Guerra Mundial, que ha permitido elevar la expectativa de vida de la población con la consecuente aparición y tratamiento de afecciones que anteriormente tenían baja prevalencia: deterioro de la visión, de los huesos, etc. Consecuentemente el desarrollo de materiales que contribuyan a reestablecer las funciones de órganos y tejidos se volvió una necesidad. Por otro lado, el fuerte avance en la ciencia de los materiales, que permitió manipular materiales alternativos, como ser las cerámicas, los metales y los polímeros para desarrollar productos que emulan a las estructuras biológicas y crear así un medio óptimo para la proliferación celular.

La Fig 1.1 muestra un esquema simplificado de la metodología empleada en ingeniería de tejidos, donde se necesita: i) un andamio, con una morfología adecuada para actuar como soporte de las células, ii) un cultivo celular, que en los últimos tiempos suele ser del mismo paciente para disminuir la probabilidad de infección o rechazo y iii) un componente activo, que proporcione señales ya sean químicas o físicas, que propicien la proliferación celular dentro del andamio. Por ejemplo, un andamio biodegradable puede estar diseñado para propiciar la migración de células al área lesionada mientras libera factores de crecimiento al tejido circundante a medida que se degrada.

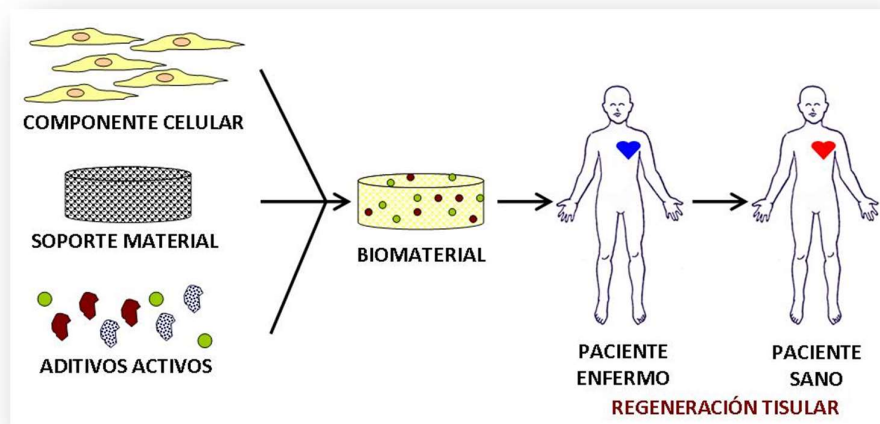


Fig 1.1: Esquema representativo de los pilares empleados en ingeniería de tejidos. Se destacan los componentes para la construcción de dispositivos biomédicos capaces de producir la regeneración tisular.

De esta manera la ingeniería de tejidos se vio impulsada en los últimos años y en la actualidad no sólo se la reconoce como un área relevante dentro de la investigación sino que en el mercado ya se encuentran comercializándose dispositivos biomédicos que basaron su desarrollo en esta disciplina, tal como se ilustra en la Fig. 1.2.

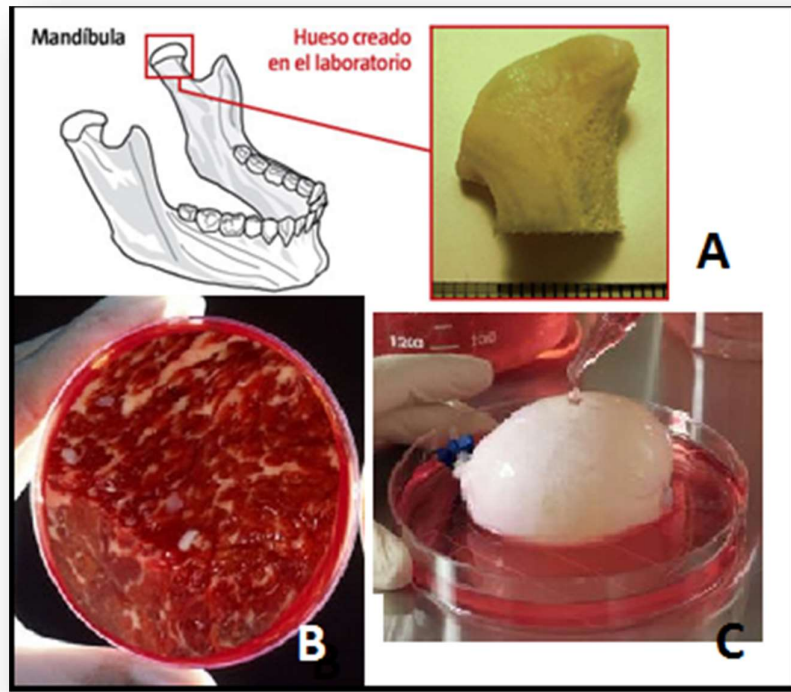


Fig1.2: Dispositivos biomédicos que se comercializan en la actualidad para: A. regeneración ósea de mandíbulas; B. regeneración muscular; C. regeneración de cartílagos.

Tejido óseo

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Está formado por la matriz ósea, que es un material intercelular calcificado, y por células, ilustradas en la Fig 1.3, que se denominan:

- Osteoblastos: encargados de sintetizar y secretar la parte orgánica de la matriz ósea durante su formación. Se ubican siempre en la superficie del tejido óseo

ya que este sólo puede crecer por aposición, esto es, por aparición de capas neoformadas sobre las superficies libres.

- ⌚ Osteocitos: son las células óseas maduras, derivadas de los osteoblastos, son las responsables de la secreción de sustancias para la conservación de la matriz ósea. Las células se ubican en cavidades o lagunas rodeadas por el material intercelular calcificado. La nutrición de los osteocitos depende de canalículos que penetran la matriz ósea y conectan a los osteocitos vecinos entre sí y con canales vasculares que penetran al hueso o que se ubican en las membranas conjuntivas que revisten las superficies del hueso (periostio y endostio). De hecho ningún osteocito se encuentra a más de una fracción de mm de un capilar sanguíneo.
- ⌚ Osteoclastos, células responsables de la reabsorción del tejido óseo, que participan en los procesos de remodelación de los huesos y pueden encontrarse en depresiones superficiales de la matriz ósea llamadas lagunas de Howship.

Cabe señalar que la bibliografía hace referencia también al osteoide, denominación que recibe el conjunto de osteoblasto y matriz ósea no calcificada.

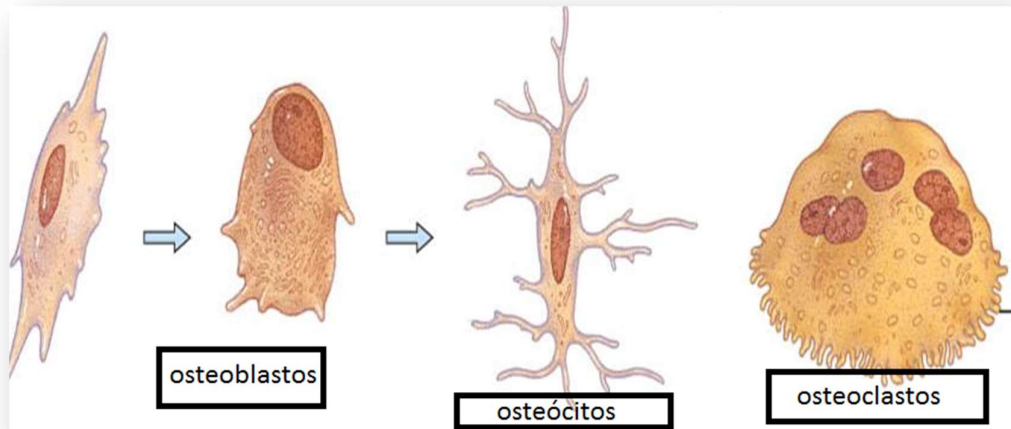


Fig 1.3: Esquemas de células que componen el tejido óseo. Se observa la célula mesenquimal progenitora del osteoblasto, que al diferenciarse da lugar al osteócito; también se muestra un osteoclasto.

Estado actual de la regeneración ósea

Uno de los campos más explorados por la ingeniería de tejidos es el de la regeneración ósea; esto se produce, entre otros factores, porque los tratamientos médicos convencionales empleados para paliar daños severos de hueso han tenido resultados muy pobres [1]. La mejor técnica con la que se cuenta en la actualidad es el trasplante de tejido óseo natural del mismo paciente (autoinjerto). Si bien existen sitios limitados del cuerpo de donde el hueso puede ser extraído sin perder su función, los autoinjertos son menos efectivos en defectos óseos con formas irregulares y pueden ser reabsorbidos en lugar de completar la regeneración. Además, existen complicaciones inherentes a esta técnica como infecciones, fracturas, dolores, parestesia, daños en los nervios u otra afección en el sitio del cuerpo del paciente del cual se extrae el tejido.

Otro tipo de tejido óseo utilizado son los aloinjertos, obtenidos de cadáveres. Sin embargo, la transmisión de enfermedades y los riesgos de rechazo son problemas serios

cuando se utilizan aloinjertos sin procesar. Al mismo tiempo, los aloinjertos procesados, como por ejemplo, una matriz ósea desmineralizada, pierden algunos de los factores de crecimiento necesarios para la eficacia del injerto. Los xenoinjertos, que son tejidos óseos obtenidos de especies animales, tampoco resultan una solución debido a los altos riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo inmunológico asociados. Por otro lado, metales como el hierro, cobalto y titanio pueden ser implantados de manera permanente en el tejido óseo para llenar un defecto y brindar fijación interna; sin embargo, la fatiga, la corrosión, la infección de los tejidos y la pobre interfaz que se crea entre el tejido y el implante generan muchos problemas a los pacientes. Adicionalmente, el módulo elástico de los metales es significativamente mayor al del hueso natural, esto hace que ellos absorban la mayor parte de los estímulos mecánicos necesarios para la correcta formación del nuevo hueso. Esta atenuación de los estímulos mecánicos puede generar la reabsorción del hueso alrededor del implante, haciendo necesaria su remoción. Asimismo las cerámicas, como los fosfatos de calcio, son también usadas en el tratamiento de daños y problemas óseos. Entre ellas, la hidroxiapatita es una de las más utilizadas ya que posee una composición similar a la composición de la fase mineral del hueso. Pero, mientras que las cerámicas pueden ofrecer una excelente biocompatibilidad, son demasiado frágiles para proveer un soporte estructural y resistir a las cargas de los huesos. Además, algunas cerámicas se degradan de manera más lenta que el hueso natural, inhibiendo el crecimiento del nuevo hueso formado dentro del defecto.

La ingeniería de tejidos¹ ha atraído a numerosos científicos y cirujanos esperanzados en la reparación del tejido dañado sin las limitaciones e inconvenientes de los tratamientos actuales. El paradigma de la ingeniería de tejidos consiste en aislar **células específicas** a través de una pequeña biopsia del paciente, para hacerlas crecer en un **sustrato o andamio**

¹ La ingeniería de tejidos ha sido definida como la aplicación de conocimientos científicos para el diseño, construcción, modificación y crecimiento de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y otros factores, solos o combinados [1].

bajo condiciones de cultivo controladas apropiadamente, a fin de trasplantar este conjunto a la zona deseada del cuerpo del paciente, y dirigir la formación del nuevo tejido dentro del andamio que puede ir degradándose a través del tiempo [\[2, 3\]](#).

Para lograr un tratamiento efectivo en la regeneración del tejido óseo, un dispositivo diseñado dentro del campo de la ingeniería de tejidos deberá cumplir con los siguientes requerimientos [\[4\]](#):

1. Proveer resistencia mecánica de manera temporal al área afectada.
2. Fomentar la migración de células reparadoras del hueso a la zona del defecto.
3. Actuar como un sustrato apto para la siembra y proliferación de los osteoides.
4. Poseer una estructura porosa que permita la vascularización y el crecimiento del tejido óseo.
5. Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de la sollicitación mecánica al hueso en formación y para permitir su crecimiento dentro del defecto.
6. Degradarse liberando productos no tóxicos que puedan ser eliminados por el cuerpo.
7. No causar una respuesta inflamatoria significativa.
8. Ser esterilizable sin perder su cualidad de bioactivo.

Las estrategias para desarrollar productos que contribuyan a la regeneración tisular requieren la interacción de elementos osteogénicos, osteoinductivos y osteoconductivos.

Los componentes osteogénicos incluyen células capaces de producir hueso como las células osteoprogenitoras o los osteoblastos diferenciados.

Los factores osteoinductivos son elementos químicos bioactivos que inducen al reclutamiento, diferenciación y proliferación de las células apropiadas para la reparación y regeneración de un defecto óseo.

Finalmente, un material osteoconductivo es aquel que actúa como soporte para el crecimiento del hueso. Por ejemplo, un andamio osteoconductivo puede dar soporte

mecánico, permitir que las células se adhieran, facilitar la vascularización y actuar como vehículo para las células y los factores de crecimiento [5].

Partiendo de que existe una gran versatilidad de nuevos **biomateriales y morfologías** para lograr las propiedades requeridas, es lógico pensar que el punto clave en el desarrollo de un sistema biomecánico para proveer recuperación ósea sea el diseño y elaboración de una matriz.

Biomateriales

La historia de los biomateriales empleados en ingeniería de tejidos óseos nos indica que inicialmente se seleccionaron por su capacidad de ofrecer una restauración estructural, basada principalmente en sus características mecánicas. La primera opción lógica fue la de sustituir el hueso con materiales metálicos, debido a que presentan un alto módulo de compresión y excelente resistencia a la fatiga. Entre los trabajos más recientes, se destacan los desarrollos de andamios metálicos porosos realizados en titanio y tantalio [6, 7]. A pesar de su excelente respuesta mecánica, grandes inconvenientes surgieron a la hora de caracterizar su respuesta biológica, ya que no interactúan con los factores de crecimiento y las biomoléculas del tejido óseo, sino que además los iones que liberan al estar en contacto con el medio biológico resultan tóxicos. Por ello se están buscando tratamientos superficiales para proporcionar características bioactivas a dichos andamios [8].

Para resolver las dificultades de los sustratos metálicos se buscaron materiales que no sólo tuvieran buena respuesta mecánica sino que también fueran reabsorbibles y bioactivos, a fin de generar andamios que indujeran la formación del hueso y la vascularización y que pudieran ser reabsorbidos por el organismo en la medida en que se formaba el nuevo tejido.

La búsqueda bibliográfica realizada durante esta tesis permitió establecer que se han empleado diferentes matrices poliméricas naturales para la fabricación de andamios para regeneración ósea: quitosano [9], colágeno, fibrina y ácido hialurónico [10], mezcla de

ácidos poliláctico (PLA), y poliglicólico (PGA) [11], y policaprolactona (PCL) [12]. Otros biopolímeros que se destacan para el desarrollo de membranas para ingeniería de tejidos son los poli-(hidroxialcanoatos) (PHAs), una familia de poliésteres biodegradables, biocompatibles con diferente grado de cristalinidad, propiedades mecánicas y temperaturas de trabajo, según su composición tal como se detalla en el Apéndice 1. Los únicos dos PHAs comercializados hasta el momento son poli-(3-hidroxi butirato -co- 3-hidroxi valerato) (PHBV) y poli-(3-hidroxi butirato) (PHB). Son numerosos los trabajos en los que se emplea el PHBV como biomaterial para la sustitución temporal de diferentes tejidos, ya sea piel [13,14] o tejidos óseos [15]. Entre la gran variedad de propiedades que posee el PHBV se puede mencionar su origen natural, es biodegradable, biocompatible, no citotóxico y piezoeléctrico [16,17].

Sin embargo el PHBV no es un material bioactivo [18,19] es decir, no se caracteriza por estimular reacciones favorables en el tejido receptor tal que, finalmente, logre un enlace químico directo con él, produciendo una fijación denominada “fijación bioactiva” [20]. Una definición más completa de material bioactivo fue propuesta por Hench y Wilson [21]: *un material bioactivo es aquel que genera una respuesta biológica específica en la interfase del material con el tejido, resultando en un enlace entre ambos.*

Por ello se están desarrollando sustratos formados por una matriz de PHBV reforzada con partículas osteoconductoras [22, 23], por ejemplo, partículas de hidroxiapatita sintética [HA] [24, 25]. En el Apéndice 1 se destaca la diferencia de la HA con la fase mineral del hueso denominada hidroxicarbonato de apatita (HCA), también llamada hidroxiapatita carbonada, con el óxido de silicio [26], el β -fosfato tricálcico (β -TCP) [27] y el Bioglass® 4S55 (o simplemente Bioglass).

La característica común de los vidrios bioactivos y cerámicos bioactivos es la modificación superficial que ocurre una vez se implantan se forma una capa de HCA biológicamente activa, que promueve el enlace en la interfase del biomaterial con el hueso. Sin embargo, un aspecto que diferencia a los vidrios bioactivos es la posibilidad de controlar

el rango de propiedades químicas y, en consecuencia, la cinética del enlace con el hueso. Esto ha permitido incluso que las composiciones de vidrios bioactivos más reactivas desarrollen un enlace estable con el tejido blando similar al observado con el hueso [28].

El detalle de lo que sucede durante el proceso de formación de HCA a partir del Bioglass se desarrolla en el Apéndice 1. Como síntesis, podemos decir que una vez implantado el dispositivo que contiene Bioglass se forma una capa biológicamente activa de HCA que promueve el enlace con el tejido; la cinética de formación de esta capa depende del nivel relativo de reactividad de la superficie y del tiempo de contacto con el fluido fisiológico [29], como se observa en la Fig. 1.4.

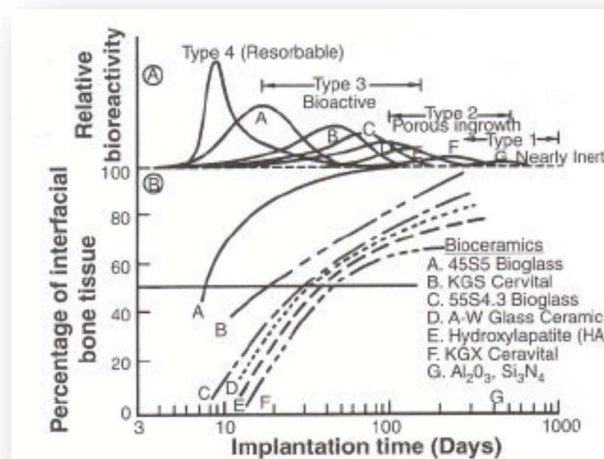


Fig 1.4: Espectro de bioactividad para varios implantes biocerámicos [20]: Velocidad relativa de bioreactividad (A) y porcentaje de tejido óseo en la interfase (B) vs. tiempo de implantación.

Otra opción es la de integrar a la estructura de los andamios proteínas o factores de crecimiento como el transformador del factor de crecimiento β (TGF- β), proteína morfogenética del hueso (BMP), factor de crecimiento de insulina (IGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se demostró que estos factores de crecimiento controlan la

osteogenesis, la regeneración del tejido óseo y la formación de la matriz extracelular a través de la interacción con células osteogeneradoras [30]. Varios trabajos se realizaron incorporando diversos factores de crecimiento a los andamios y los resultados establecen que los mismos inducen la proliferación y la diferenciación de células osteoprogenitoras [31, 32]. Sin embargo, a pesar de que se demostró el efecto positivo que tienen los factores de crecimientos en la osteogenesis y angiogénesis, es de sumo cuidado considerar la velocidad de degradación del andamio para optimizar la cantidad de factores de crecimiento que se ponen en contacto con el medio biológico.

Es por ello que los últimos trabajos se han orientado hacia, la incorporación de refuerzos bioactivos como la HA o el Bioglass, debido a la excelente bio-compatibilidad y bio-actividad que presentan ambas bio-cerámicas [33, 34]. Cabe señalar que si bien se intentó emplear matrices confeccionadas exclusivamente con material bioactivo como Bioglass, los resultados no fueron satisfactorios, ya que se obtenían grandes beneficios en el proceso osteogenerativo, pero se observaba un importante decaimiento en las propiedades de bio-integración [35].

Los últimos desarrollos realizados empleando HA como material osteointegrador de la matriz de PHBV muestran baja velocidad de integración con el hueso natural respecto a la obtenida cuando se emplea Bioglass [36]. Debido a ello se ha optado por trabajar Bioglass [37, 38], una de cuyas principales características es la formación de una capa de HCA sobre los sustratos, durante los ensayos de biodegradación [39]. Además hay otros aspectos que distinguen al Bioglass respecto a la HA para promover la regeneración ósea, los cuales se detallan en el Apéndice 1.

Morfología

Una vez considerados los materiales a emplear para el desarrollo del andamio es necesario considerar el otro factor determinante de una buena la interacción biomaterial-célula: la morfología del andamio. La biomimética, es decir, inspirarse en la naturaleza, es

una de las herramientas que emplea la ingeniería de tejidos para el diseño de sustratos, de modo que a continuación presentaremos una introducción a la estructura del hueso con el objeto de identificar las principales características morfológicas.

El hueso humano está compuesto por tejidos duros y blandos. El principal tejido duro es el tejido óseo; los componentes blandos incluyen a los tejidos conectivos, mieloide, hematopoyético y adiposo (grasa) y la médula ósea. El hueso también cuenta con vasos y nervios que, respectivamente, irrigan e inervan su estructura.

Los huesos poseen formas muy variadas y cumplen varias funciones. Con una estructura interna compleja pero muy funcional, los huesos son livianos aunque muy resistentes y duros. La morfología ósea presenta zonas con diferente densidad de tejido óseo que se diferencian en áreas de hueso compacto y áreas de hueso esponjoso, como se observa en la Fig. 1.5; no existen límites perfectamente marcados entre las dos áreas existiendo entre ellos una pequeña zona de transición.

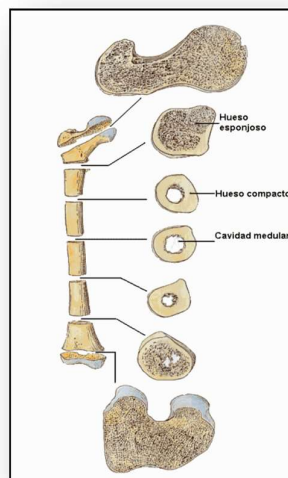


Fig1.5: Esquema de la estructura de un hueso humano, donde se observa la morfología del tejido óseo esponjoso y compacto, y su disposición en un hueso largo.

Entonces, de acuerdo a la biomimética, el andamio deberá tener una estructura con poros interconectados para garantizar la difusión de nutrientes esenciales y oxígeno hacia las células, así como también la proliferación celular. La porosidad interconectada con un tamaño de poro $> 100\ \mu\text{m}$ se considera apropiada [\[40\]](#); sin embargo, corresponde señalar que el rango de tamaño de poro adecuado es muy amplio, ya que se encontró que poros de hasta $350\ \mu\text{m}$ son propicios para el crecimiento del hueso [\[41\]](#).

Métodos de fabricación de sustratos porosos

Una vez expuesta la necesidad de desarrollar una estructura tan específica nos encontramos con el desafío de establecer el método de fabricación con el cual sería posible obtenerla. La bibliografía revisada nos introdujo a una serie de técnicas que son detalladas a continuación [\[42, 43\]](#). Una técnica ampliamente empleada en la elaboración de estructuras porosas es la separación de fases inducidas térmicamente (TIPS). Este método consiste en la separación de fases por disminución de la temperatura en una solución de polímero, ocurre por diferentes mecanismos por la separación líquido-líquido o por separación líquido-sólido. Si bien a través de este método se obtuvieron exitosamente estructuras porosas, las mismas poseen un tamaño de poro de $44 \pm 11\ \mu\text{m}$ [\[44\]](#) el cual es menor que el requerido para ser empleado en regeneración de tejidos óseos. Otra técnica que encontramos que actualmente es utilizada para el desarrollo de sustratos es la técnica de lixiviado de sales [\[45, 46\]](#). Esta técnica consiste básicamente en generar una estructura porosa con sustancias granuladas que no se disuelven en el solvente del polímetro, y aprovechando esta propiedad una vez que se baña la estructura porosa formada con el polímero a ensayar, se procede a la elusión de la misma dejando solamente el compuesto de interés. Las sustancias mayormente empleadas para generar la estructura porosa inicial son sales (cloruro de sodio [\[45, 46\]](#), citrato de sodio [\[47\]](#), carbonato de amonio) o azúcares [\[48\]](#) que son insolubles en solventes orgánicos comunes.

Los principales pasos en este método son: i) la preparación del agente porógeno y de la solución del polímero, ii) la mezcla de ambas fases, iii) el secado de la mezcla y iv) el lixiviado del porógeno. Al observar que el desarrollo de esta técnica presenta varias virtudes aprovechables [48, 49], ya que en una primera instancia no se requiere equipamiento específico y la materia prima es relativamente accesible, contando además con antecedentes en el mismo laboratorio [50] optamos como procedimiento para desarrollar los andamios. En los estudios previos se determinó que los poros se encontraban interconectados con un tamaño promedio de $163 \pm 63 \mu\text{m}$.

A lo largo de este trabajo planteamos además el desarrollo de una película, compuesta por los mismos materiales, pero con una estructura bidimensional. Las películas son consideradas bidimensionales ya que poseen un espesor del orden de $100 \mu\text{m}$ lo cual es despreciable frente a las otras dimensiones de la película, ya que son del orden de 10 cm. La idea de la inclusión de este tipo de estructuras en el trabajo que presentamos se debe específicamente a dos razones: la primera la de proyectar un uso alternativo de los andamios, como el de recubrir la fisura en el hueso y no necesariamente emplear únicamente los andamios que sustituyen un faltante óseo. La segunda es la de aprovechar que estos materiales se estaban empleando ya para ingeniería de tejidos dérmicos con lo cual la posibilidad de poder extender su uso con películas 2D es el comienzo de su estudio [51]. Caracterizaremos la estructura de las membranas, ensayándolas en tracción uniaxial, mediremos el tamaño de poro y aprovecharemos la ventaja que nos da este tipo de estructura más simple para conocer en primera instancia su interacción con células vivas.

Para desarrollar este tipo de membranas optamos por la técnica de evaporación de emulsiones, dicha técnica está probada ya en la elaboración de sustratos [52, 53] y nano o micropartículas [54, 55] con aplicación en distribución controlada de fármacos. Una de las bondades más reconocidas de este procedimiento es que la elaboración de los sustratos se realiza a partir de un solo paso, en el que además se le pueden incorporar otras moléculas o sustancias sin la necesidad de añadir un paso más al procedimiento.

Para explicarnos mejor detallaremos los fenómenos químicos que suceden durante este procedimiento. Comenzaremos explicando que la emulsión es una mezcla física de dos fases inmiscibles, constituido por partículas en suspensión de la otra sustancia que la compone. Mediante la emulsificación se entrega la energía necesaria para formar y dispersar ambas fases lográndose un sistema inestable con una estructura homogénea. Para ello se recurre a mezcladores mecánicos, disruptores ultrasónicos u homogeneizadores. La velocidad con que se revertirá el estado inestable de la emulsión puede reducirse mediante la presencia de un tensioactivo o surfactante que reduce la energía libre del sistema aumentando el área de la interfase. Para la determinación del surfactante a emplear se tuvo en cuenta el Balance Hidrofílico Lipofílico (HLB). El HLB es una medida del grado en el que es hidrófilo o lipófilo, determinado mediante el cálculo de los valores para las diferentes regiones de la molécula, como describe Griffin [\[56\]](#). Griffin propone en su trabajo una escala arbitraria que va de 0 a 20 en la cual un valor de HLB de 0 corresponde a una molécula hidrófoba completamente (lipófila), y un valor de 20 corresponde a una molécula completamente hidrófila (lipofóbica).

El valor HLB se puede utilizar para predecir las propiedades tensoactivas de una molécula:

- <10: lípidos soluble (insoluble en agua)
- > 10: soluble en agua (insoluble en lípidos)

Existe una gran variedad de surfactantes que pueden emplearse para la generación de emulsiones como el alcohol polivinílico, los polisorbatos (Tween®), el ácido poliacrílico, los poloxámeros (Pluronic®) y el dodecil sulfato de sodio (SDS). Todos los tensioactivos tienen propiedades humectantes, dispersantes, defloculantes, detergentes, emulsificantes, suspensores y solubilizantes en algún grado. En general, domina una de ellas sobre las demás, lo cual restringe el uso de cada tensioactivo para una determinada aplicación.

Para este trabajo se optó por trabajar con polisorbatos (Tween®), empleados masivamente en la industria alimenticia, farmacéutica y en diversas aplicaciones biotecnológicas. Presentan un número de HLB mayor que 12 [\[57\]](#), es decir que el agente tensioactivo es soluble en la fase acuosa.

Finalmente para lograr membranas de espesor homogéneo a partir de las emulsiones se utilizó un dispositivo extensor [\[58\]](#), que consta de una placa sobre la cual se extiende la emulsión con la asistencia de una cuchilla. La regulación de la separación entre placa y cuchilla permite controlar el espesor de la membrana.

Objetivo del trabajo

El objetivo de este trabajo es fabricar sustratos bi y tridimensionales con materiales compatibles para la regeneración ósea y caracterizar su morfología, citotoxicidad y biodegradación in vitro. A partir de los antecedentes expuestos, como hipótesis de trabajo se considera que un compuesto de PHBV reforzado con Bioglass es el material adecuado para la fabricación de los andamios.

Se logrará corroborar la validez de la hipótesis si los sustratos se caracterizan por:

- Respuesta citotóxica negativa,
- Hidrofilidad para que resulte apta para sembrar las células en un medio de cultivo,
- Porosidad interconectada, que permita la proliferación de células sembradas en un medio de cultivo apropiado,
- Resistencia mecánica similar a la del hueso natural,
- Biodegradabilidad en compuestos que no sean tóxicos.

Evaluación del sustrato

Para poder determinar si el andamio que fabricaremos cumple con los requerimientos mencionados se propone someterlo a ensayos que se caracterizaron en tres grandes grupos: mecánicos, morfológicos y biológicos.

En la Tabla 1.1 se muestra un esquema de los ensayos a realizar en este trabajo, y la división de los mismos basados en la funcionabilidad que se desea determinar.

Tabla 1.1: Propuestas de ensayos a realizar sobre los andamios.

Ensayos	
Mecánicos	Tracción uniaxial
	Compresión uniaxial
Morfológicos	Hidrofilidad
	Porosidad
Biológicos	Biodegradación
	Citotoxicidad (directa e indirecta)
	Adhesión y proliferación celular

Ensayos mecánicos

Los primeros ensayos que realizaremos son los que buscan caracterizar las películas de una manera mecánica. Presentaremos resultados de ensayos de tracción uniaxial realizados sobre las películas bidimensionales.

De manera comparativa es importante tener en cuenta valores consignados en bibliografía; se conoce que estructuras porosas de Bioglass poseen una resistencia a la compresión de 250 kPa, con un tamaño de poro de 200-400 μm [59], en el caso de HA no

llega a 30 kPa, con una porosidad del 86% [60] y β -TCP es menor a 30 kPa [27] mientras que el hueso esponjoso humano posee una resistencia a la compresión que va desde 0.2 a 4 MPa [61]. En tracción el hueso natural posee una tensión de fluencia de (6 ± 2) MPa, su límite elástico es (4 ± 2) MPa y presenta un módulo de Young 0.05 – 30 GPa [62].

Ensayos morfológicos

Como mencionamos anteriormente las características morfológicas de las estructuras es una condición excluyente para determinar la funcionalidad de los sustratos que pretendemos desarrollar. Es por eso que este trabajo se caracterizara la porosidad y la hidrofiliidad de los andamios y de las películas. Tomando como referencia la porosidad de las estructuras 3D de trabajos realizados anteriormente, del orden de 100 μm (pág. 13), fabricamos andamios 3D con esta porosidad. En cambio debido a la falta de bibliografía en el caso de las películas bidimensionales, se fabricaron muestras con diferente tamaño de poro a fin de evaluar la distribución de poros según el contenido de Bioglass.

Por otra parte al determinar la hidrofiliidad del material sabremos cómo interactuará con el medio biológico. Para cuantificar la hidrofiliidad de la superficie, se mide el ángulo formado entre la interfaz sólido-líquido y la interfaz líquido-aire de una gota de agua depositada sobre el material en estudio [63].

Ensayos biológicos

Proponemos la realización de los ensayos de biodegradación para caracterizar la capacidad de los materiales estudiados de degradarse en un medio biológico y también para determinar la velocidad del proceso. La velocidad de disolución de los materiales juega un papel de gran importancia y que afecta significativamente al comportamiento del material in vivo. Así tenemos que, si un material es demasiado soluble, se degradará de forma pasiva en los fluidos fisiológicos sin estimular la regeneración del tejido. Por otro lado, si el material tiene un grado de solubilidad adecuado, se llevará a cabo un proceso de reabsorción donde las células interactúan con el material y liderarán el proceso de

regeneración ósea de una forma más parecida al mecanismo natural o biológico de formación del hueso.

Dentro de este contexto, tanto el control de la cinética de degradación como el comportamiento físico-químico de los materiales durante la degradación constituyen aspectos claves, que deben ser caracterizadas con detalle.

Una idea de la velocidad y del proceso podría obtenerse con un ensayo prolongado de biodegradación, ir evaluando la pérdida de peso del mismo y los materiales que se van formando sobre los sustratos, podrían dar una estimación del material implantado. Diversos estudios se desarrollaron sobre andamios de PHBV y Bioglass para determinar el tiempo de biodegradación y la bio-actividad [\[64, 65\]](#). El Apéndice 1 presenta una síntesis de esos trabajos.

La literatura nos da cuenta de que el PHBV se degrada en los ácidos: 3-Hidroxibutírico, 3-Hidroxivalérico, entre otros. Los mismos son hidroxí-ácidos que se encuentran en el torrente sanguíneo, y es exactamente ahí donde radica el motivo de la baja toxicidad, que presenta este polímero y su fundamento para emplearlo como biomaterial. El Bioglass por su parte, se disuelve dejando productos iónicos que promueven la diferenciación de osteoblastos, lo cual fundamenta su característica de bio-activo. Planteamos ensayos de citotoxicidad, directa e indirecta, en los cuales se observa la reacción de las células al estar en contacto con ese medio de degradación del andamio, a fin de determinar si los productos de la degradación resultan nocivos o no a las células [\[66\]](#).

Emplearemos fibroblastos para caracterizar la citotoxicidad. El fibroblasto se caracteriza por presentar una forma alargada, fusiforme, citoplasma basófilo, un núcleo elíptico, abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi desarrollado, como se esquematiza en la Fig 1.6. Es un tipo celular que forma parte del tejido conjuntivo, junto con los condrocitos, los osteocitos, las células musculares lisas y los adipocitos. El fibroblasto es la célula más común y menos especializada. Tiene gran capacidad de diferenciación hacia el resto de células del tejido conjuntivo.



Fig 1.6: Esquema representativo de un fibroblasto, donde se puede observar sus componentes intracelulares y la morfología que presenta el mismo.

Los osteoblastos producen el tejido óseo, sintetizan el componente biológico de la matriz extracelular, caracterizada por su alto contenido de colágeno tipo I, glicosaminoglicanos y glicoproteínas.

La elección de usar en el desarrollo de este trabajo líneas celulares de la familia de los fibroblastos, se justifica si se tiene en cuenta el proceso regenerativo del tejido óseo [67]. Durante dicho proceso las primeras células que se aglomeran alrededor de la lesión son los fibroblastos y tienen como función generar colágeno.

Se encontró en bibliografía que para caracterizar la citotoxicidad del material se debe evaluar la respuesta con todos los tipos celulares que entran en contacto con el andamio. Es decir, no solo con osteocitos, sino también con fibroblastos [\[68\]](#).

En este trabajo se emplearon fibroblastos por dos motivos: el primero porque son el primer tipo celular con el que entra en contacto el material una vez implantado. Por otro lado, los fibroblastos son células con un comportamiento que permite ajustar con ellas variables del ensayo, debido a la experiencia previa de trabajo. En síntesis, se emplearon fibroblastos como ensayo preliminar que permita evaluar la citotoxicidad del material ensayado.

2.Preparación de sustratos

A continuación presentaremos el procedimiento empleado para la fabricación de los sustratos que ensayaremos en el presente trabajo. Dichos procedimientos son lixiviados de sales para la obtención de andamios tridimensionales y evaporación de emulsiones para producir películas bidimensionales.

Materiales

La formulación de los andamios, bidimensionales y tridimensionales, se emplearon pelets de PHB-12% HV (PHBV) comercial marca Sigma Aldrich.

El Bioglass fue producido y gentilmente donado por el Dr. Aldo Boccaccini, director del Instituto de Biomateriales de la Friedrich-Alexander Universität, Erlangen – Nurnberg, Alemania. Las partículas no poseían un tamaño mayor a 5 μm ya que fueron tamizadas.

Se empleó un surfactante no iónico aprobado para uso médico, Tween®. Como ya mencionamos; todos los reactivos y solventes son pro análisis.

Películas bidimensionales

Las emulsiones constan de una solución 6% p/v de PHBV en cloroformo, la cual fue obtenida mezclando con un agitador magnético durante 60 minutos a 40°C como se muestra en la Fig. 2.1a. Luego, se mezcló durante 20 minutos en un mezclador mecánico — ver Fig. 2.1b— donde se le agregó 20% p/p de surfactante y 3% v/v de H₂O destilada.

La solución se distribuyó en 5 (cinco) frascos a cada uno de los cuales se les agregó Bioglass en los porcentajes indicados en la Tabla 2.1. La primera columna de la tabla introduce el nombre que tendrán los sustratos según su composición.

Tabla 2.1: Nomenclatura de las películas producidas a partir de solución de PHBV con el contenido de Bioglass que se indica.

Grupo	% Bioglass
JE0	0
JE1	20
JE2	40
JE3	60
JE4	80

La mezcla con el Bioglass se colocó en el mezclador ultrasónico durante 20 minutos hasta lograr la homogeneidad de la distribución. Luego, la solución se esparció sobre una cuna de teflón, de una profundidad de 3 mm, donde se dejó evaporar el cloroformo durante 24 hs. Una vez obtenida la película se procedió a la elusión del surfactante, la que consistió en el lavado por 96 hs en una solución acuosa 10% V/V de alcohol absoluto. El cambio de solución se realizó cada 24 hs, con enjuague intermedio con H₂O destilada.

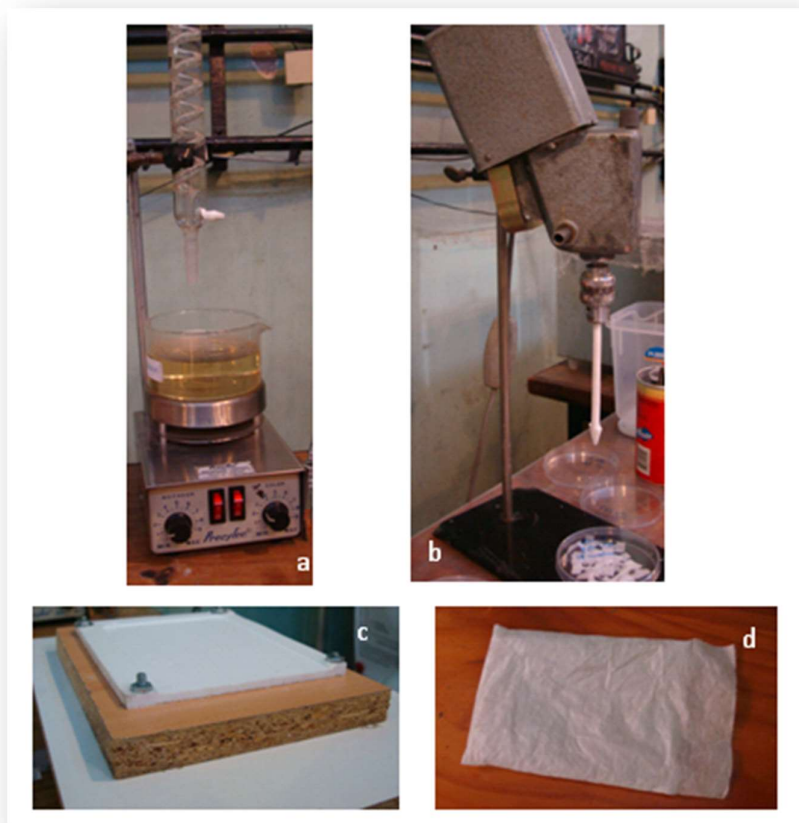


Fig 2.1: a) Baño de glicerina a 40°C sobre mezclador magnético. b) Mezclador mecánico c) plancha de teflón donde se esparce la emulsión para el posterior secado d) modelo de la película obtenida.

Una vez finalizada la elusión del surfactante, las películas se secaron con papel de filtro y luego en bajo vacío durante 24hs.

Andamios tridimensionales

La realización de los andamios con porosidad controlada se requirió la confección del esqueleto del andamio. El mismo consiste en la fundición parcial de granos de un colchón de cloruro de sodio (NaCl). Primero se tamizaron los granos de sal entre un tamaño de 100 μm a 300 μm . Estos se dispusieron sobre una capsula de Petri de vidrio y se sometieron por 18 hs bajo humedad relativa del 98%. De esta manera se obtiene un andamio con un tamaño de poro deseado y con los mismos interconectados.

Una vez obtenido los andamios se procedió a dispersar sobre los mismos una solución de 10% p/v de PHBV en cloroformo. A esa solución de cloroformo se le agrego porcentajes de Bioglass de 20, 40, 60, 80 %. Se mezcló en un mezclador mecánico hasta obtener una dispersión homogénea. Una vez evaporado el cloroformo se procedió a la elusión de la sal, a través de un lavado de 5 días en solución 10% v/v de etanol en agua, y por último, un lavado final en agua destilada. Una vez terminados los lavados se secó en cámara de vacío por 2 hs.

Se obtuvieron andamios como los que se muestran en la Fig 2.2 a, vista frontal, Fig 2.2 b vista lateral.

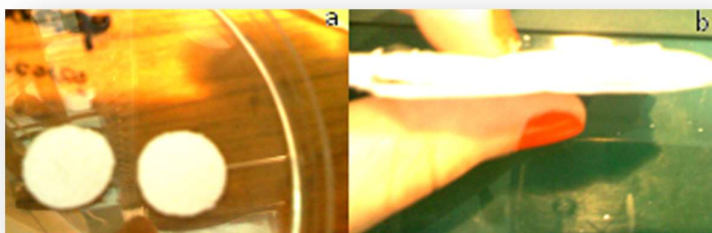


Fig 2.2: Vista superior de andamios (a) y de lateral (b) de andamios obtenidos a través del método de lixiviado de sales.

3. Caracterización mecánica

Los ensayos de tracción uniaxial en membranas bidimensionales y de compresión uniaxial en andamios tridimensionales fueron contundentes a fin de compararlos con la respuesta mecánica del hueso natural.

Ensayo de tracción uniaxial

Los sustratos obtenidos 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 universal de ensayos Instron 5500R; cada grupo de interés se ensayó por triplicado a una velocidad de cabezal de 0,2 mm/min.

Las muestras se ajustaron al tamaño establecido en la norma, empleando un sacabocados. Para evitar la formación de microfisuras durante la disposición de los sustratos en el dispositivo de tracción. Cada muestra se soportó con un marco que se cortó una vez que la probeta era firmemente sujeta por las mordazas; detalles de este arreglo se presentan en la Fig. 3.1. La Fig. 3.2 ilustra los cambios en la curva de tracción con el incremento del contenido de Bioglass en los sustratos.



Figura 3.1: Muestra incluida en un marco de cartón que asiste al montaje en los cabezales de la máquina de ensayos.

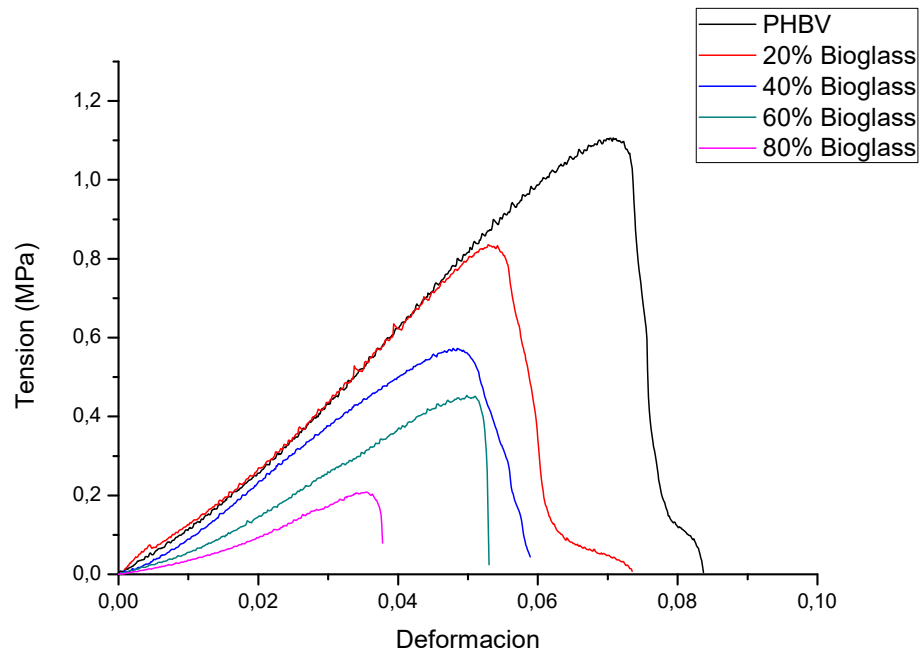


Fig. 3.2: Curvas de tracción de los sustratos de PHBV con diferente contenido de Bioglass. Se optó por una curva representativa de cada grupo de muestras para esclarecer la representación gráfica.

Tabla 3.1: Valores obtenidos en el ensayo de tracción uniaxial.

	Módulo Tensil [GPa]	Resistencia Tracción [MPa]
PHBV	10 ± 0.6	1.1 ± 0.3
PHBV-20% Bioglass	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3
PHBV-40% Bioglass	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
PHBV-60% Bioglass	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
PHBV-80% Bioglass	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1

La Tabla 3.1 presenta los resultados obtenidos en el ensayo, en los cuales se observa un decaimiento muy marcado de las propiedades mecánicas con la incorporación de las partículas activas.

La Fig 3.3 muestra la relación entre la resistencia a la tracción obtenida en el ensayo realizado y la proporción de Bioglass presente en las muestras. La relación puede ser aproximada por una recta con pendiente negativa. La correlación R^2 calculado es de 0.9025 lo cual muestra la alta correlación entre la caída en la resistencia a la tracción y el contenido de Bioglass. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 3.1 el módulo tensil presenta un fuerte decaimiento cuando se incluye el Bioglass, debido a la generación de una interfaz incoherente, que representa un camino libre para la propagación de fisuras. Considerando los compuestos, el módulo tensil disminuye linealmente a medida que se incrementa la concentración de Bioglass, como se representa en la Fig 3.4 con un comportamiento lineal ($R^2=0.98$) esta dependencia destaca la correlación con el aumento en superficie de la interfaz. Se destaca además que el valor obtenido para la resistencia a la tracción de la muestras es muy bajo con respecto a lo encontrado en bibliografía para el PHBV, dicha situación se agrava con el agregado activo ya que el mismo disminuye las

características mecánicas. Los valores observados para PHAs se encuentran tabulados en el Apéndice 1-

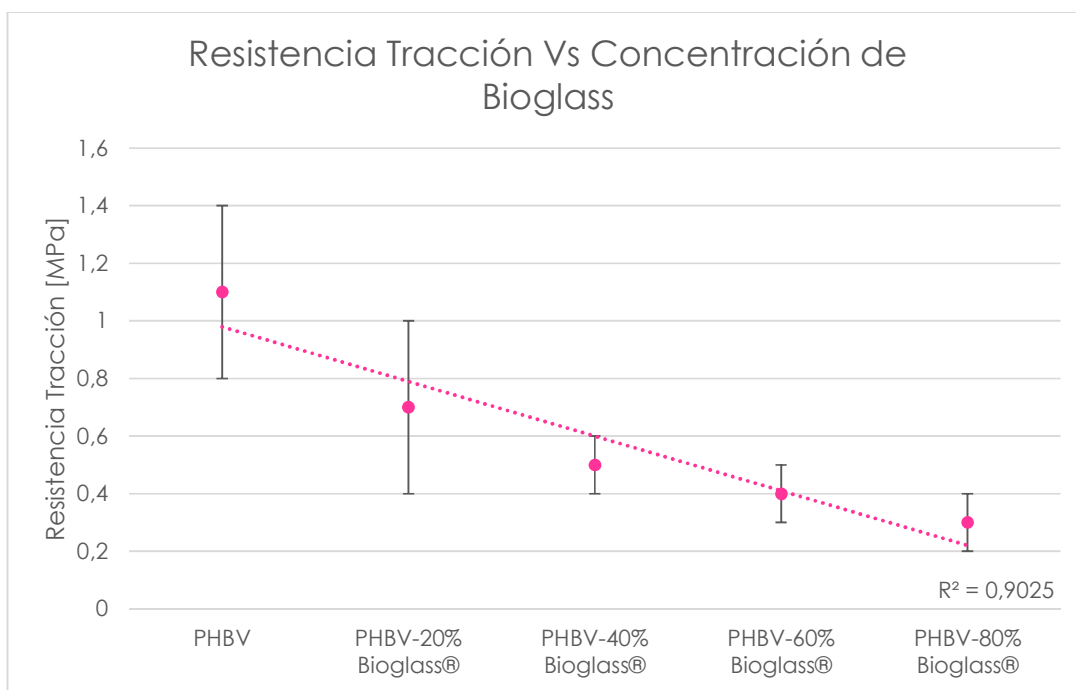


Fig 3.3: Resistencia a la tracción vs. la concentración de Bioglass. Se presenta también en la figura la línea de tendencia con su respectivo factor de correlación.

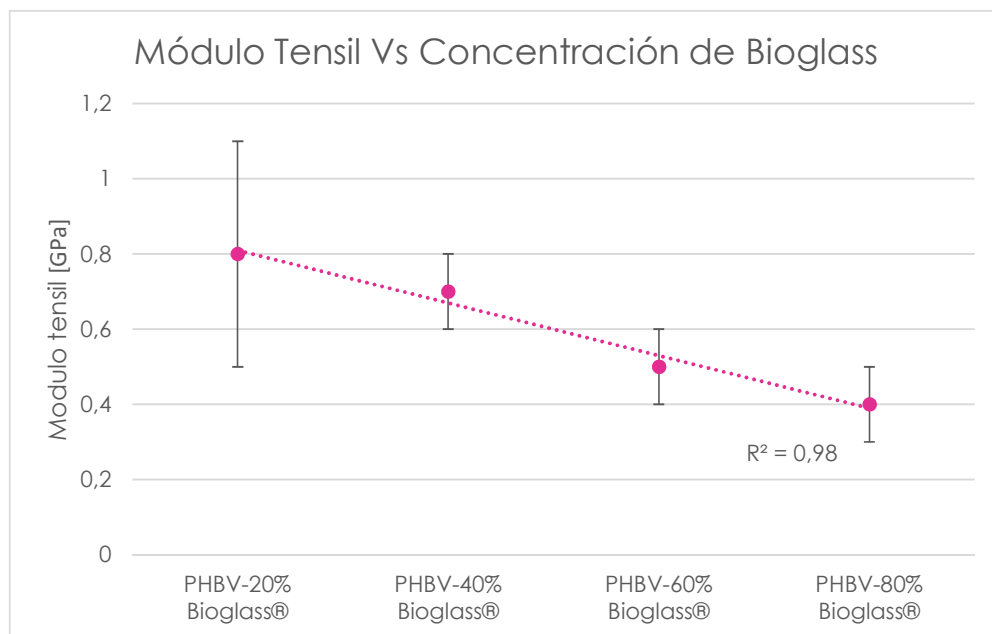


Fig 3.4: Módulo tensil Vs Concentración de Bioglass, con su respectiva línea de tendencia y se muestra su valor R^2 .

Ensayo de compresión uniaxial

Se sometieron a este ensayo muestras cilíndricas de 5 mm de diámetro de PBHV con diferentes porcentajes de Bioglass; la Fig 3.5 presenta la superficie de esas muestras. Se las ensayó en la máquina universal Instron 5500R a la que se le incorporó el dispositivo para realizar compresión, que se ilustra en la Fig 3.6. Se empleó una celda de carga de 50 N a una velocidad de cabezal de 0.5 mm/min. Para cada composición se ensayaron cinco muestras.



Figura 3.5: Vista superior de las probetas empleadas para el ensayo de compresión.



Figura 3.6: Máquina de tracción montada con el dispositivo para comprimir las probetas.

En la Fig. 3.7 se muestran las curvas características obtenidas en el ensayo, que se extendió hasta aproximadamente el valor de la resistencia a la compresión del hueso natural (4MPa).

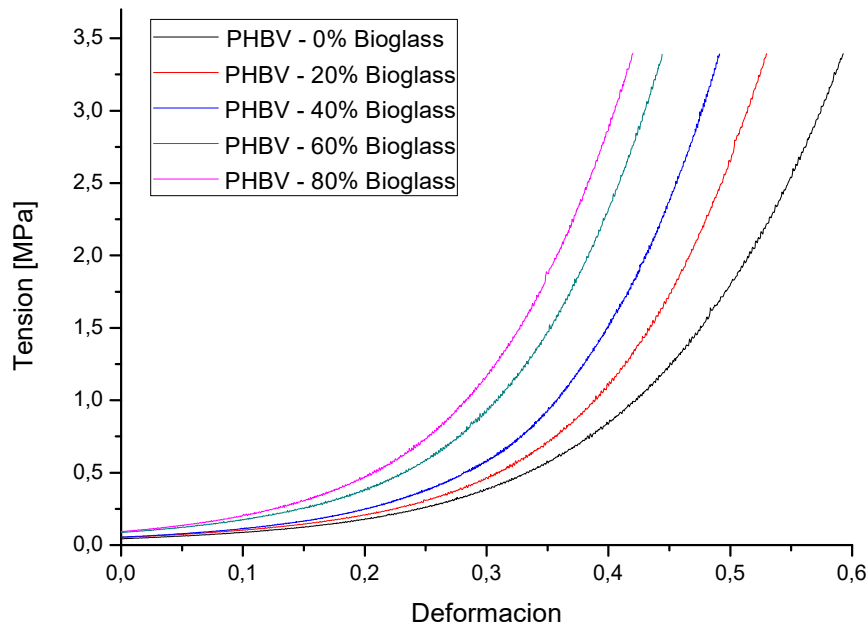


Fig 3.7: Curvas de ensayos de compresión uniaxial, para las diferentes concentraciones de Bioglass.

Se observa que, a medida que aumenta el contenido de Bioglass, para alcanzar un determinado nivel de deformación hay que aplicar mayor tensión. En el rango lineal, la relación entre la tensión y la deformación, en el caso de un ensayo de compresión, da lugar a determinar el módulo de compresión. Éste se estableció como la pendiente de la curva

de compresión a deformaciones menores a 0.2; los valores se resumen en la Tabla 3.2 y se representan gráficamente en la Fig 3.8.

Tabla 3.2: Módulo de compresión expresado en MPa.

Composición	Módulo de compresión [MPa]
PHBV - 0% Bioglass	$0,7 \pm 0,1$
PHBV - 20% Bioglass	$0,8 \pm 0,2$
PHBV - 40% Bioglass	$1 \pm 0,4$
PHBV - 60% Bioglass	$1,1 \pm 0,2$
PHBV - 80% Bioglass	$1,3 \pm 0,2$

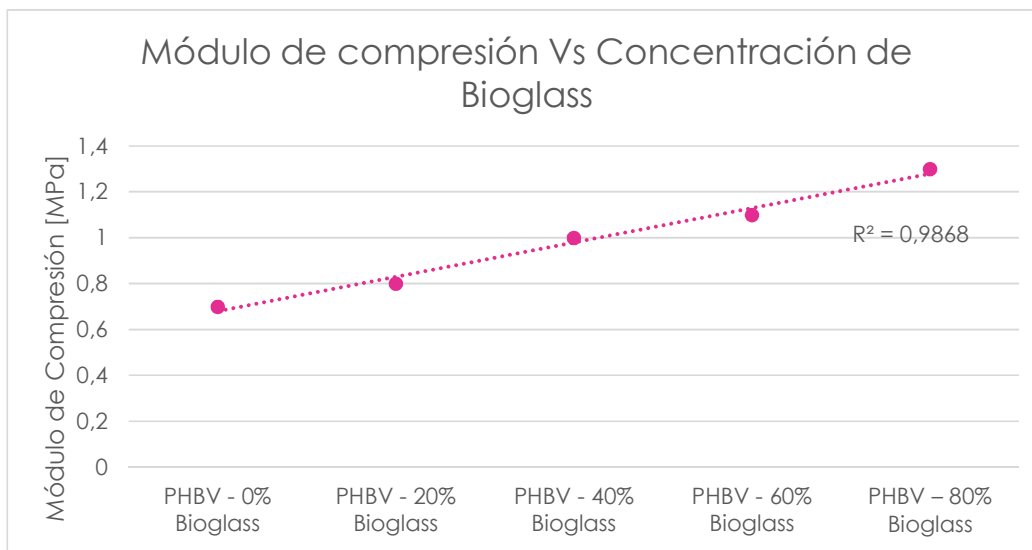


Fig 3.8: Módulos de compresión vs. contenido de Bioglass. Se muestra en línea punteada la tendencia con su respectivo coeficiente de correlación R^2 .

Los resultados de los ensayos mecánicos evidencian que la resistencia a la compresión llega al requerimiento del hueso natural, que el valor medio es del orden de 4MPa [61], ya que en todos los casos el ensayo se realizó hasta ese valor sin ningún inconveniente. En lo que respecta al módulo a la compresión se ve modificado de manera significativa con el porcentaje de Bioglass, determinando un material más rígido. Como se puede observar en la Fig 3.8 el ajuste es muy bueno ($R^2 = 0.98$) del módulo de compresión con la concentración de Bioglass. Esto es válido para un rango elástico muy estrecho. Además los valores obtenidos para el módulo de compresión se corresponden con los observados en literatura, sobre muestras realizadas con PHBV/Bioglass, pero fabricadas con otras técnicas [69].

4. Caracterización Morfológica

En primer término se determinó la mojabilidad del sustrato, medida por medio del ángulo de contacto de una gota de agua dispuesta sobre su superficie. Para que se produzca la adhesión y proliferación celular es necesario que la superficie sea hidrofílica, esto es, que el ángulo de contacto sea menor a 90° .

Por otra parte, buscamos establecer si las películas presentan la porosidad adecuada que debe tener un tamaño entre $100\ \mu\text{m}$ y $350\ \mu\text{m}$. Consideramos como válidos los valores obtenidos en los andamios, por lo cual no se repetirá esa medición.

Hidrofilidad

La posibilidad de sembrar células sobre los sustratos y de que se produzca su crecimiento y proliferación está supeditado a la mojabilidad de su superficie.

Para realizar la medición de la mojabilidad, esto es, del ángulo de contacto que forma la gota con la superficie, se montó el sustrato entre dos polarizadores cruzados, a la altura del eje del sistema óptico que se ilustra en la Fig. 4.1; detrás del polarizador hay un difusor para homogeneizar la luz que recibe la gota y delante del analizador se ubicó una cámara fotográfica con la que se toma la imagen digital de la gota.

Una vez que se alineó el sustrato en el banco óptico y se ajusta el foco de la cámara, se dejó caer una gota de $5\ \mu\text{l}$ de agua destilada sobre la muestra. Posteriormente, se sacó una foto ni bien la gota se deposita porque se absorbe rápidamente, de manera esquemática se muestra una gota depositada sobre el sustrato en la Fig. 4.2. Se procesa la imagen con la ayuda del programa Image J® para obtener el ángulo de contacto. Cada determinación de ángulo de contacto se realizó por triplicado.

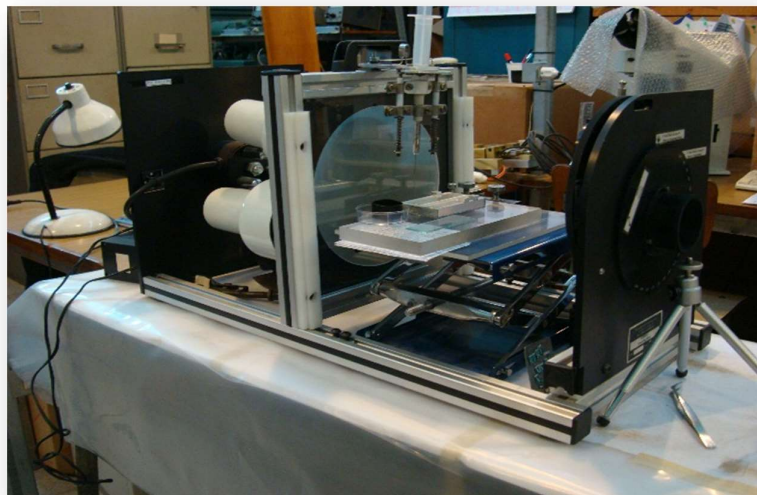


Figura 4.1: Sistema óptico para medir el ángulo de contacto. El mismo consta de un difusor de luz blanca en la parte posterior, dos polarizadores cruzados, una jeringa Hamilton de 5 μ l para depositar la gota sobre los sustratos, y la cámara fotográfica en la parte anterior para tomar las imágenes.

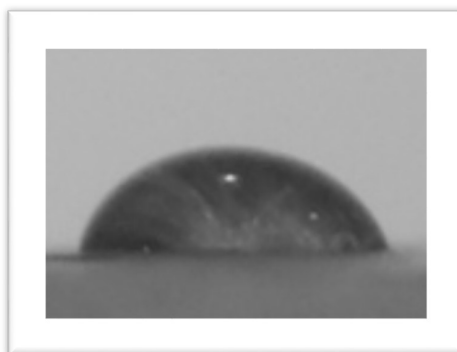


Figura 4.2: Imagen ampliada y editada de la gota de 5 μ l de agua colocada sobre el material a evaluar.

La Fig. 4.3, donde se presentan los ángulos de contacto medidos en los diferentes sustratos muestra, por un lado, que todos los sustratos resultan hidrofílicos ya que el ángulo de contacto es menor a 90° . La gota de agua moja la superficie. Por otra parte un análisis ANOVA de los valores medios y dispersión de ángulo de contacto para las diferentes concentraciones de Bioglass, da cuenta de la falta de correlación entre dicha concentración y la mojabilidad del sustrato. En síntesis, la mojabilidad no depende del contenido de vidrio bioactivo del sustrato.

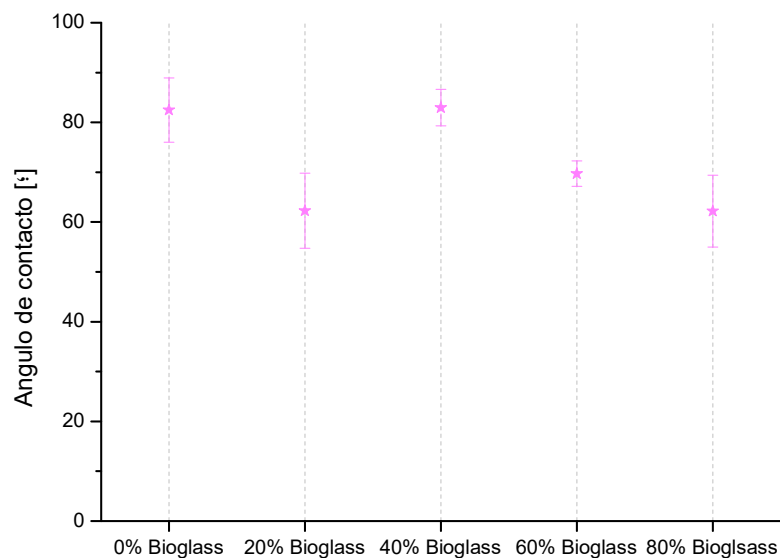


Fig 4.3: Ángulo de contacto ($^\circ$) para los sustratos con diferente contenido de Bioglass.

Morfología superficial - Porosidad

La presencia de poros y sus tamaños en sustratos bidimensionales requirió la caracterización superficial por medio de Microscopia Electrónica (perteneciente al centro Atómico Constituyentes CNEA, dichas imágenes se obtuvieron un Microscopio Electrónico (SEM), marca FEI modelo Quanta 200). Se evaluaron dos películas por cada grupo y de cada micrografía se tomaron cinco regiones diferentes para tener validez estadística.

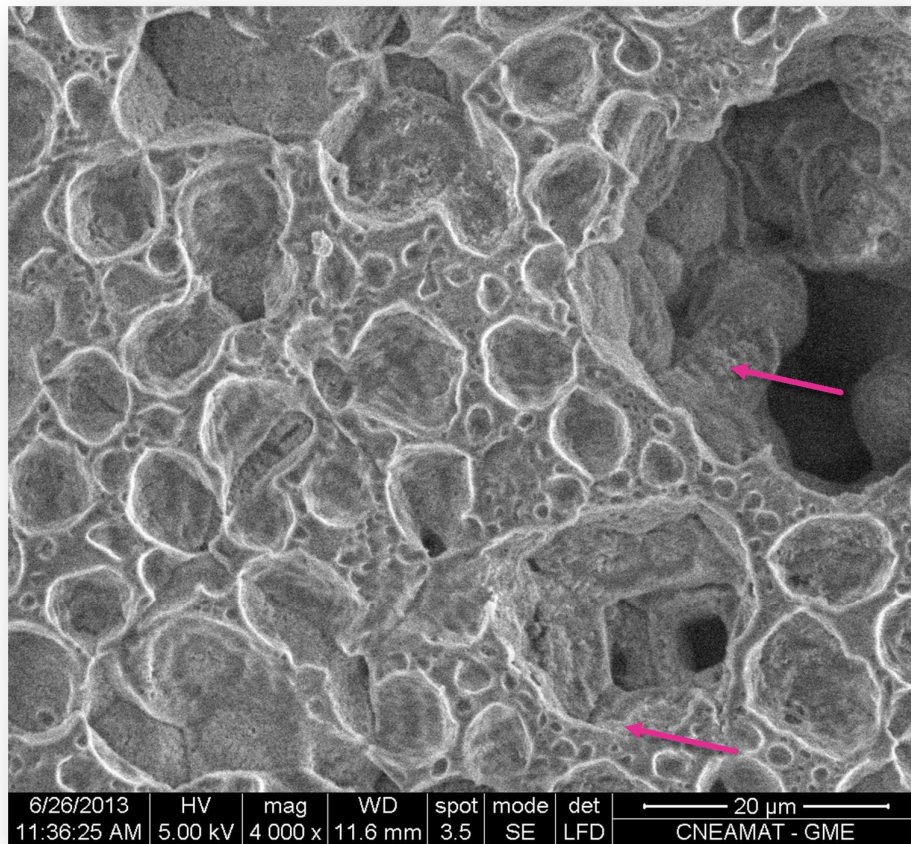


Fig 4.4: Micrografía SEM del sustrato con 0% de Bioglass, 4000 x. Se destaca una amplia distribución de tamaño de poros. Las flechas señalan la rugosidad de las paredes de los poros.

La superficie de un sustrato bidimensional sin Bioglass presenta una estructura porosa con paredes rugosas (Fig 4.4). La dispersión de tamaño de los poros es amplia, va de tan solo 2 μm hasta 20 μm . La distribución de tamaños en términos de valor medio de tamaño y su desviación standard es $(8 \pm 6) \mu\text{m}$.

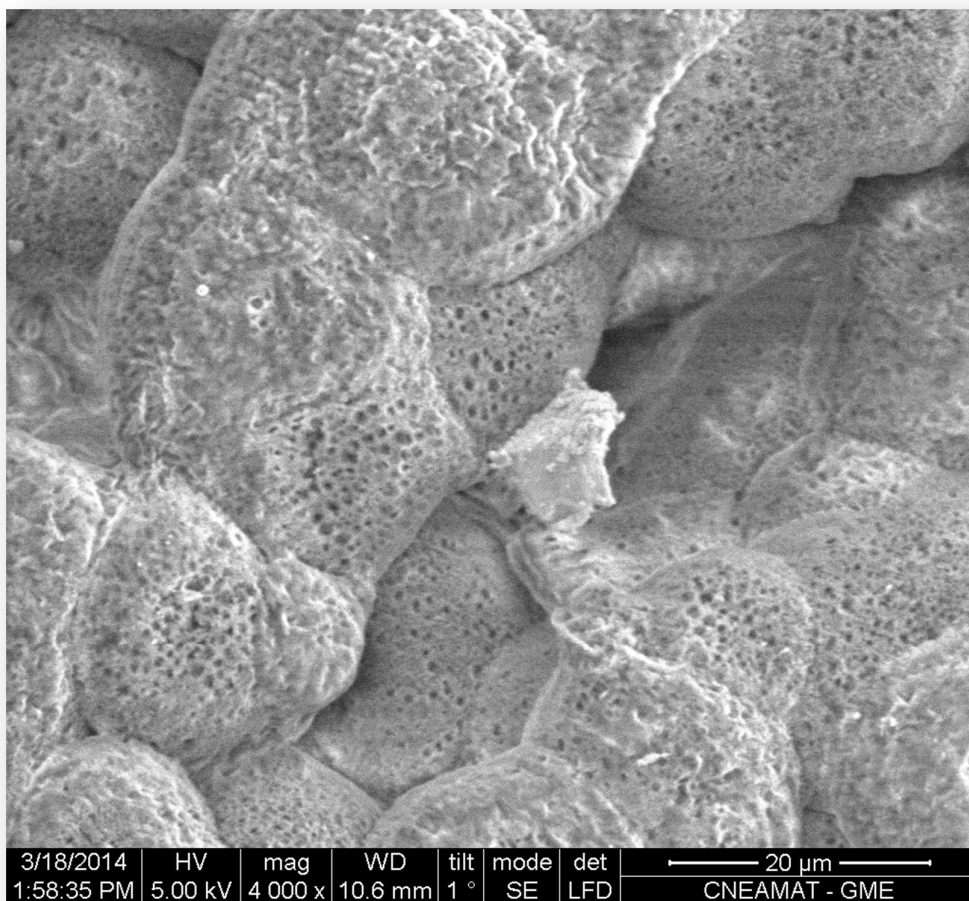


Fig 4.5: Micrografía SEM del sustrato con 20% de Bioglass , 4000 x. Se aprecia menor dispersión en el tamaño de los poros y la aparición de micro poros.

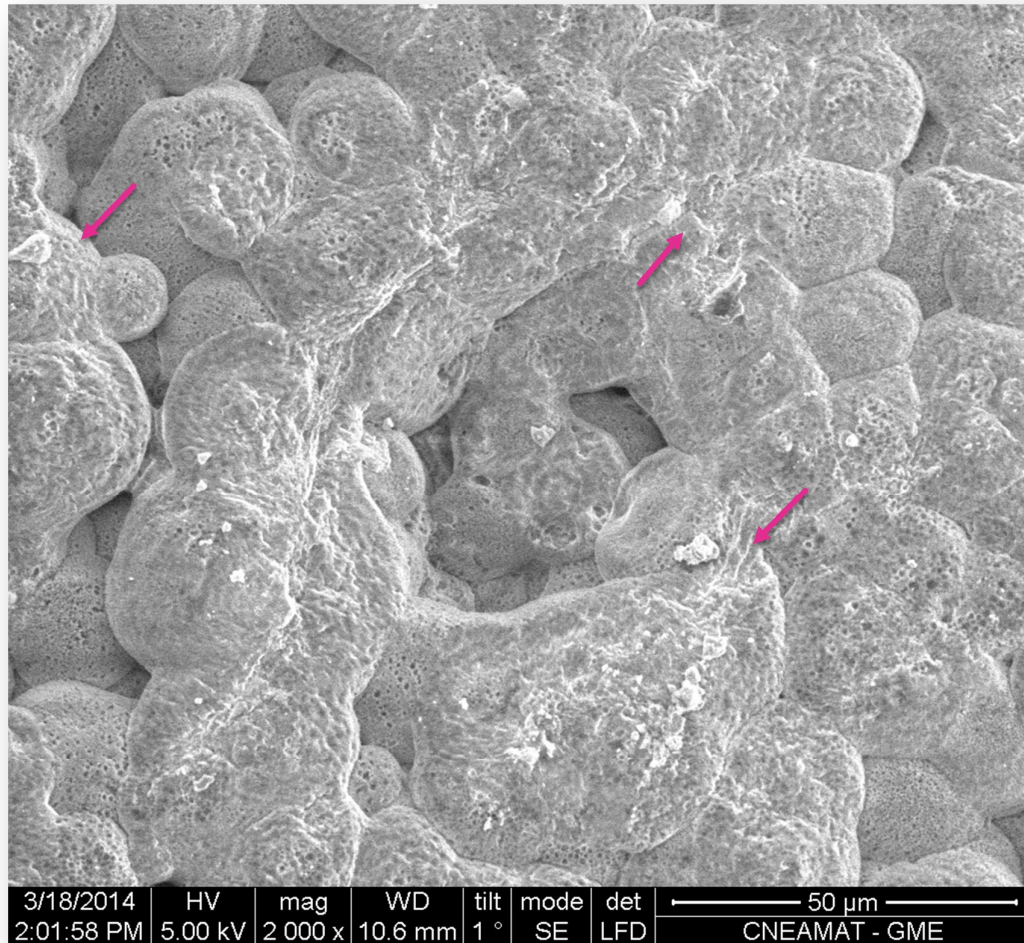


Fig 4.6: Micrografía SEM del sustrato con 20% de Bioglass, 2000 x; las partículas de Bioglass aparecen distribuidas sin interfaz que las vincule con la matriz polimérica. Las flechas señalan la presencia de microporos en la matriz polimérica.

En la Fig. 4.5, que corresponde a un sustrato poroso con 20% de Bioglass, se aprecian poros con paredes rugosas; el tamaño de poro es $(12 \pm 6) \mu\text{m}$. La Fig 4.6 destaca la presencia

de partículas de Bioglass de aproximadamente $5\ \mu\text{m}$ distribuidas sobre la matriz porosa sin apreciarse interfaz que las conecte a la matriz polimérica.

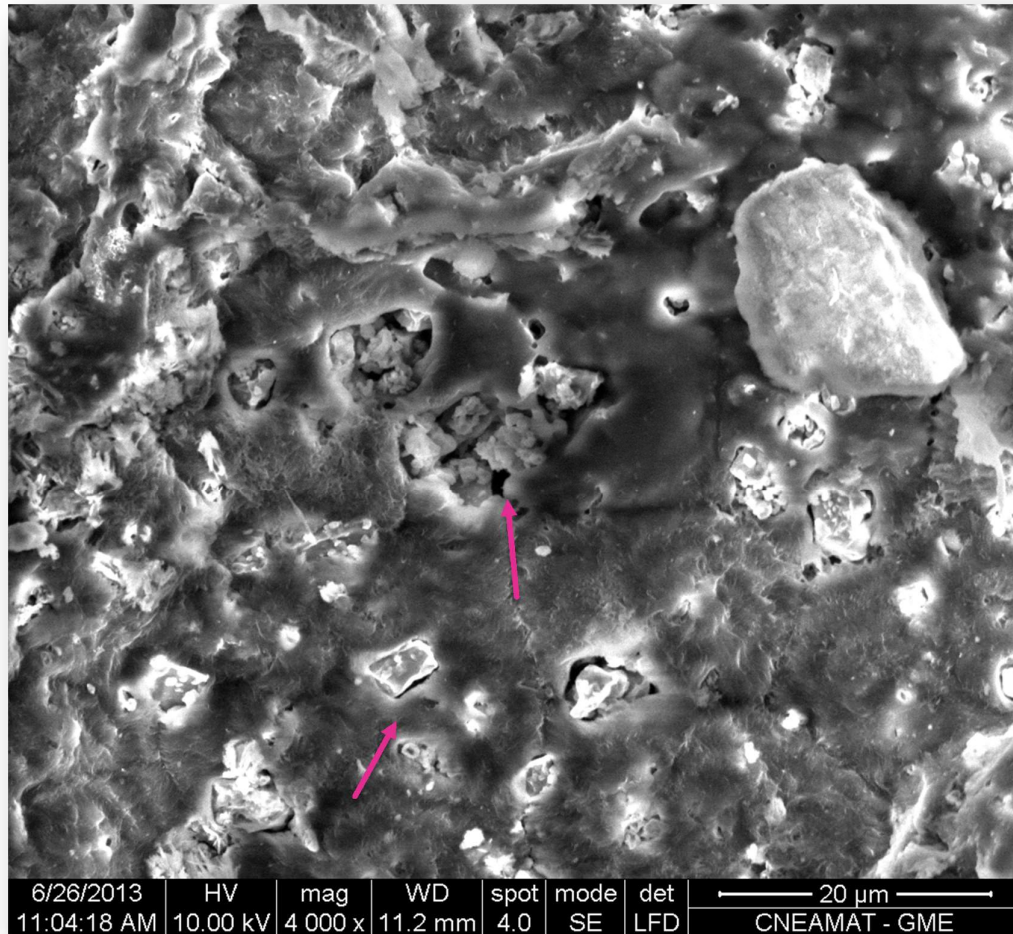


Fig 4.7: Micrografía SEM del sustrato con 40% de Bioglass, 4000 x. Las flechas señalan las partículas de Bioglass agrupadas en conglomerados dentro en la matriz polimérica.

La morfología a mayor concentración de Bioglass presenta micro poros en la matriz polimerica, provoca que las partículas formen aglomeraciones. Estas formaciones sobre la matriz generan poros de $(13 \pm 9) \mu\text{m}$. (Fig. 4.7)

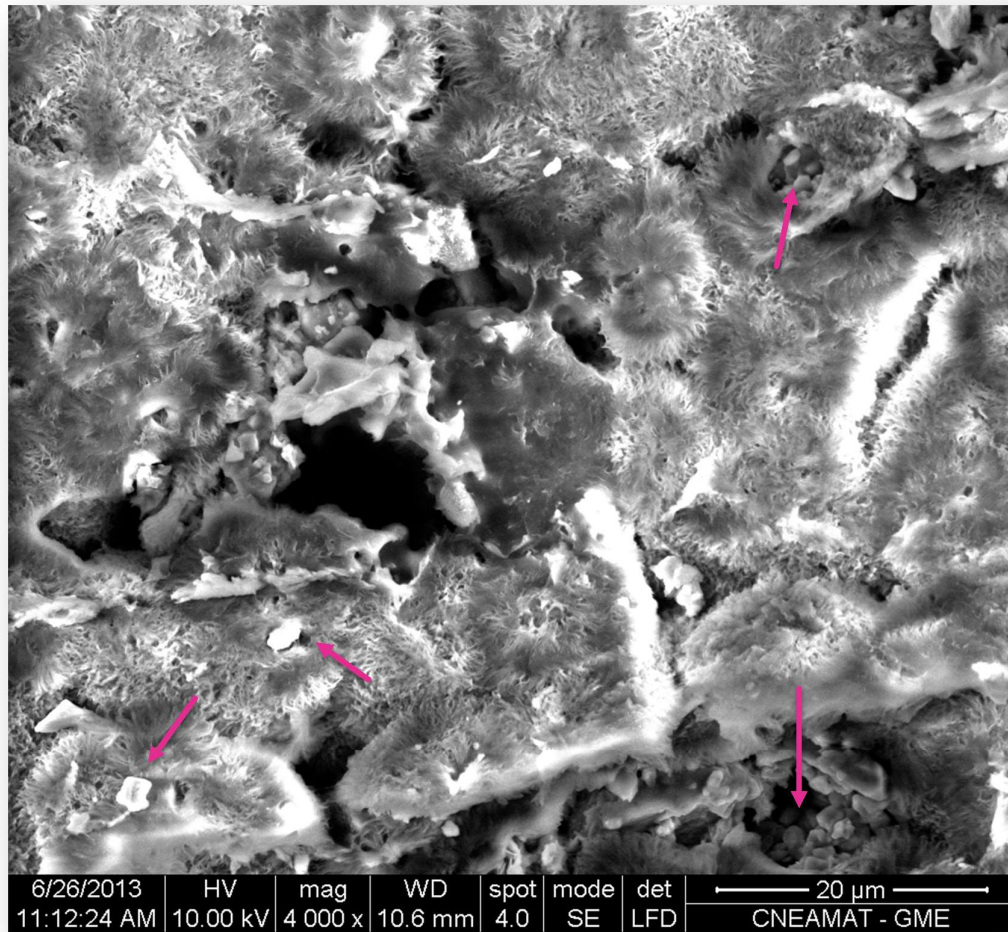


Fig 4.8: Micrografía SEM del sustrato con 60% de Bioglass, 4000 x. Las flechas señalan las partículas de Bioglass agrupadas y partículas suspendidas en la matriz.

Al incorporar 60% de Bioglass el sustrato continúa mostrando el mismo patrón (Fig 4.8) en el que las partículas de Bioglass continúan formando más conglomerados; con algunas partículas dispersas en la matriz. La película presenta un tamaño de poro (7 ± 5) μm . Cabe destacar que se continúa evidenciando la estructura.

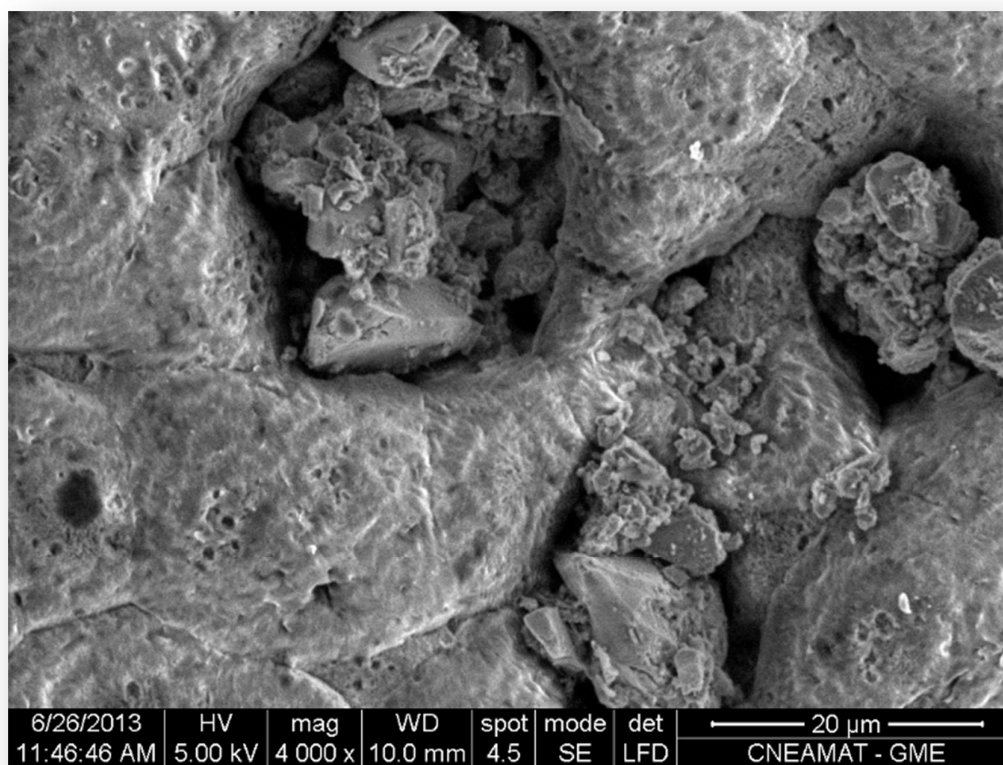


Fig 4.9: Micrografía SEM de un sustrato con 80% de Bioglass, 4000 x. Se puede destacar mayor cantidad conglomerados de partículas y la presencia de microporos en la matriz polimérica.

Al incorporar Bioglass al 80% el sustrato presenta una estructura (Fig 4.9) con una mayor cantidad de aglomeraciones de partículas de Bioglass depositadas de tamaño de

(15 ± 11) μm , sin la presencia de partículas dispersas. Se mantiene la presencia de una topografía rugosa en la matriz.

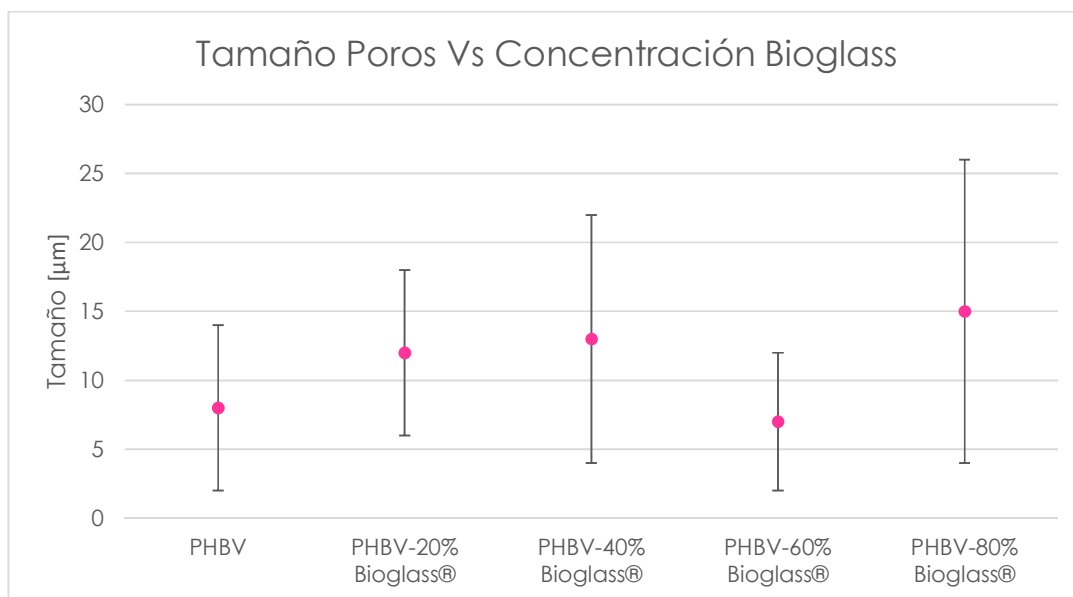


Fig.4.10: Gráfico comparativo del tamaño medio de poros en función del contenido de Bioglass.

Estos resultados muestran que las partículas de Bioglass no interactúan con la matriz polimérica, sino que se aglomeran, posiblemente cuando se las incorpora al polímero en solución. Una vez evaporado el solvente, la matriz polimérica presenta poros asociados al agente porógeno. Además se generan poros de mayor tamaño en torno a los aglomerados de partículas de Bioglass. Una comparación de los valores obtenidos en las mediciones de porosidad promedio indica que la variación del tamaño de poro es aleatoria y no se puede determinar que haya correlación con el contenido de Bioglass debido a la gran dispersión.

5. Caracterización biológica

En este capítulo se presentan los principales resultados de la evaluación de la respuesta de los compuestos de PHBV con diferente contenido de Bioglass en medios biológicos, tanto la biodegradación del compuesto, como el grado de citotoxicidad, la adhesión y proliferación de células cultivadas *in vitro*.

Biodegradación

La complejidad del proceso de biodegradación de un material en vivo, en el cual interactúan mecanismos físico-químicos con biológicos mediados por células y proteínas variables en el tiempo, dificulta la simulación *in vitro*. La inmersión del material reabsorbible en un medio similar al biológico emula cambios morfológicos que se manifiestan y que permite obtener valiosa información respecto al proceso de reabsorción de la matriz.

Este trabajo buscó comprobar la capacidad que tiene el Bioglass para precipitar HA en un medio biológico, empleando la técnica de difracción de rayos X (RX). Por otro lado, un ensayo de biodegradación *in vitro* de largo plazo (12 semanas) permitió evaluar cambios de pH en el medio de cultivo y la pérdida de masa del sustrato. Este trabajo es de largo plazo ya que en los ensayos de rutina se evalúan hasta 4 semanas [\[70, 71\]](#).

Materiales

Se procedió a ensayar películas de PHBV/Bioglass con los porcentajes de composición detallados antes en este trabajo. Las películas fueron de geometría circular (1 cm de diámetro). Fueron esterilizadas en una cámara ambiental (Q-lab modelo QV), que se muestra en la Fig 5.1. Durante un período de una hora con radiación UV (0.5 W/m²). Dicho

equipamiento se encuentra en CNEA constituyentes, en el laboratorio de materiales avanzados.



Fig 5.1: Vista frontal de la cámara ambiental empleada para la esterilización de las películas.

Procedimiento

Cada grupo de muestras se sumergió en 10 ml de agua destilada y filtrada, con un pH inicial 6 a 37°C, dispuestas en tubos Falcon de 15 ml, estériles, (Fig 5.2). Cada condición se ensayó por triplicado. Se empleó agua para evidenciar la influencia de los iones en la formación de HA en comparación con el Buffer fosfato salino, como se describe a continuación.



Fig 5.2 Tubo de ensayo comercial Falcon de 15 ml estéril.

Simultáneamente se realizó otro ensayo en el cual las muestras se sumergieron en buffer fosfato salino filtrado, comúnmente conocido por su sigla en inglés PBS a 37°C.

La solución buffer salina de fosfatos (PBS) se preparó con agua destilada y las sales, que se detalla en la Tabla 5.1 para 1000 ml de solución:

Tabla 5.1 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
Na₂HPO₄	8.1	1.15 g
KH₂PO₄	1.5	0.20 g

Para lograr la solución de PBS se disolvieron las sales en un vaso de precipitados con un agitador magnético en un volumen menor al volumen final del buscado. Se ajustó 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 pH deseado. Por último, se enrasó la solución a 1000 ml en un matraz aforado. La solución se filtra y almacena en heladera a 4 y 8°C.

El montaje de los tubos y todos los protocolos de ensayo se realizaron dentro de una cabina de bioseguridad tipo II (Forma Scientific), como la que se muestra en la Fig 5.3. Una vez armados los tubos en el medio controlado, fueron sellados con cinta teflón y colocados en una cuba térmica marca Vicking a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (Fig 5.4). Los tubos fueron incubados en 4 lotes, que se extrajeron a 4 tiempos diferentes: 3, 6, 9 y 12 semanas.



Fig 5.3: Cámara de bioseguridad empleada para el montaje y realización de los ensayos biológicos. Los mismos se encuentran en el laboratorio de Investigaciones Biológicas de UNSAM.



Fig 5.4: Baño térmico empleado para el ensayo de biodegradación; se lo conectó a un grupo electrógeno para evitar pérdidas de ensayos por corte de electricidad.

Pérdida de peso

El porcentaje de pérdida de peso se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\%W = \frac{W_0 - W}{W_0} * (100)$$

donde W_0 es el peso inicial de la muestra y W el peso seco de la muestra en cada período de ensayo. Para alcanzar el peso seco, las muestras se dispusieron sobre papel absorbente y luego se colocaron dentro de una cámara de vacío por un período de 3 horas.

La evolución de la pérdida de peso de los sustratos sumergidos en agua, y en PBS se ilustra en las Figs. 5.5 y 5.6, respectivamente.

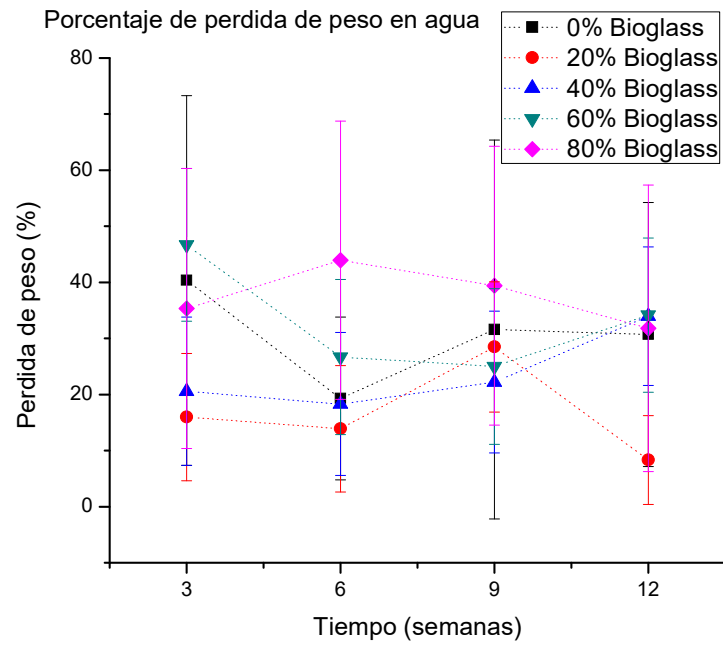


Fig.5.5: Evolución de la pérdida del peso de los sustratos sumergidos en agua. Se muestra el valor medio calculado, con el error correspondiente.

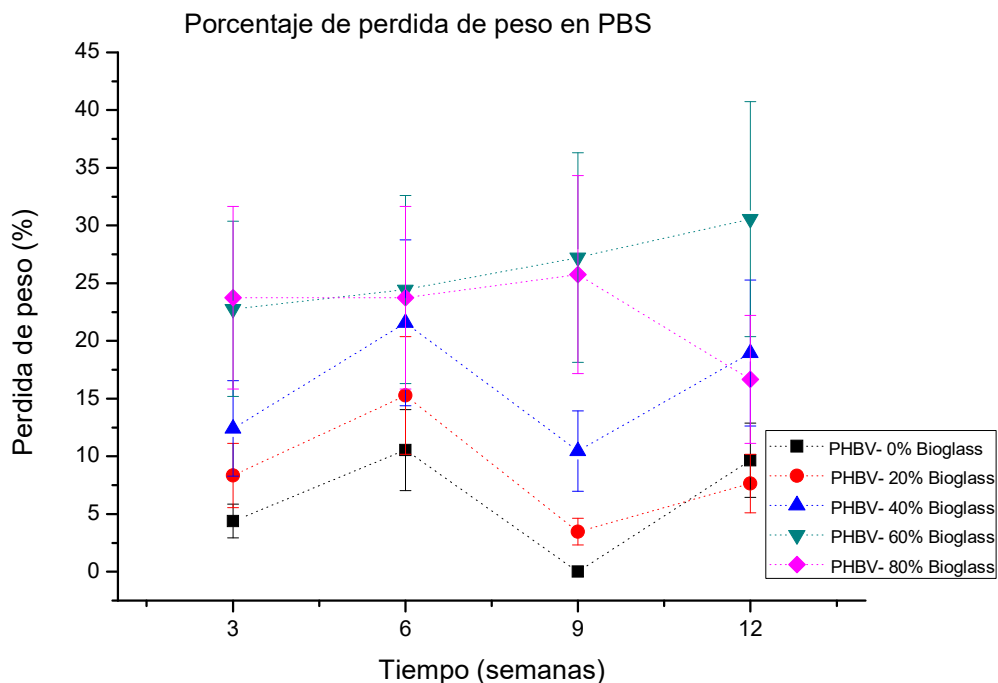


Fig. 5.6: Evolución de la pérdida del peso de los sustratos sumergidos en PBS. Se muestra cada medición con su respectivo error. Las líneas de unión son a fines ilustrativos.

El seguimiento de la cinética de degradación con este método es impreciso y confuso, ya que conlleva un gran error de medición próximo al 50%. Sin embargo, es posible determinar que cuando las muestras son sumergidas en PBS se incrementa la pérdida de peso a medida que aumenta el porcentaje de Bioglass en la muestra, hasta el 60%, la muestra con mayor contenido de Bioglass prácticamente se mantiene invariante dentro del error de medición, este detalle se observa, con mayor énfasis en la Fig 5.6. Mientras que las muestras sumergidas en agua el contenido de Bioglass en las muestras no es un factor importante en la cinética de degradación, ya que todas las muestras muestran un comportamiento aleatorio. Esta diferencia de comportamiento estaría dando un indicio sobre la interacción de los componentes en un medio salino similar al biológico.

Cambios de pH

Se realizó la medición del pH de los medios, empleando un pHmetro comercial (Adwa AD 11). Calibrado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante antes de cada medición.

Las mediciones realizadas en agua muestran un incremento marcado en el pH en las tres primeras semanas (Fig 5.7). Luego, se observa una paulatina disminución, excepto para el sustrato sin Bioglass donde sólo se aprecia la disminución del pH.

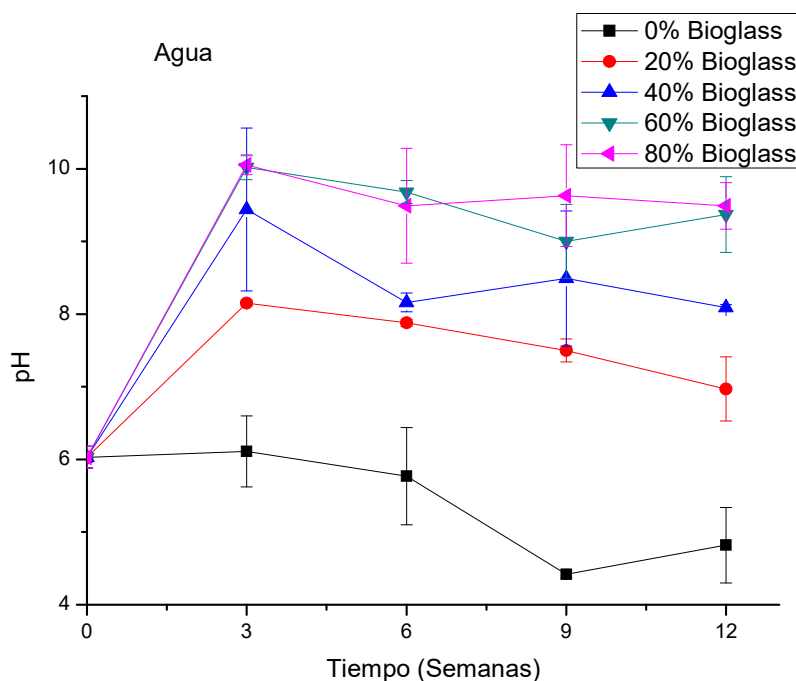


Fig 5.7: Variación del pH en el agua donde se encontraban sumergidos los sustratos. Las líneas que unen los puntos son solamente ilustrativas.

La biodegradación de los sustratos en PBS se produce cuando el buffer es capaz de sostener el pH frente a la acidificación que produce la degradación del PHBV y la alcalinización debida al Bioglass, hasta un 40% del agente bioactivo. Para concentraciones superiores de Bioglass, se produce un incremento en el pH en las primeras tres semanas, aunque mucho menor que se manifiesta para las muestras degradadas en agua. Esto refleja claramente que el primer incremento se debe a la disolución del Bioglass mientras que la disminución corresponde a la formación de los ácidos originados en la degradación del PHBV. (Fig. 5.8)

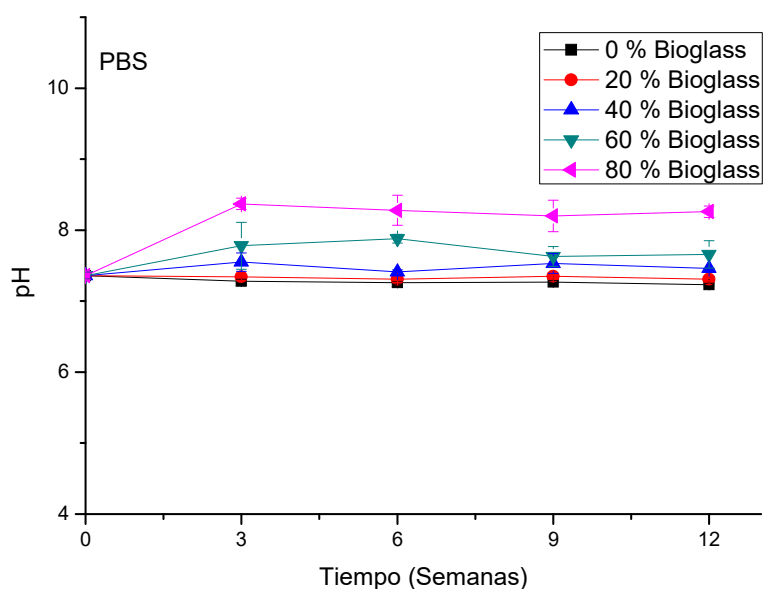


Fig. 5.8: Evolución del pH del PBS en el que se disponen sustratos para su biodegradación. Las líneas en el grafico solo sirven para guía visual.

En ambos casos se evidencia que la disolución del material bioactivo se produce a velocidades mayores que la del polímero. El aspecto determinante es que el buffer PBS no puede contrarrestar el aumento del pH que asciende a valores que producirían reacción

hostil para las células del tejido a reparar. Luego, el pH se estabiliza por los ácidos liberados por el polímero, como fue mencionado en un principio.

Formación de hidroxiapatita carbonada

La formación de hidroxicarbonato de apatita (HCA), también llamada hidroxiapatita carbonada, se evaluó sólo en las muestras sumergidas en PBS, ya que los iones en solución son indispensables para la formación de la capa de HCA como se detalla en el Apéndice 1. Para la determinación de la presencia de HCA en las muestras se realizaron difractogramas de rayos X, con un difractómetro Panalytical (Modelo Empyrean) con detector PIXCEL3D, del Laboratorio de Difracción de Rayos X, del Departamento de Física de Materia Condensada, Gerencia de Área de Investigación y Aplicaciones No Nucleares, GALyANN – CAC – CNEA.

Las condiciones de medición fueron barrido angular 2θ (ángulo entre el haz incidente y el detector) de 10° y 70° , con un paso de 0.03° y un tiempo de barrido de 5 segundos. La intensidad de los difractogramas fue normalizada, tomando como referencia el pico presente al valor de ángulo $2\theta = 13^\circ$, que es un pico característico del PHBV.

Las Figs. 5.9 a 5.13 muestran los cambios en los difractogramas a medida que transcurre el tiempo de incubación, para las muestras sin Bioglass y con 20, 40, 60 y 80% del componente bioactivo. El rótulo de cada uno de los difractogramas indica en primer término el instante de tiempo en que fueron retiradas las muestras de la cuba térmica: 0, sin sumergir; 1, 2, 3 y 4 corresponden a 3, 6, 9 y 12 semanas de incubación. En segundo lugar el rótulo del difractograma presenta el nombre del sustrato, conforme al contenido de Bioglass que posee (Tabla 5.2).

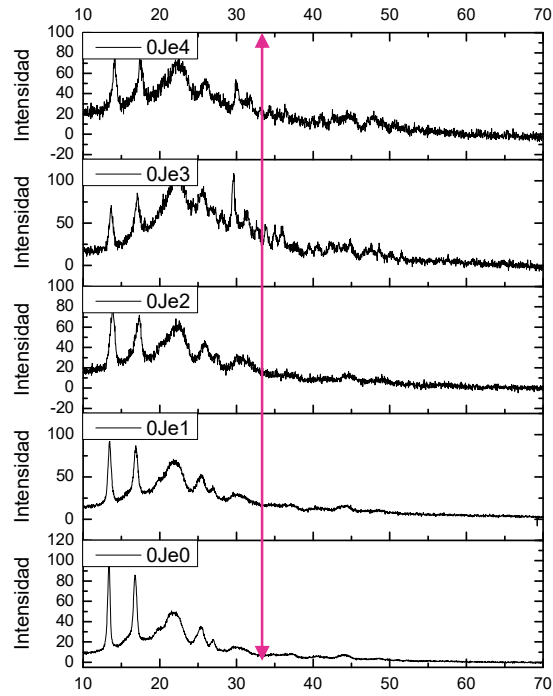


Fig 5.9: Difractogramas tomados en las muestras con las diferentes concentraciones de Bioglass sin haber estado incubados, instante inicial.

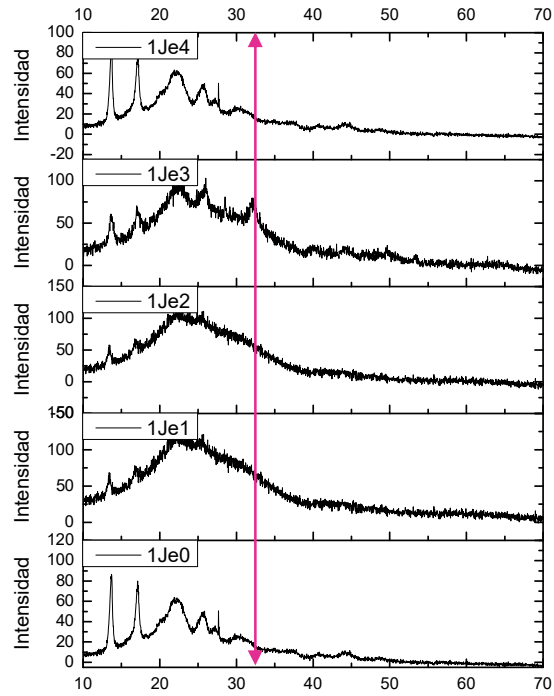


Fig 5.10: Difractogramas tomados en las muestras con las diferentes concentraciones de Bioglass luego de haber sido incubadas durante tres semanas.

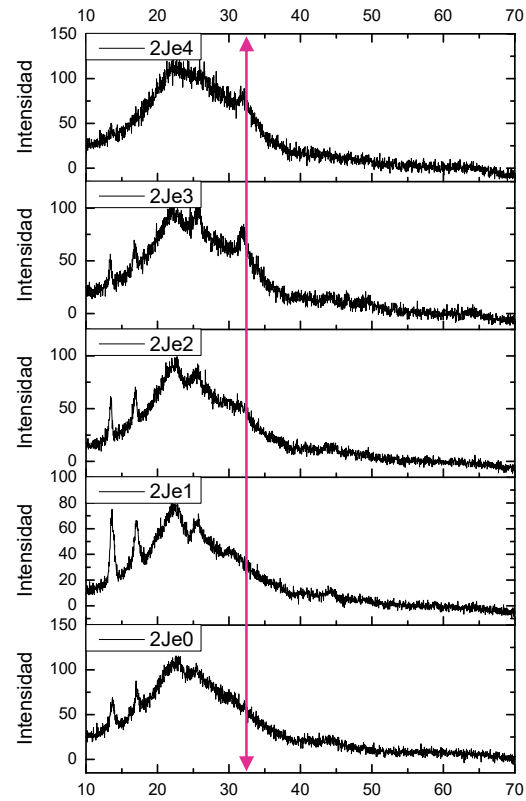


Fig 5.11: Difractogramas tomados en las muestras con las diferentes concentraciones de Bioglass luego de haber sido incubadas durante seis semanas.

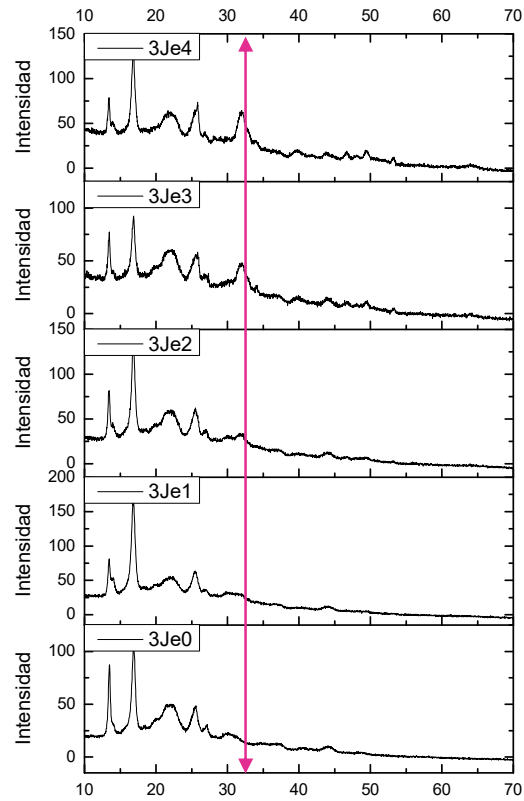


Fig 5.12: Difractogramas tomados en las muestras con las diferentes concentraciones de Bioglass luego de haber sido incubadas durante nueve semanas.

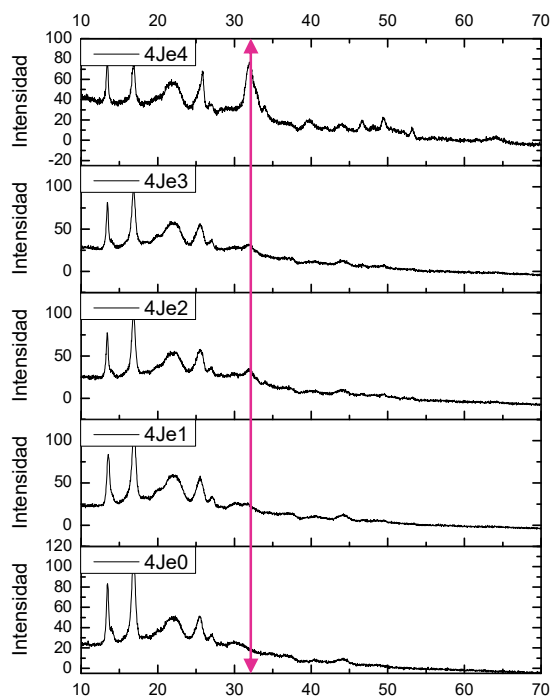


Fig 5.13: Difractogramas tomados en las muestras con las diferentes concentraciones de Bioglass luego de haber sido incubadas durante doce semanas.

Para evaluar la cinética de formación de HA se toma como referencia el pico presente a 32° ya que es el más intenso según el patrón de la HA (Apéndice 2). La Tabla 5.2 presenta una comparación de la amplitud de ese pico en función del tiempo de incubación en PBS y la Fig 5.14 muestra que a mayor el contenido de Bioglass en la muestra siempre es mayor el contenido de HCA.

TABLA 5.2: Comparación del valor de la intensidad del pico característico de la HAC en función de la proporción de Bioglass presente en la muestra y el tiempo transcurrido de incubación.

	Tiempo de incubación [Semanas]				
	0	3	6	9	12
0	15,2	16,8	62,01	15,5	17,8
20	21,7	71,14	36,01	30,7	21,9
40	20,6	60,72	55,09	33,2	30,1
60	31,9	79,59	82,29	48,7	31,8
80	29,8	21,8	85,74	64,6	77,1

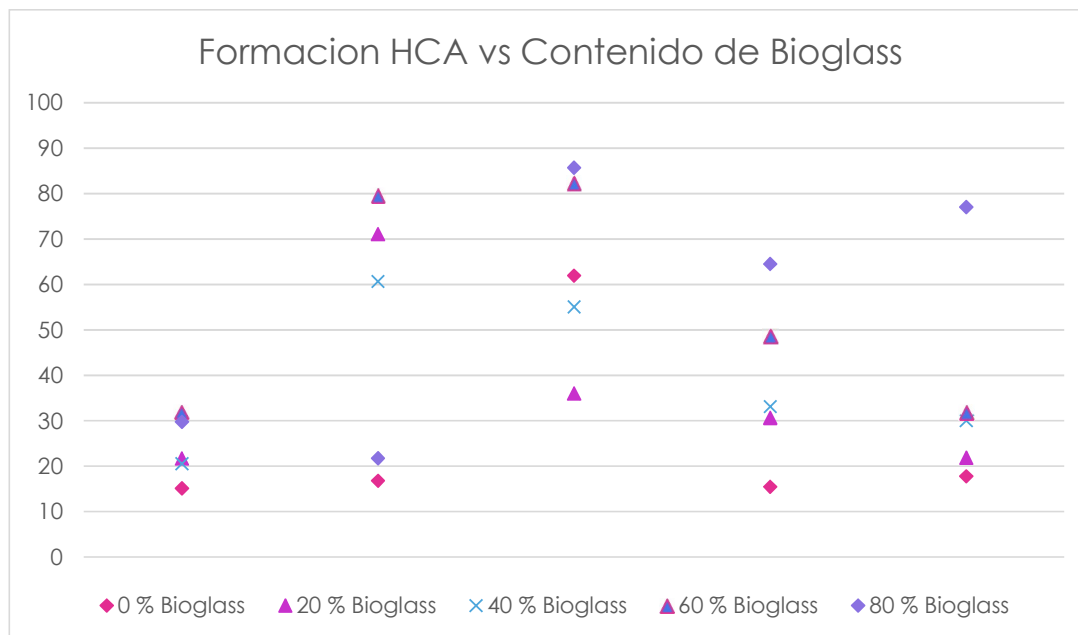


Fig 5.14: Comparación de la intensidad del pico característico de HCA con el porcentaje de Bioglass presente en la muestra según el tiempo de incubación.

En esta comparación es destacable la influencia del Bioglass en la formación de HAC, ya que se ve cómo la intensidad de los picos característicos de la misma son mayores para un mismo instante de tiempo, a medida que crece la concentración del componente activo de la muestra. Se destaca el comportamiento de la muestra con 0% de contenido en el que

a partir de la sexta semana se observa un proceso general de amorfización de la superficie. Eso queda en evidencia con la desaparición de los picos característicos. En lo que respecta a lo sucedido a las tres semanas de incubación, se observa que prácticamente el valor obtenido es el mismo que para cero tiempo de incubación, con lo que se podría deducir que aún no hay una cantidad significativa de HA en esta muestra.

Citotoxicidad

El estudio de la biocompatibilidad in vitro de estos sustratos de PHBV/Bioglass se requirió un modelo de por fibroblastos de piel humana. Este ensayo permite estudiar el efecto tóxico de un biomaterial sobre un tipo determinado de células. La adhesión y la proliferación son comportamientos celulares indicadores de la funcionalidad celular.

Materiales

Films de PHBV/Bioglass: se usaron con diferentes porcentajes de Bioglass, (0%-20%-40%-60%-80%) con la finalidad de estudiar el efecto biológico de las partículas de Bioglass. Se emplearon films cuadrados de 0.8 mm de lado y 100 μ m de espesor, cada condición se ensayó por duplicado. Se esterilizaron empleando el mismo método comentado anteriormente. Como medio de cultivo se empleó la marca comercial DMEM, suero fetal bovino, 5% NATOCOR y antibiótico 1%. Se usó para la determinación de citotoxicidad fibroblastos NIH 3T3 como línea celular.

Citotoxicidad indirecta

PROCEDIMIENTO

El ensayo se realizó de acuerdo a un método estándar internacional, de acuerdo a la norma ISO10993-5 *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*.

La norma de detalla el método de ensayo a analizar, los controles positivos y negativos, sobre látex, teflón® y gasa. Cada condición se ensayó por duplicado. Para obtener los extractos se colocó el material en medio de cultivo en una relación de área de material (cm²)/medio de cultivo (ml) de 6/1, que se incubará a 37°C con 5% CO₂ durante 72 hs.

Una vez realizados los extractos, se cultivó células en un multivaso por 24 hs, sumergidas en los mismos (Fig 5.15). Se pusieron en contacto fibroblastos con diferentes diluciones de los extractos: extracto puro, al medio, al cuarto, al octavo y al dieciseisavo.



Fig 5.15: Imagen representativa del proceso de siembra en multi Wells.

EVALUACIÓN CUALITATIVA

La evaluación cualitativa consistió en la observación directa de las células al microscopio y la estimación del grado de toxicidad según lo estipulado en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Escalas de evaluación de citotoxicidad para método de contacto directo.

Escala	Observación
0	No hay cambios significantes de las células en la proximidad de la muestra. Presencia de gránulos intracitoplásmicos discretos, no se evidencia lisis celular.
1	No más del 20% de las células son redondas, ligeramente pegada, con gránulos intracitoplásmicos; ocasional lisis celular
2	No más del 50% de las células son redondas; extensa lisis celular y áreas vacías
3	No más del 70% de las capas de células contiene células redondeadas y / o muertas
4	Destrucción casi completa de las capas de células

RESULTADOS

En las Fig 5.16 y Fig 5.17 se pueden observar las micrografías tomadas una vez finalizado el ensayo. En todos los casos se observa la capsula confluyente, sin cambios en la morfología normal de los fibroblastos. Se evidencian vacuolas, pero no una cantidad ni tamaño significativo.

EVALUACIÓN CUALITATIVA

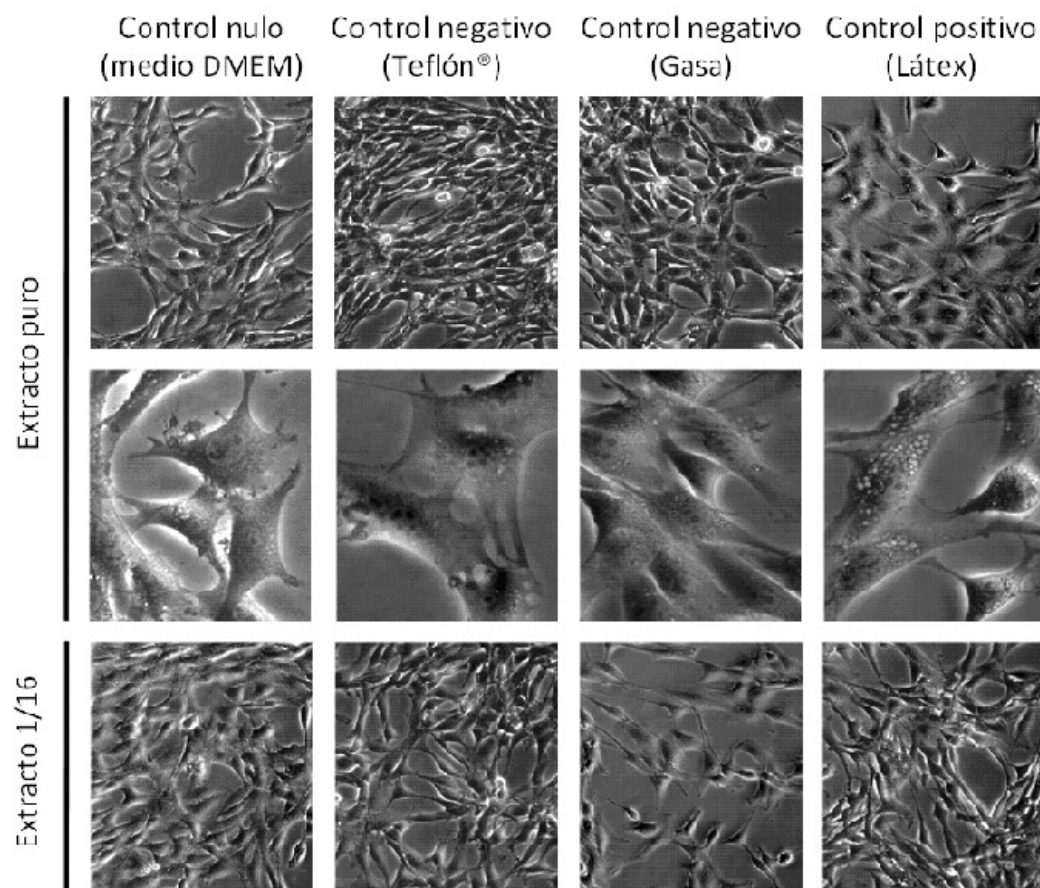


Fig 5.16: Micrográficas ópticas de contraste de fase, tomadas con un aumento de 25x.

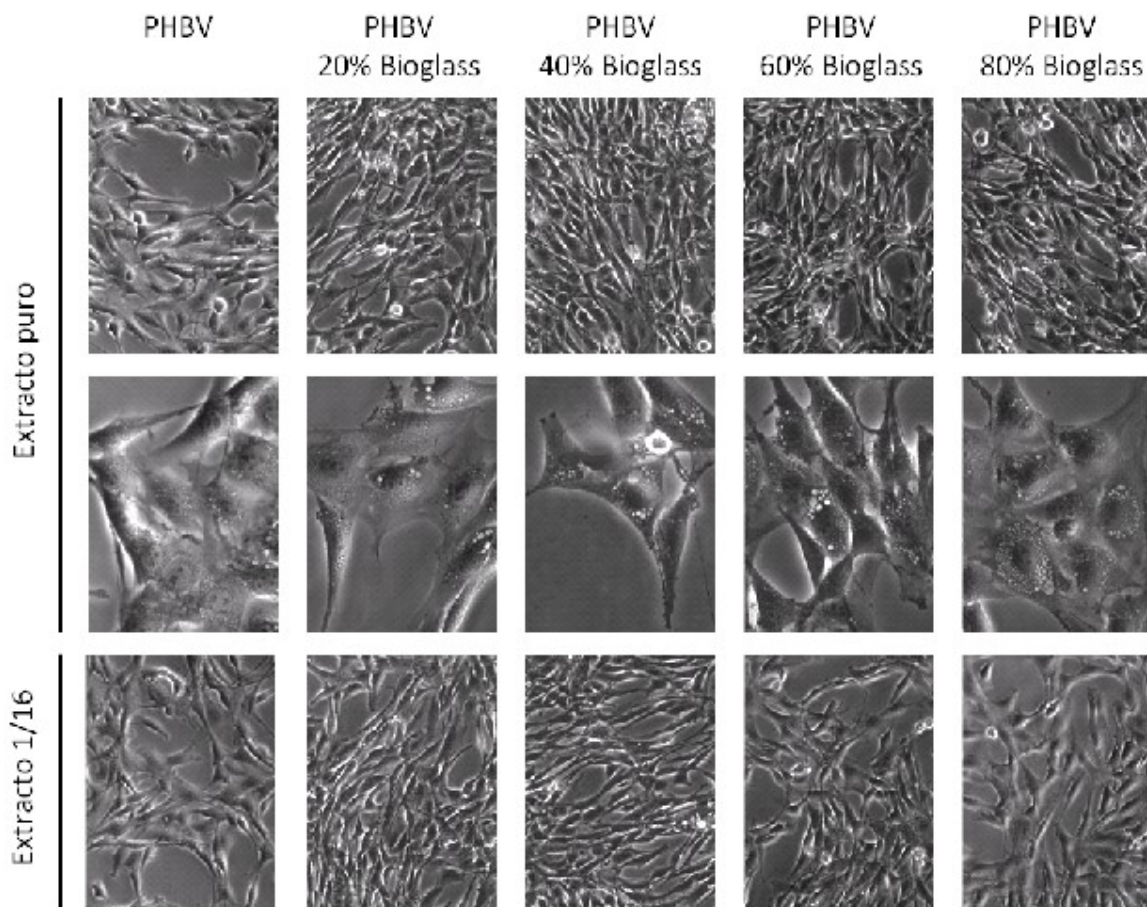


Fig 5.17: Micrográficas ópticas de contraste de fase, tomadas con un aumento de 25 x.

Siguiendo con el estipulado en la norma, se determina lo que se observa en la Tabla 5.4. De la misma deducimos que en la valoración cualitativa, como se considera un efecto citotóxico si se obtiene un grado 2 o superior en la valoración, el ensayo cualitativo da carácter no citotóxico a los compuestos de PHBV/Bioglass, para cualquier composición.

Tabla 5.4:

Sustrato	Grado
PHBV	1
PHBV 20% Bioglass	1
PHBV 40% Bioglass	1
PHBV 60% Bioglass	1
PHBV 80% Bioglass	1

Resultados cualitativos del ensayo de citotoxicidad indirecta.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Existen varios métodos conocidos y validados para la determinación de la toxicidad: captación de rojo neutro, reducción del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil – 2 – tiazolil) – 2,5 – difeniltetrazolico), colorante vital, entre otros. Dichos ensayos dan un índice de la toxicidad del compuesto mediante los mecanismos que se detallan a continuación:

- ⌚ Ensayo de captación de rojo neutro: da una medida de la toxicidad de un compuesto, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro es captado por las células y en medida que pierden viabilidad se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior [\[72\]](#).
- ⌚ Reducción de MTT: el MTT es captado por las células y reducido por una enzima mitocondrial a su forma insoluble. El producto queda retenido en las células. Se puede cuantificar la reducción de MTT mediante una técnica colorimétrica, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul [\[73\]](#).

- ⌘ Colorante vital (Trypan Blue): este colorante es absorbido selectivamente por células o tejidos muertos. Esta virtud radica, en que las células vivas son muy selectivas con los compuestos que dejan pasar a través de sus membranas. Sin embargo, una célula muerta no ofrece ningún tipo de limitación para evitar que el Trypan Blue atraviese la membrana. Por este motivo, las células muertas se evidencian por tener su membrana coloreada de azul [\[74\]](#).

En este trabajo se procedió a la evaluación de la viabilidad celular mediante el colorante vital ya que se trata de una técnica más rápida, de más fácil realización y con un resultado fiable al evaluar los daños ocasionados de una forma objetiva y cuantificable.

La solución con la cual se procedió a la tinción de las células está formada por dos compuestos:

- ⌘ Compuesto A: Colorante comercial marca Gibco, en solución 0.5% en agua bidestilada, filtrado 0.2 μm .
- ⌘ Compuesto B: solución de NaCl al 4.25% en agua bidestilada, filtrado 0.2 μm .

La proporción de la solución empleada fue de cuatro partes de compuesto A por una parte de compuesto B. Esta solución fue colocada directamente sobre el cultivo celular y se dejó actuar por un periodo de 1 minuto. Se absorbió con micropipetas el sobrante de la solución sobre la muestra y se observó las muestras en un microscopio de contraste invertido.

Los valores obtenidos se procesaron para poder realizar esta comparación. Se consideró como el 100% de efecto nocivo al efecto que presentó el látex durante los ensayos, al extracto puro, normalizándose los valores obtenidos bajo ese patrón. La valoración cuantitativa consideró que un valor superior a 30% de células muertas se tiene efecto citotóxico. Entonces, se podría estimar que ninguno de los andamios en este ensayo presenta ese tipo de comportamiento, como se ilustra en la Fig 5.18.

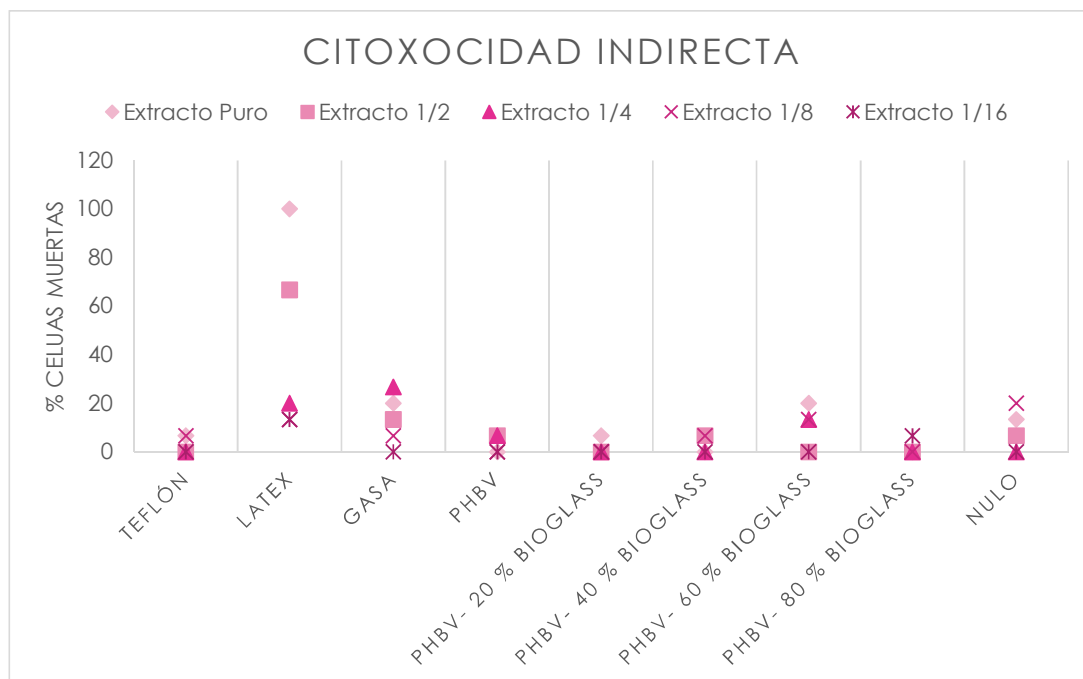


Fig 5.18: Resultados cuantitativos de citotoxicidad indirecta. Se compara % células muertas en los diferentes sustratos evaluados.

Citotoxicidad directa

Se siguieron los procedimientos estándares descritos en ISO 10993-5 para probar la citotoxicidad mediante método de contacto directo.

PROCEDIMIENTO

Este ensayo se dispuso de un conjunto de células viables y confluentes, para ello se sembró en cada pocillo una cantidad de 200 mil células y se lo dejó en un incubadora con medio controlado a 37C° y 5% CO₂, durante las 24 horas. Se observaron las células en el microscopio invertido y se corroboró su estado.

Una vez asegurado el estado de las células se colocaron los materiales a ensayar delicadamente, procurando que quede depositado en el centro geométrico de cada pocillo ya que es en ese lugar que se depositan la mayor cantidad de células. La deposición de las películas se realizó con pinzas estériles. Cada muestra se ensayó por duplicado.

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Se dejó reposar los pocillo con las muestras en un medio controlado después de las 24 hs de incubación se retiraron cuidadosamente las muestras y se tomaron fotografías con microscopio invertido Nikon TE2000, que posee una cámara térmica Hamamatsu ORCA ER y ofrece la posibilidad de mantener las muestras a una temperatura de 37°C.

Es posible observar la mayor presencia de estrés celular se da con el control negativo (Fig. 5.19) como era de esperarse. La alteración que el Bioglass produce en la monocapa de fibroblastos es una destrucción de la monocapa y la lisis celular completa (Fig. 5.20).

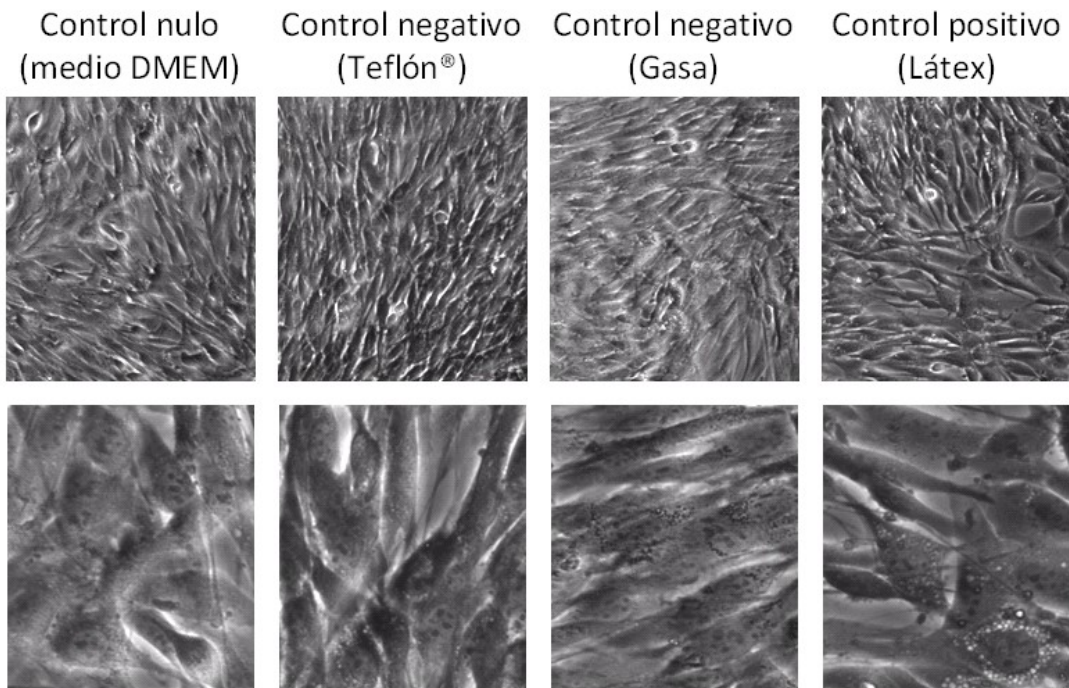


Fig 5.19: Micrográficas ópticas obtenidas con un aumento 25x

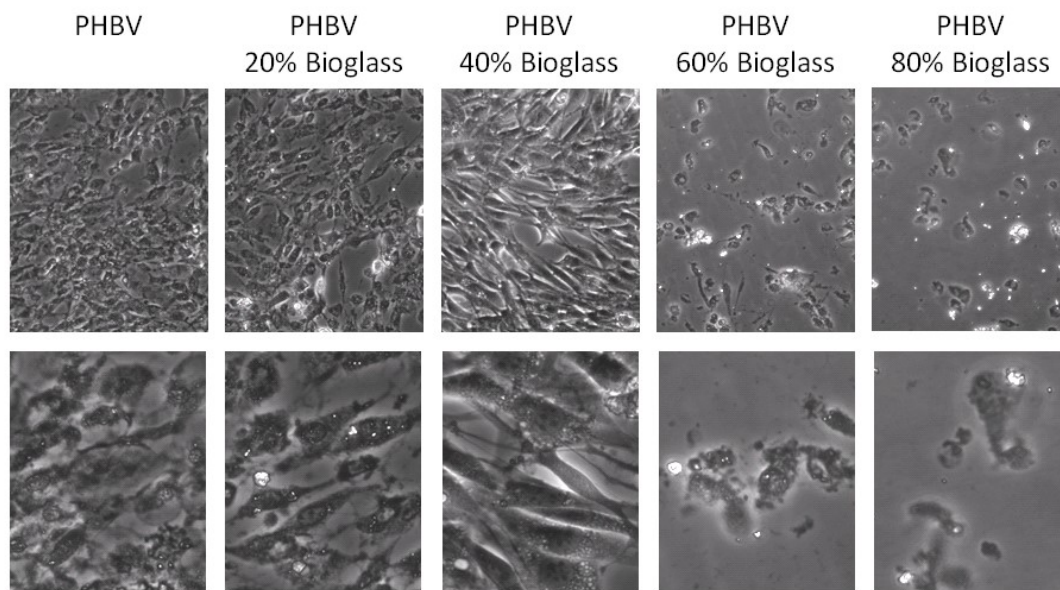


Fig 5.20: Micrográficas ópticas obtenidas con un aumento 25x.

De manera cualitativa y teniendo en cuenta lo tabulado en la norma (Tabla 5.3) se consideró lo que se puede observar en la tabla 5.5.

Tabla 5.5: Resultados cualitativos del ensayo de citotoxicidad directa.

Sustrato	Grado
PHBV	1
PHBV 20% Bioglass	1
PHBV 40% Bioglass	1
PHBV 60% Bioglass	4
PHBV 80% Bioglass	4

La valoración cualitativa se establece un efecto citotóxico de grado 2 o superior en la tabla. Por lo tanto, el ensayo cualitativo da carácter no citotóxico a los compuestos de PHBV/Bioglass con composición menor al 40 %.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Una vez realizada la tinción de las células, siguiendo el procedimiento detallado anteriormente, se procedió al recuento celular, empleando la misma técnica. Los resultados se presentan en la Fig 5.21.

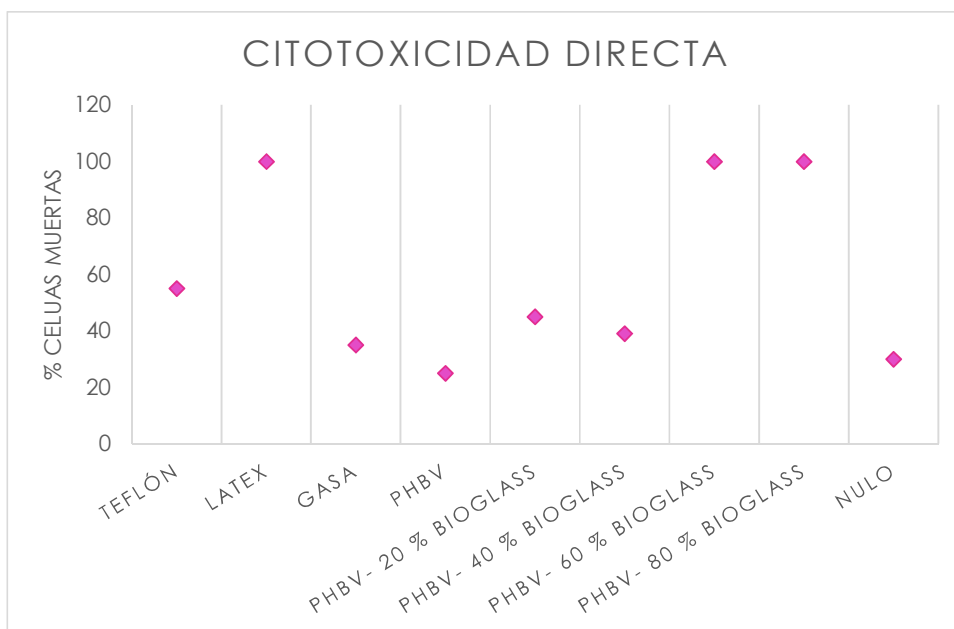


Fig 5.21: Resultados cuantitativos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad directa a través del análisis directo a microscopio.

Estos resultados, correspondientes a las células muertas en contacto directo con los sustratos, están totalmente correlacionados con los determinados para las células en contacto con

los extractos, ilustrados en la Fig. 5.21. A partir de estos resultados se pueden emplear las muestras elaboradas con a lo sumo 40% de Bioglass.

Adhesión y Proliferación

La adhesión celular es el proceso mediante el cual la célula se ancla a un sustrato y condiciona en gran parte eventos como la proliferación y la diferenciación. Por lo tanto, los resultados de citotoxicidad, adhesión y proliferación dan una buena idea sobre el tipo de respuesta que se podría esperar al utilizar el biomaterial in vivo. Los protocolos seguidos para la realización de estos estudios son los obtenidos a través de pruebas empíricas elaboradas en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO

Antes de realizar la siembra celular se procedió a recubrir el fondo de los pocillos con albúmina sérica bovina (BSA), marca Sigma-Aldrich, desnaturalizada por 24 hs. La misma se preparó en solución con PBS 10 mg/ml. Luego, se esterilizó con filtro 0.22 μm en la cabina de bioseguridad y se conservó en heladera a 4°C, posteriormente se desnaturalizó la proteína sometiéndola a 85°C por 10 minutos hasta que la solución se torna opaca. Se deja a temperatura ambiente y se conserva a 4°C en heladera hasta su uso. El motivo de este recubrimiento se basa especialmente en evitar que el crecimiento celular sea sobre el pocillo y sí sobre el sustrato únicamente. El multivaso con BSA desnaturalizada se mantuvo en freezer por 24 hs.

Pasado ese tiempo se procedió a la siembra de fibroblastos sobre el sustrato a evaluar (Fig. 5.22). Se empleará como control positivo, directamente un well sin sustrato alguno.



Fig 5.22: Esquema del protocolo de ensayo, donde se observa el well con las células sembradas en el fondo sobre el sustratos y recubiertas por el medio de cultivo.

Se dejó las muestras incubar en un medio controlado por un período de 72 hs, entre los cuales solo se intervino para cambiar el medio de cultivo. Pasado ese lapso de tiempo se procederá a la tinción y fijación de las muestras para su ulterior análisis.

Para realizar la tinción celular se emplearon dos tipos de procesos y así se posibilitó la visualización de las membranas y de los núcleos celulares, respectivamente. Primero se comenzó con la tinción de las membranas celulares y empleando colorante comercial (Vybrant DIO INVITROGEN) en dilución 1:200 con medio de cultivo. El procedimiento (detallado por el comerciante) fue recubrir cada well con 200 μ l y se dejarla en estufa por 20 minutos. Luego, se procedió al lavado de las muestras con PBS y se dejó reposar las mismas 10 minutos en la incubadora con el fin de no modificar la morfología celular.

Luego, se procedió a la fijación en paraformaldehído (PF) al 3.5% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se tiñeron los núcleos celulares con colorante DAPI solución 1:3000 en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se montan los vidrios y se conservan a 4°C hasta la visualización en microscopio.

Teniendo en cuenta que en el ensayo de citotoxicidad realizado previamente los sustratos con mayor cantidad de Bioglass, 60% y 80%, producían lisis total en la monocapa

celular a las 24 hs de incubación, el ensayo de adhesión y proliferación se descartó en esos casos.

RESULTADOS

Una secuencia de imágenes es registrada por cada sustrato, entre las cuales la de coloración celeste es la obtenida con el filtro para ver únicamente núcleos (colorante DAPI) y la de coloración verde muestra las membranas de células (colorante DiO). (Fig 5.23-5.26)

Sustrato PHBV 0% Bioglass

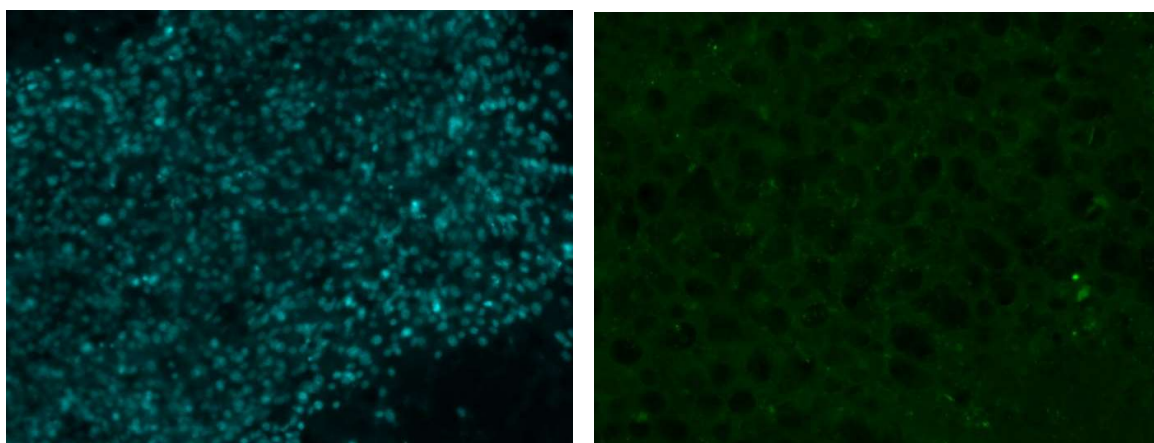


Fig. 5.23: Imagen obtenida con un aumento 10x, se muestra la misma zona con diferentes colorantes para núcleos y membranas celulares.

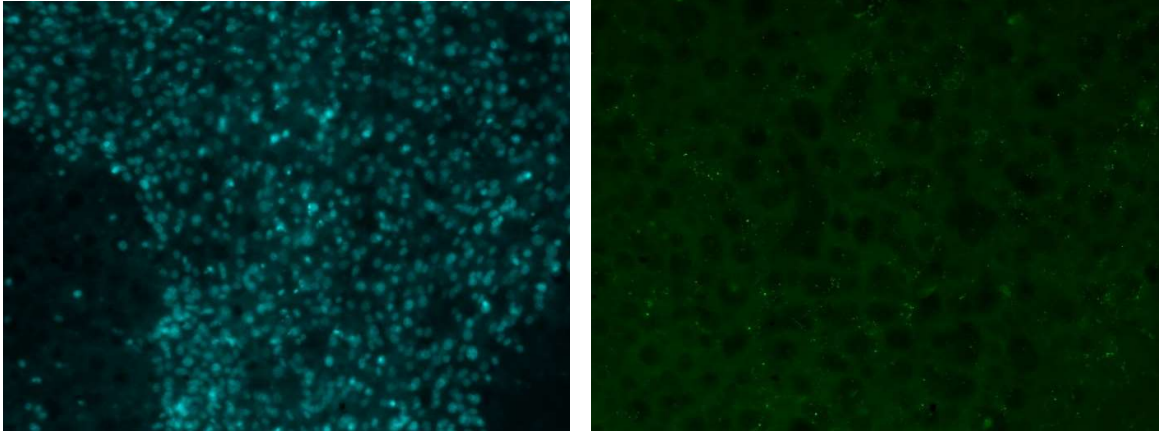


Fig. 5.24: Imagen obtenida con un aumento 10x, se muestra la misma zona con diferentes colorantes vitales. Se evidencia la monocapa de fibroblastos que se encuentra distribuida por casi la totalidad del sustrato.

Sustrato PHBV 20% Bioglass

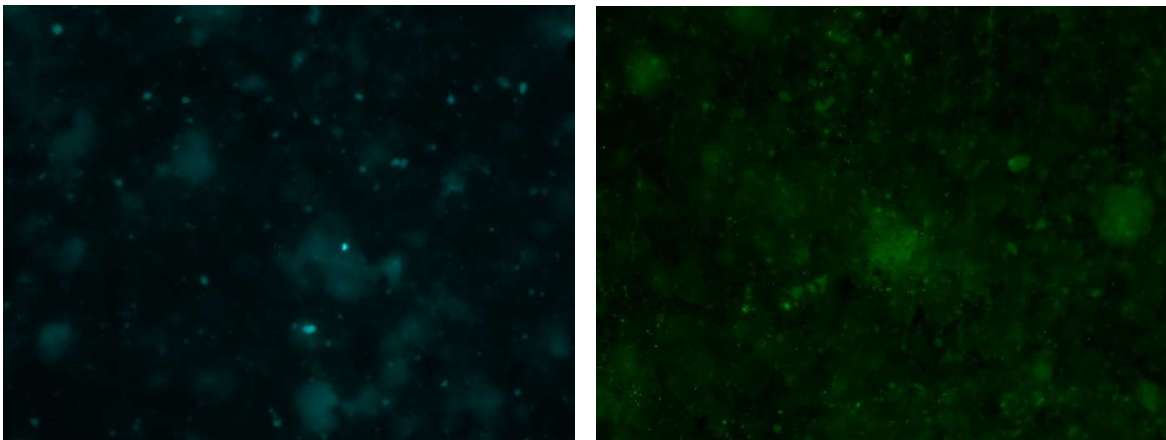


Fig. 5.25: Imagen obtenida con un aumento 10x, se muestra la misma zona con diferentes colorantes vitales. Se observan células dispersas y sin la formación de una monocapa.

Sustrato PHBV 40% Bioglass

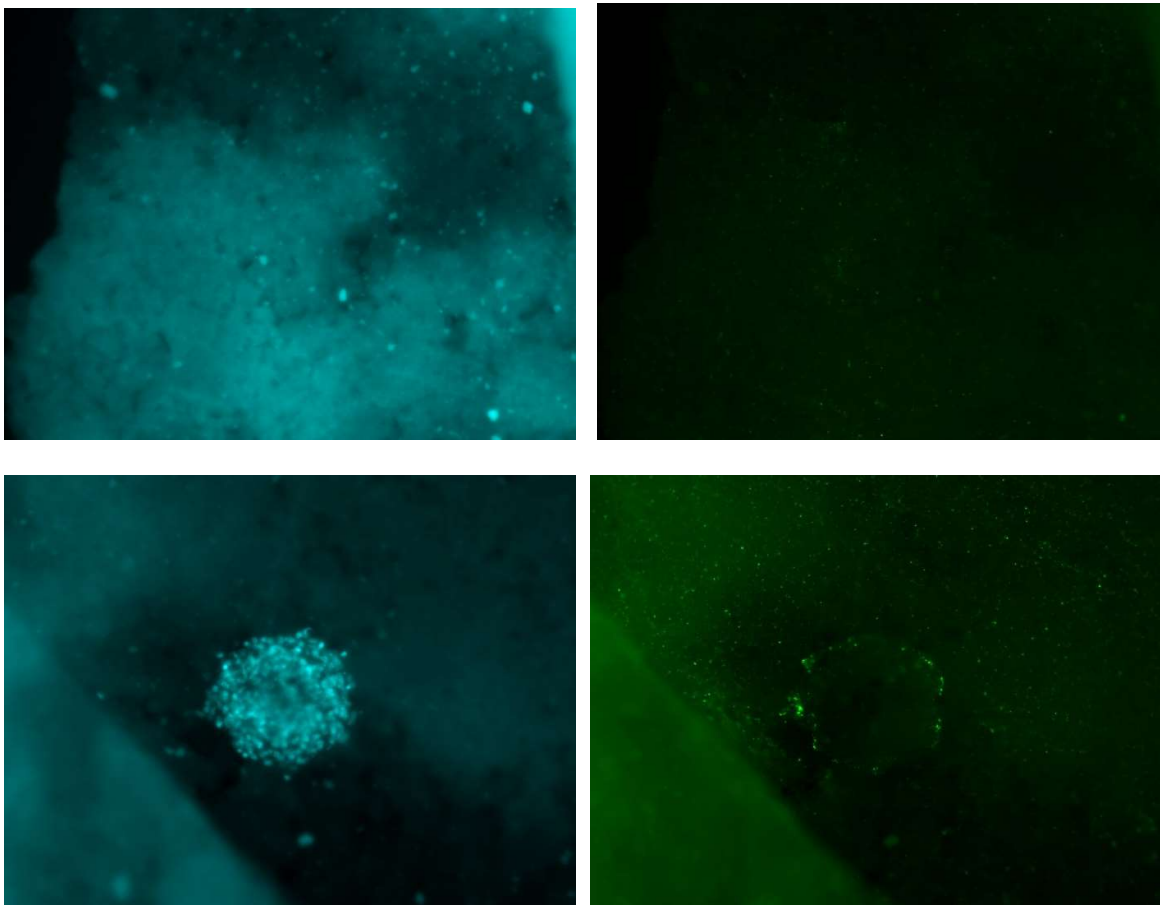


Fig. 5.26: Imagen obtenida con un aumento 10x, se muestra la misma zona con diferentes colorantes vitales para mostrar el núcleo y las membranas. Se observa una pequeña colonia de fibroblastos encontrada sobre el sustrato.

El sustrato sin Bioglass no altera de manera significativa la adhesión y proliferación de los fibroblastos, pero en los casos en los que había partículas del componente activo, algunas células se adhirieron a la película pero no colonizaron, solo se observaron pequeñas colonias aisladas.

6. Discusión y Conclusiones

La ingeniería de tejidos es un área de investigación, que se está ampliando a grandes pasos en los últimos tiempos, motivada por el avance del estilo de vida de la sociedad y por los requerimientos de la misma. Al extenderse la expectativa de vida, y fomentar así la aparición de enfermedades degenerativas de los tejidos se incrementa de manera proporcional las necesidades, de incumbencia de la ingeniería de tejidos. El avance de la ciencia de los materiales los biomateriales más prometedores son los PHA que proveen microorganismos, se descomponen en productos no tóxicos junto y las demás características ya mencionadas. Estos se convierten en la matriz ideal para biocompuestos prometedores. La adhesión de productos activos para optimizar la interfase con los tejidos y para disminuir el tiempo de recuperación del mismo, sigue siendo una de las opciones más utilizadas.

Este trabajo tuvo por objeto de fabricar sustratos bi y tridimensionales con materiales compatibles para la regeneración ósea y caracterizar su morfología, citotoxicidad y biodegradación in vitro. A partir de resultados previos registrados en la bibliografía y considerando trabajos previos del grupo de investigación en el que desarrollé esta labor, se utilizó a PHBV como polímero reabsorbible y al Bioglass como componente activo que favorece la osteocompatibilidad.

La realización de las películas bidimensionales requirió el proceso de evaporación de solventes presentes en una emulsión de la solución de PHBV, disuelto en cloroformo y agua, a la que se adicionó Bioglass en diferentes proporciones. Se obtuvieron películas continuas, de fácil manipulación que se adaptaron a los requerimientos de porosidad y respuesta mecánica compatibles con el tejido óseo. Cabe señalar que este procedimiento de fabricación cuenta con la ventaja que puede controlar el tamaño de poro, uno de los factores fundamentales para lograr la adhesión y proliferación celular. Sin embargo, para

un posible escalado de producción industrial se deben ajustar los parámetros del proceso de mezcla de la emulsión, en función del tamaño de lote.

Los andamios 3D, elaboradas por lixiviado de sales, permitieron obtener muestras cilíndricas, adecuadas para ensayos de compresión. La caracterización morfológica de las muestras y la reproducibilidad del método de fabricación ya habían sido aseguradas en una tesis doctoral que precedió a este trabajo. Aun así cabe destacar que es un método artesanal para escalarlo a una producción seriada, especialmente el proceso de fusión parcial de los granos de sal. Sin embargo, las probetas fueron realizadas con morfología reproducible.

Los ensayos mecánicos arrojaron valores para el módulo tensil de 0.8 a 0.4 GPa para los compuestos a medida que crece la concentración de Bioglass, significativamente menores a los 10 GPa del PHBV. Tanto el módulo tensil como la resistencia a la tracción presentaron una disminución lineal con el contenido de Bioglass, atribuido a la falta de cohesión de la matriz de PHBV con las partículas de Bioglass. El módulo de compresión, en cambio, asciende de 0.7 MPa a 1.3 MPa a medida que aumenta el contenido de Bioglass. El módulo tensil y el de compresión están dentro de la magnitud del hueso natural cuyo módulo tensil varía entre 0.05 y 30 GPa mientras el módulo de compresión los valores oscila entre 0.2 y 0.4 MPa. Entonces los resultados muestran magnitudes similares al tejido óseo que podrán postular al desarrollo para la fabricación de sustitutos óseos. Además es importante destacar, que los valores obtenidos se encuentran en el mismo orden de los observados en diferentes trabajos [61, 65].

El ensayo de hidrofiliidad demostró que las películas interactúan con el agua de una manera acorde a lo buscado, que permite la interacción con el medio de cultivo celular para una futura siembra. Los valores obtenidos en todos los casos es menor a 90°.

La medición de tamaño de poros de las películas bidimensionales, se observó que si bien las partículas activas no interactuaban químicamente con la matriz, sí afectaban la morfología de los macroporos. El aumento de la concentración de las partículas de Bioglass

evidencia la formación de macroaglomerados, que contribuyen a la formación de los macroporos. La falta de adherencia (interfaz no coherente) es evidente y afecta los parámetros mecánicos con el contenido de Bioglass. La resistencia a la tracción disminuye linealmente con el contenido de Bioglass, mientras que el módulo de compresión aumenta con su contenido. Esta modificación en la respuesta mecánica se atribuye a la interfaz no coherente que se produce entre la matriz polimérica y las partículas bioactivas, que constituye un camino libre para la propagación de fisuras. En cambio, el módulo de compresión se incrementa linealmente con la concentración de Bioglass, por el efecto reforzante de las partículas bioactivas.

El ensayo de biodegradación mostró, en primera instancia, que el proceso de degradación del Bioglass modifica sustancialmente el medio en el que se encuentra. El pH en medio acuoso deja en evidencia esa situación, pues al no estar presente ningún buffer que contrarreste el efecto de los iones, el pH del medio se eleva hasta 10. La ulterior acidificación que sucede se relaciona directamente con la disolución del polímero, generada principalmente por el ácido butírico. Las mediciones realizadas en medio buffer también permiten evaluar el efecto de aumento y disminución del pH durante la biodegradación, pero atenuada por los iones presentes en el medio.

Los difractogramas permitieron corroborar que el aumento del valor del pH, se corresponde temporalmente con la desaparición de los picos característicos del compuesto, dando lugar a la aparición de HA, que es lo que se esperaba. La intensidad de los picos característicos es proporcional a la cantidad de material presente en la muestra, demuestra que a mayor contenido de Bioglass es mayor el contenido de HA formada. Dentro de los valores obtenidos hay dos situaciones que evidencian un comportamiento que no se correlaciona con lo esperado, ni con la tendencia que muestran los demás grupos de muestras. A fin de asegurar que es posible predecir la cantidad de HA formada es proporcional de alguna manera con el contenido de Bioglass se propone realizar nuevamente los ensayos de esos grupos de muestras.

Los ensayos realizados in vitro, comenzaron con el estudio de citotoxicidad indirecta. Estos se realizaron con dos controles negativos (gasa estéril y el Teflón®) comprobando que ambos controles son inviables para las células, es decir que es indistinto emplear cualquiera como control negativo. Además se comprobó que el empleo de un colorante vital para la cuantificación de la viabilidad celular, es un método reproducible, fácilmente aplicable y permite dar un indicio fiable de estado celular. Se propone para estudios posteriores el empleo de técnicas como la reducción de MTT para la posible comparación con otros sustratos.

El análisis de citotoxicidad indirecta demostró que cualquiera de las composiciones resultó favorable para el desarrollo celular, ya que todas las composiciones permitieron el desarrollo de monocapas celulares. A fin de definir cuál es más favorable se realizó el estudio directo, que permitió establecer que un contenido de Bioglass superior al 40% afecta negativamente el desarrollo de las células. Este límite puede asociarse a la capacidad del medio buffer. Se concluye entonces que un porcentaje menor al 40 % de Bioglass no afecta la citotoxicidad de los sustratos. Además, se demuestra que la matriz polimérica le resulta un medio adecuado para el desarrollo de las células, concluyendo que la interacción con las partículas es la que afecta el desarrollo de los cultivos, en el rango de composición estudiada.

Los resultados obtenidos determinan que los andamios preparados con estos métodos para la regeneración de tejidos óseos son muy prometedores. Presentan una estructura porosa interconectada, cumplen con los requerimientos mecánicos y en bajas concentraciones de Bioglass no tienen efecto citotóxico, cumpliendo los requerimientos para un andamio viable. Sin embargo, la proliferación celular estuvo relativamente restringida en lo que refiere a la vida celular pues no se obtuvieron los resultados deseados.

Como estudios futuros se propone ampliar el protocolo de los ensayos de citotoxicidad, empleando osteoblastos. Además, evaluar el comportamiento de los andamios in vivo, para observar la repuesta en el organismo y la capacidad de reabsorción

en sangre, y evaluar el tiempo de regeneración, que sería regulado por el contenido de Bioglass.

Otra determinación a futuro será cuantificar la biodegradación in vitro, determinando los compuestos que se van formando en el medio de inmersión. Esto se podría realizar empleando cromatografía gaseosa. Y de esa manera quedarían invariablemente determinado los compuestos en los que se degrada y la velocidad del proceso.

7.Apéndice 1

Los polihidroxialcanoatos – PHBV

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son plásticos biodegradables de origen microbiano, similares a los derivados del petróleo pero producidos a partir de fuentes de carbono renovables. Tienen un gran potencial de uso en aplicaciones que van desde la manufactura de productos desechables de uso común, hasta la de productos biomédicos y farmacéuticos de alto valor agregado. Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias, arqueas y micro algas acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. La estructura general y nomenclatura de estos compuestos se muestra en la Fig A.1 [\[75\]](#).

$\left[\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ - \text{O} - \text{C} - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \\ \quad \quad \quad \\ \text{R} \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \right]$			
<i>n</i>	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxipropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxibutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxibutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxivalerato)	P5HV

Fig A.1: estructura general de los PHA, y ejemplo de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral.

Los PHA tienen características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno además de la ventaja de ser: sintetizados a

partir de fuentes de carbono renovables, biodegradables (pueden ser asimilados por muchos microorganismos ya sea de suelos, mares, lagos o aguas residuales) y biocompatibles. Estas propiedades les confieren una gran importancia como substitutos de los plásticos convencionales [76].

Respecto a la diversidad de microorganismos productores de PHA, fuentes de carbono empleadas y porcentajes de acumulación, se han reportado más de 300 especies, principalmente bacterias, que utilizan sustratos que van desde carbohidratos, lípidos y proteínas, hasta compuestos aromáticos, residuos agroindustriales y gases, acumulando desde 1 hasta 80% de polímero en relación al peso de su biomasa en base seca.

Desde que los PHA se descubrieron en 1927, los investigadores de este tema se han referido a ellos como compuestos de naturaleza lipídica, y han dejado en claro que estos materiales son poliésteres insolubles en agua. La mayoría de los PHA son polímeros parcialmente cristalinos y por lo tanto sus propiedades térmicas y mecánicas usualmente se representan en términos de la temperatura de transición (T_g) o de la temperatura de fusión (T_m) [77]. Estos valores se representan a continuación en la Fig A.2.

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0.7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Polietileno-terafalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2.8	83	60	*

* Información no disponible

Fig A.2: Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo.

Poli (hidroxibutirato) (PHB) y su copolímero polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) son dos de los PHAs que se encuentran disponibles comercialmente. Presentan una muy buena biocompatibilidad ya que su producto de degradación cuando se los somete a ensayos in vivo es el -D-3-Hidroxibutirico, que es un constituyente normal de la sangre humana. Por lo tanto, es profusa la literatura que considera estos materiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos [\[77, 78\]](#).

Hidroxiapatita sintética y biológica

La hidroxiapatita de calcio (HA) es un compuesto perteneciente a la familia de las apatitas, cuya composición es $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$; es completamente cristalina con estructura hexagonal [74, 75]. El comportamiento bioactivo de la HA ha sido ampliamente demostrado por numerosos estudios. La HA biológica presente en el hueso es un fosfato deficiente en calcio (Ca^{2+}), que es sustituido por carbonato (CO_3^{2-}). Por tanto, es más apropiado referirse a ella como hidroxicarbonato de apatita (HCA) y no como HA [\[79\]](#).

La HCA se presenta generalmente en forma no-estequiométrica, con bajas relaciones Ca/P y contiene, además de imperfecciones estructurales, cantidades importantes de otros iones como el citrato ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7^-$), magnesio (Mg^{2+}), sodio (Na^+) y trazas de cloruro (Cl^-), fluoruro (F^-), potasio (K^+), estroncio (Sr^{2+}) y otros iones metálicos [\[80, 81\]](#). La Tabla A1.2 presenta una comparación entre las propiedades de la HCA del hueso y la HA sintética.

Tabla A1.2. Comparación de la composición, cristalografía y propiedades mecánicas del hueso y de la hidroxiapatita [79].

	Hueso	HA
<i>Constituyentes (% en peso)</i>		
Calcio, Ca^{2+}	24.5	39.6
Fósforo, P	11.5	18.5
Ca/P molar	1.65	1.67
Sodio, Na^+	0.7	trazas
Potasio, K^+	0.03	trazas
Magnesio, Mg^{2+}	0.55	trazas
Carbonato, CO_3^{2-}	5.8	-
Fluoruro, F^-	5.8	-
Cloruro, Cl	0.1	-
Residuo seco (inorgánico total)	65	100
Orgánico total	25.0	-
Agua absorbida (cortical)	9.7	-
<i>Propiedades cristalográficas</i>		
Parámetros de red ($\pm 0.003 \text{ \AA}$)		
Eje a	9.419	9.422
Eje c	6.880	6.880
Índice de cristalinidad	33-37	100
<i>Propiedades mecánicas</i>		
Modulo de elasticidad (10^6 MPa)	0.020	0.01
Resistencia a tracción (MPa)	150	100

La formación de microcristales de HCA, generalmente con crecimiento epitaxial, sobre la superficie de muestras de HA, tanto in vitro como in vivo, se cree que es la consecuencia de un proceso de disolución-precipitación en dicha superficie [82]. Estos cristales se han visto siempre íntimamente asociados a la formación de una matriz orgánica, sin estar esto totalmente explicado hasta ahora. El efecto favorable de la bioactividad de la HA en la respuesta del tejido receptor también ha sido ampliamente estudiado; se ha demostrado el aumento de la adhesión de diferentes tipos de células, incluyendo osteoblastos y osteoclastos [83]. La HA es considerada bioactiva y osteoconductora, con lo

cual, además de formar un enlace directo con el hueso receptor, sin la presencia de fibrosis (osteogénesis de enlace), permite la formación de hueso sirviendo como "andamio" ó "plantilla", lo que a su vez contribuye a la adhesión de células productoras de matriz extracelular y de moléculas orgánicas [82].

Bioglass® 45S5

Hace alrededor de 40 años [84] que se informaron los efectos del vidrio bioactivo, designado con el nombre comercial Bioglass 45S5, para contribuir a la regeneración ósea. A partir de entonces el Bioglass ha sido el vidrio más ampliamente investigado para aplicaciones biomédicas [85]. El Bioglass es un vidrio formado por una red tridimensional de óxido de silicio; su composición se especifica en la Tabla A1.3 [86].

Tabla A1.3: Proporciones específicas del Bioglass [87]

Compuesto	Porcentaje en peso
SiO ₂	45
P ₂ O ₅	6
CaO	24.5
Na ₂ O	24.5

Se denominó a este Bioglass 45S5, para denotar el porcentaje en peso del silicio como formador de la estructura con una relación de 5 veces Ca/P. La clave de este vidrio es la baja concentración de SiO₂ y, en consecuencia, la baja conectividad de la red de silicatos, lo que favorece su alta bioactividad, es decir, su gran capacidad de interactuar químicamente con los tejidos del organismo [88].

El vidrio 45S5 se produce a partir de la fusión de polvos de alta pureza de SiO_2 , Na_2CO_3 , CaO y P_2O_5 , preparada estequiométricamente para obtener la composición final; se mezcla en un contenedor de polietileno por un período de 15min. La fusión de los elementos se lleva a cabo en un crisol de sílice fundida utilizando el siguiente ciclo térmico: calentamiento de temperatura ambiente a $950\text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; permanencia a $950\text{ }^\circ\text{C}$ por 1.5 h; calentamiento a una velocidad de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ de $950\text{ }^\circ\text{C}$ a $1350\text{ }^\circ\text{C}$ y permanencia a $1350\text{ }^\circ\text{C}$ por 1.5 h. El vidrio fundido se vierte sobre una placa de acero y se enfría en aire hasta temperatura ambiente. El vidrio resultante se muele y tamiza hasta obtener el tamaño de partícula deseado [89].

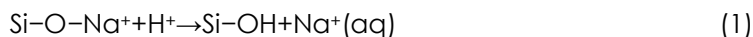
Propiedades mecánicas

La principal desventaja del Bioglass es su debilidad mecánica y baja tenacidad a la fractura en redes bidimensionales amorfas. La resistencia a la flexión está en el rango de 40-60 MPa, lo que lo hace inadecuado para aplicaciones con mucha carga. Presenta un módulo de Young comprendido entre 30-60 GPa; esta característica lo acerca bastante a los requerimientos del hueso cortical. A pesar de su inherente debilidad mecánica, el Bioglass puede emplearse para implantes con bajos requerimientos de carga de compresión; sin embargo, su potencialidad se plasma más acabadamente cuando se emplea en forma de polvos como fase bioactiva de biomateriales compuestos [90].

Mecanismo de bioactividad

Los mecanismos de bioactividad del Bioglass fueron estudiados y descriptos detalladamente por Hench [85, 91]. A partir de esos estudios la unión de vidrio 45S5 al hueso se ha atribuido a la formación de una capa de hidroxicarbonato de apatita (HCA) en la superficie del vidrio en contacto con el fluido corporal. Debido a que esta capa de HCA es similar a la constituyente mineral del hueso, se une firmemente al hueso vivo. Si bien algunos detalles de los cambios químicos y estructurales que permiten generar la capa de HCA a partir del Bioglass no son claros, la secuencia de reacciones que desencadena este proceso en la superficie del implante de vidrio bioactivo, es la que se presenta a continuación [85]:

Etapa 1: se produce un intercambio iónico entre los modificadores de la red del vidrio (Na^+ and Ca^{2+}) y los protones H^+ de la solución, lo que conduce a la hidrólisis de los grupos sílice y la posterior creación de grupos silanol sobre la superficie del cristal, e.g.



Debido a la consumición de iones H^+ , el pH de la solución se incrementa durante esta etapa.

Etapa 2: el incremento de pH conduce al ataque de la red y la disolución de la sílice en forma de ácido sílico $\text{Si}(\text{OH})_4$, y la formación continuada de grupos Si-OH en la superficie del vidrio.



Etapa 3: se produce la condensación y polimerización de una capa amorfa rica en óxido de silicio (típicamente de 1-2 μm de espesor) en la superficie del vidrio empobrecido en Na^+ and Ca^{2+} .

Etapa 4: Además de la disolución del vidrio, la migración de iones Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$ desde el cristal a través de la capa rica en SiO_2 y de la solución, conduce a la formación de un fosfato de calcio amorfo (ACP) sobre la superficie de dicha capa.

Etapa 5: El vidrio continúa disolviéndose, y la capa de ACP incorpora $(\text{OH})^-$ y $(\text{CO}_3)^{2-}$ de la solución y cristaliza en forma de una capa de HCA.

Una vez formada la capa inicial de HCA, le siguen mecanismo biológicos de unión al hueso, como ser la absorción de los factores de crecimiento, la unión, proliferación y diferenciación de las células osteoprogenitoras [\[92\]](#). De manera esquemática se presenta a continuación en la Fig A.3 la secuencia de las reacciones involucradas en la interface hueso/Bioglass.

Superficie del Bioglass		
Estadios de la reacción superficial	1	Intercambio de iones alcalinos con H^+ de los fluidos corporales
	2	Disolución de la estructura y formación de enlaces de ox de silicio ($SiOH$)
	3	Polimerización de silica-gel: $SiOH + SiOH \rightarrow Si-O-Si$
	4	Formación de una capa amorfa de $Ca + PO_4 + CO_3$
	5	Cristalización de una capa de hCA
	6	Absorción de factores de crecimiento en la capa de HCA
	7	Acción de macrófagos
	8	Adhesión de células madre
	9	Diferenciación de células madre
	10	Generación de la matriz
	11	Cristalización de la matriz
	12	Proliferación y crecimiento del hueso

Fig A.3: Secuencias de las reacciones involucradas en la formación del hueso entre hueso y Bioglass [90].

Biocompatibilidad

Como se describió anteriormente, tras la implantación, el vidrio bioactivo 45S5 manifiesta la degradación química, la liberación de iones tales como Na^+ y Ca^{2+} , y la conversión a un material de HCA [93]. El silicio, presumiblemente en forma de ácido silícico, $Si(OH)_4$, también se libera durante la degradación por disolución o por otros mecanismos, tales como pequeñas piezas de material rico en sílice comido por los fagocitos y excretados. Se ha estudiado la liberación de Si a partir de gránulos 45S5 implantados en el músculo y

tibias de conejos para determinar la vía de silicio liberado durante la degradación *in vivo* [94].

Considerando lo antes expresado, no es novedad que el Bioglass 45S5 sea el candidato ideal para ser empleado como material de regeneración ósea, pero como soporte tiene varias limitaciones. La principal dificultad es lograr andamios 3D con poros interconectados, que se preparan comúnmente por calentamiento (sinterización) de partículas distribuidas para formar la estructura deseada. Debido a la capacidad limitada del vidrio 45S5 para sinterizar por flujo viscoso por encima de su temperatura de transición vítrea (T_g), y la ventana estrecha que existe entre la T_g y temperatura de cristalización, 505°C y 650° respectivamente [95], se encuentran numerosas dificultades en la sinterización de las partículas de una red. En consecuencia el andamio de Bioglass 45S5 puro tiene a menudo una baja resistencia [95]. Otra limitación de vidrio 45S5 es su velocidad de degradación lenta y la conversión a HA [91], lo que dificulta un diseño de andamio cuya velocidad de degradación se adecue a la tasa de formación del nuevo tejido. La conversión del andamio a HA suele ser incompleta, por tanto una parte de vidrio no transformado que contiene SiO_2 podría permanecer en el andamio, aumentando la incertidumbre sobre los efectos a largo plazo de SiO_2 *in vivo*.

Una complicación con el uso de vidrio 45S5 es el microambiente biológico local puede ser afectado significativamente por su degradación. En efecto, como resultado de la degradación se producen aumentos en la concentración de iones, tales como Na^+ y Ca^{2+} , con cambios en el pH, en particular en las primeras etapas cuando la tasa de degradación es rápida [91, 96, 97]. Los efectos biológicos de estos cambios así como las funciones biológicas de estas especies solubles, su toxicidad y su eliminación son difíciles de predecir a partir de experimentos *in vitro*.

8. Apéndice 2

Difracción de rayos X de HA

Los datos que se presentan a continuación, es la caracterización de Hidroxiapatita que se encuentra disponibles en la base de datos del equipamiento empleado en este trabajo para la realización de los difractogramas. Además se incorporan los resultados impresos de los difractogramas realizados

∂ Nombre y fórmula

Nombre del mineral: Hidroxiapatita

Fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$

∂ Parámetros cristalográficos

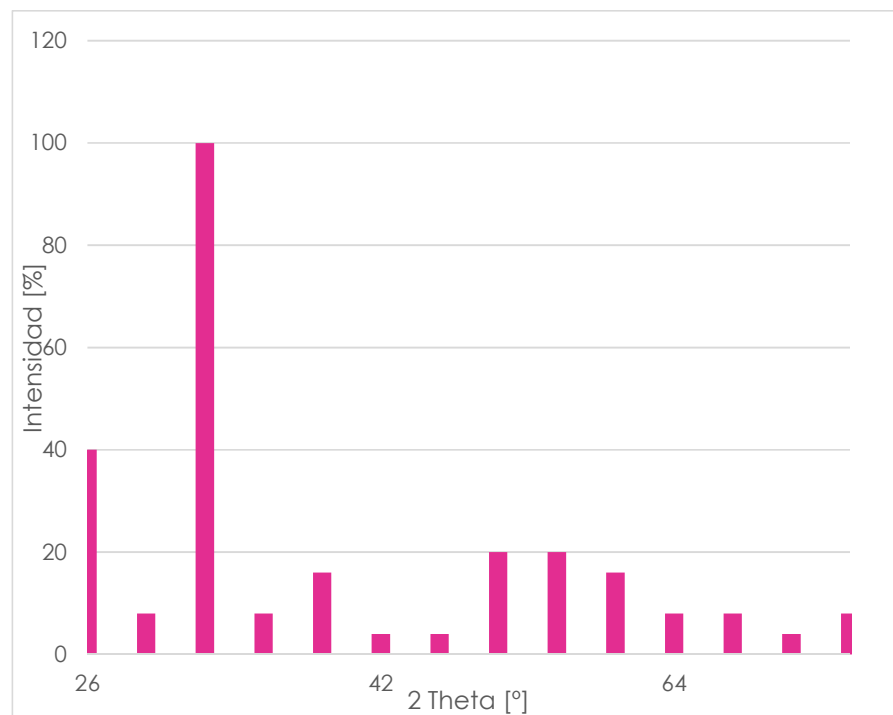
Densidad medida (g/cm^3): 3.08

∂ Lista de picos

Número	d [Å]	2 Theta [deg]	I [%]
1	3.44	25.879	40.0
2	3.11	28.681	8.0
3	2.79	32.054	100.0
4	2.62	34.196	8.0
5	2.17	39.673	16.0
6	2.13	42.402	4.0
7	2.06	43.917	4.0
8	1.94	46.789	20.0
9	1.84	49.498	20.0
10	1.71	53.547	16.0

11	1.45	64.179	8.0
12	1.31	72.033	8.0
13	1.24	76.809	4.0
14	1.11	87.889	8.0

∂ Patrón de picos.



9. Apéndice 3

Puesta a punto de los cultivos *in vitro*

Cantidad óptima de células a sembrar

Para la optimización del número de fibroblastos a sembrar durante el ensayo de proliferación, se comenzó por realizar una serie de prueba en la que se variaba únicamente el número de células sembradas. Se buscaba determinar el máximo número de fibroblastos que podían sembrarse sin que se alcanzara la confluencia en el pocillo antes de llegar a la finalización del ensayo. Los pocillos eran de poliestireno modificado superficialmente con grupos hidrófilos para mejorar la adhesión celular, se empleó en este trabajo un multiwell marca Cornig Costar®. La Fig. A3.1 muestra la disposición de los fibroblastos una vez alcanzada la confluencia, a partir de la cual la vida del cultivo queda condicionada a la falta de espacio para seguir proliferando, lo que altera el resultado del ensayo. Por otro lado, si se sembraban pocas células, debido a la naturaleza propia de los fibroblastos, no se iba a producir el desarrollo metabólico normal de las mismas, ya que se conoce que la cercanía entre células produce una retroalimentación positiva en su desarrollo. Considerando esos detalles es que se buscó que pasadas las 24 hs de siembra, cada pocillo se encontrara con un 20% de la superficie ocupada.

Se procedió entonces a la realización de diferentes siembras, desde 10.000 hasta 80.000 en saltos de 10.000 células/pocillo, como los resultados no fueron los esperados posteriormente se probaron con siembras de 100.000 células/pocillo. Como aun así la confluencia del pocillo no era la esperada se pasó a realizar la prueba con 200.000 células/pocillo, donde finalmente se puso observar una ocupación del 20% del pocillo.



Fig A3.1 Se muestra el fondo de un pocillo confluyente al 100%, imagen solo ilustrativa.

Optimización del sistema buffer

Otro de los procedimientos para los ensayos *in vitro* fue el de buscar un buffer que fuera capaz de mantener más estable el pH a pesar de los bruscos cambios que ocurrían debidos al proceso de degradación del Bioglass. Se optó por la implementación del buffer HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), ya que en el laboratorio era empleado el mismo para otros trabajos con excelentes resultados, cuya estructura química se muestra en la Fig A3.2.

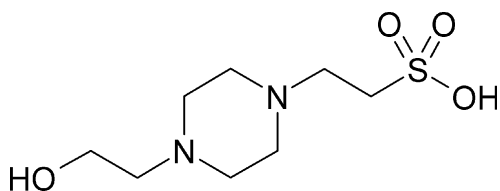


Fig A3.2: Estructura química del buffer HEPES, empleado para evitar el aumento del pH durante el ensayo de citotoxicidad.

Al medio de cultivo se le agrego solución de HEPES 1 M, en ese medio se sumergió la muestra con mayor cantidad de Bioglass en su composición. Como o control se realizó el

mismo procedimiento con un medio sin solución de HEPES. Previo al inicio del período de incubación de los pocillos se midió el pH: 7.3 en ambos casos. Se dejó incubar los pocillos por 24 hs a 37°C en una atmosfera controlada de CO₂ y se observó que en ambos casos el pH se había elevado a 7.7. Es decir que, a pesar de las bondades del buffer, a la concentración empleada no resultó satisfactorio para equilibrar el pH.

10. Referencias

- [1] Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. F. Oreffo, R. Rose. Biochemical and Biophysical Research Communications: 292 (2002), 1-7.
- [2] Biomimetic materials for tissue engineering. H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos. Biomaterials: 24 (2003), 4353-4364.
- [3] Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. A. S. Mistry, A. G. Mikos. Adv. Biochem Engin/Biotechnol: 94 (2005), 1-22.
- [4] Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. J. S. Temenoff, A. G. Mikos. Biomaterials: 21 (2000), 2405-2412.
- [5] Bone tissue engineering by cell transplantation. G. N. Bancroft, A. G. Mikos. (2002).
- [6] Porous tantalum structures for bone implants: fabrication, mechanical and biological properties. Balla, V. K. et. al. Acta Biomater: 6 (2010), 3349-3359.
- [7] Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. Dabrowski, B. et. al. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater: 9 (2010), 53-61.
- [8] Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants. Das K. et. al. Scripta Mater: 59 (2008) 822-825.
- [9] Biocompatible conducting chitosan/polypyrrole-alginate composite scaffold for bone tissue engineering. K.M. Sajesh, et. al. International Journal of Biological Macromolecules: 62 (2013), 465-471.
- [10] Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. S.-H. Lee, H. Shin. Adv. Drug Deliv. Rev: 59 (2007), 339-359.

[11] A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering. H. Cao, N. Kuboyama. Bone: 46 (2010), 386–395.

[12] Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Susmita Bose, Mangal Roy, Amit Bandyopadhyay .W.M. Keck. Trends in Biotechnology: 30 (2012), 546-554.

[13] Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. Tezcaner A, Bugra K, Hasirci V. Biomaterials: 24 (2003), 4573–4583.

[14] Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering . Kose GT, Kenar H, Hasirci N, Hasirci V. Biomaterials: 24 (2003), 1949–1958.

[15] Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. G. Torun Kose, F. Korkusuz, P. Korkusuz, N. Purali, A. Ozkul, V. Hasirci. Biomaterials: 24 (2003), 4999–5007.

[16] Piezoelectric properties of Poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Fukada E, Ando Y. Int. J. Biol. Macromol: 22 (1984), 361-366

[17] Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potentials in drug delivery. Pouton CW. Akhtar S. Adv Drug Del Rev: 18 (1996), 133-162.

[18] Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. Superb K. Misra, et. al. Biomaterials: 31 (2010), 2806–2815.

[19] PHBV microspheres – PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. Wei Huang, et. al. Biomaterials: 31 (2010), 4278–4285.

[20] Ceramics, Glasses and Glass- Ceramics. Hench, L. L. y Best, S., en "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine", 2da Ed., Eds. Ratner, P. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. y Lemons, J. E., Elsevier Academic Press, California, (2004).

[21] An Introduction to Bioceramics, Eds. Hench, L. L. y Wilson, J., World Scientific Pub. Co., London, p. 1, (1993).

[22] Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications. Amir Nemat Hayatia, S.M. et. al. *Materials Science and Engineering*: 32 (2012), 416–422.

[23] Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. Elena I. Paşcu, et. al. *Materials Science and Engineering*: 33 (2013), 4905–4916.

[24] Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering. Junmin Q., et. al. *Materials Science and Engineering*: 36 (2014), 95-101.

[25] PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity. Dajana M., et. al. *Materials Science and Engineering*: 34 (2014), 437–445.

[26] Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. K.C. Kavya, R. Jayakumar, Shantikumar Nair, Krishna Prasad Chennazhi. *International Journal of Biological Macromolecules*: 59 (2013), 255–263.

[27] A novel bioactive porous bridgite scaffold with biomimetic apatite layer for bone tissue engineering. Wu C. Chang, J Zhai W. Ni S. *J Mater Sci Mater Med*: 18 (2007), 857–864.

[28] Toxicology and Biocompatibility of Bioglass. Wilson, J., Piggot, G. H., Schoen, F. J., Hench, L. L., *J. Biomed. Mater. Res.*: 15 (1981), 805-815.

[29] Repair of Skeletal Tissues. Hench, L. L., Eds. Hench, L. L. y Jones, J. R. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, (2005).

[30] A biodegradable porous composite scaffold of PGA/B-TCP for bone tissue engineering. Cao H. and Kuboyama, N. *Bone*: 46 (2010), 386-395.

- [31] The BMP signaling and in vivo bone formation. Cao, X and Chen, D. *Gene*: 357 (2012), 1-8.
- [32] The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. Pollak, M. *Nat. Rev. Cancer*: 12 (2012), 159-169.
- [33] Biological evaluation of bioceramic materials—a review. T.V. Thamaraiselvi, S. Rajeswari. *Trends Biomater. Artif. Organs*: 18 (2004), 9-17.
- [34] The story of Bioglass. L.L. Hench *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*: 17 (2006), 967-973.
- [35] Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. J.R. Jones et al. *Biomaterials*: 27 (2006), 964-973.
- [36] A comparative physico-chemical study of bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite. A. Doostmohammadi, A. Monshi, M.H. Fathi, O. Braissant. *Ceramics International*: 37 (2011), 1601-1607.
- [37] Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering. Jun Wu, et. al. *Journal.pone.0071563* (2013), 10.1371.
- [38] A Composite Approach to Tissue Engineering, Ceramic. A. Boccaccini, A.R., Rother, J.A., Hench, L.L., Maquet, V. and Jerome, R. *Eng. Sci. Proc.*: 23 (2002), 805-816.
- [39] Fabrication and Characterization of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) Composite Containing Bioglass. Superb K. Misra, Showan N. Nazhat, Sabeel P. Valappil, M. Moshrefi-Torbati, Robert J. K. Wood, Ipsita Roy, and Aldo R. Boccaccini. *Biomacromolecules*: 8 (2007), 2112-2119.
- [40] Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. Khan, Y et al. *The journal of bone & joint surgery*: 90 (2008), 36-42.

[41] The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-Glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. Murphy, C.M. et al. *Biomaterials*: 31 (2010), 461-466.

[42] Processing of controlled porosity ceramic structures via fused deposition. Bose, S. et. al. *Scripta Mater*: 41 (1999), 1009-1014.

[43] Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Hutmacher, D.W. et. al. *Trends Biotechnol*: 22 (2004), 354-362.

[44] Elaboración y caracterización de sustratos biodegradables por PHBV por separación de fases. Ruiz, I, et al. 11ºcongreso Binacional de Metalurgia y materiales SAM/CONAMET 2011.

[45] Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R. *Polymer*: 35 (1993), 1068-1077.

[46] Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. *Biomaterials*: 14 (1993), 323-330.

[47] Effect of Salt Leaching on PCL and PLGA(50/50) Resorbable Scaffolds. Barbantia SH, Carvalho Zavaglia CA, Aparecida de Rezende Duek E. *Materials Research*: 11 (2008), 75-80.

[48] Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. *Biomaterials*: 19 (1998), 1935-1943.

[49] Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. Liao C-J, Chen C-F, Chen J-H, Chiang S-F, Lin Y-J, Chang K-Y. *Journal of Biomedical Material Research*: 59 (2002), 676-681.

[50] Desarrollo de sustratos reabsorbibles para ingeniería de tejido dermo-epidérmico. Dr Ignacio Ruiz. Tesis doctorado Instituto Sabato (2013).

[51] Wound healing: an update on Mo-Sci's novel borate glass fibers. Peter Wray. American Ceramic Society Bulletin: 92 (2013), 30-36.

[52] Layered-lamination Preparing of Tissue Engineering Scaffolds via Emulsion Templates Method Zhijiang C, Guoxiang C, Mingming G, Zhiyuan T. Journal of Polymer Research: 11 (2004), 225–230.

[53] Novel method to produce poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds with controlled multi-pore size. Zhijiang C, Guoxiang C. Journal of Materials Science Letters: 22 (2003), 153-155.

[54] The robustness and flexibility of an emulsion solvent evaporation method to prepare pH-responsive microparticles. Nilkumhang S, Basit AW. International Journal of Pharmaceutics: 377 (2009) 135-141.

[55] Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. Pich A, Schiemenz N, Corten C, Adler H-J. Polymer: 47 (2006), 1912–1920.

[56] Classification of Surface-Active Agents by 'HLB. Griffin, William C. Journal of the Society of Cosmetic Chemists: 1 (1949), 311-26.

[57] Wetting and absorbency of nonionic surfactant solutions on cotton fabric. Chunhee Kim, You-Lo Hsieh. Colloids and Surfaces: 18 (2001), 385–397.

[58] Functionalization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization: Comparison with the Conventional Free-Radical Grafting Procedure. Lao HK, Renard E, Amani El Fagui A, Langlois V, Karine Vallée-Rehel, Linossier I. Journal of Applied Polymer Science: 120 (2011), 184–194.

[59] Structure–property relationships of silk-modified mesoporous bioglass scaffolds. Chengtie Wu, Yufeng Zhang, Yufang Zhu, Thor Friis, Yin Xiao. Biomaterials: 31 (2010), 3429–3438.

[60] Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic vancomycin release. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. *J Mater Sci Mater Med*: 16 (2005), 189–195.

[61] Cellular solids: structure and properties. Gibson LJ, Ashby MF. (1999).

[62] Fabrication, Characterization, and in vitro Degradation of Composite Scaffolds Based on PHBV and Bioactive Glass. Haiyan L., Ruilin D. y Jiang C. *J Biomater App*: 20 (2005), 137-155.

[63] Contact angle measurement of select compatibilizers for polymer-silicate layer nanocomposites. Rogers K., Takacs E., Thompson M.R. *Polymer Testing*: 24 (2005), 423–427.

[64] Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass composites. Superb K. Misra, Dirk Mohn, Tobias J. Brunner, Wendelin J. Stark, Sheryl E. Philip, Ipsita Roy, Vehid Salih, Jonathan C. Knowles, Aldo R. Boccaccini. *Biomaterials*: 29 (2008), 1750-1761.

[65] The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Guo-Qiang Chen, Qiong Wu. *Biomaterials*: 26 (2005), 6565-6578.

[66] Review. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. Rameshwar R. Rao, Jan P. Stegemann. *Cytotherapy*: 15 (2013), 1309-1322.

[67] Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. Fernández, Et. Al. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*: 11 (2006), 151-157.

[68] Evaluation of the In Vitro Cytotoxicity of Crosslinked Biomaterials. Wang M, Etheridge J, et, al. *Biomacromolecules*: 14 (2013), 1321–1329.

[69] Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Lutz-Christian G., Aldo R. Boccaccini. *Materials*: 3 (2010), 3867-3910.

[70] Desarrollo y caracterización de materiales Biodegradables para regeneración ósea. Navarro Toro, M. Tesis Doctoral en Ciencia – Universidad de Catalunya (2005).

[71] Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglasscomposites. Superb K. Misra. Et. Al. Biomaterials: 29 (2008), 1750-1761.

[72] Lysosomal response of earthworm, coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameter. Reineckes S.A, et. Al. Enviromental Toxicology Chemistry: 21 (2002), 1026-1031.

[73] Alternatives to in vivo studies in toxicology. Blantyne B. et. al. General and applied toxicology 1 (1999), 178-182.

[74] Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. Revista de Toxicología 20 (2003), 187-192.

[75] Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated Agrobacterium Sp Sh-1 and gw-014 from structurally unrelated single carbon substrates. Lee E.Y., Kang S.H. y Choi C.Y.. J. Ferm. Bioeng.: 79 (1995), 328-334.

[76] Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Anderson A.J y Dawes E.A..Microbiol. Rev.: 54(1990), 450-472.

[77] Three-dimensional Nanocomposite Scaffolds Fabricated via Selective Laser Sintering for Bone Tissue Engineering. B.Duan, M.Wang, W.Y.Zhou, W.-L.Cheung, Z.Y.Li, and W.W.Lu. Acta Biomaterials: 6 (2010), 4495–4505.

[78] Characterization and In Vitro Biological Evaluation of Nanocomposite Fibers Containing Carbonated Hydroxyapatite Nanoparticles. H.-W.Tong, M.Wang, Z.-Y.Li, and W.W.Lu. Electrospinning, Biomedical Materials: 5 (2010), DOI: 10.1088/1748-6041/5/5/054111.

[79] Crystallographic Studies of the Carbonate Substitution in the Apatite Structure, Le Geros, R. Z., PhD Thesis, New York University, (1967).

- [80] Lattice defects in nonstoichiometric calcium hydroxylapatites. Meyer, L. L. y Fowler, B. O., *Inorg. Chem*: 21 (1982), 3029-3041,
- [81] The Biochemistry and Physiology of Bone; Engstrom, A., Ed. Bourne, G. H., Academic Press, New York, (1972).
- [82] The Atomic Structure of Fluorapatite and Its Relation to that of Tooth and Bone Mineral, Beevers, C. A. y McIntyre, D. B., *Miner. Mag.*: 27 (1956), 254-259.
- [83] Calcium Phosphate Coatings for Dental Implants, Kay, J. F., *Dent. Clin. North Amer.*: 36 (1992), 1-18.
- [84] An Introduction to Bioceramics, Eds. Hench, L. L. y Wilson, J., Le Geros, R. Z. y Le Geros, J. (1993).
- [85] Handbook of Bioactive Ceramics Vol. II. Yamamuro, T., Hench, L. L. y Wilson, J. (1990).
- [86] Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Jr *J Biomed Mater Res*: 5 (1971), 117-141.
- [87] Sintering and crystallization of 45S5 Bioglass powder. Aldo R. Boccaccini, et al. *Journal of the European Ceramic Society*: 29 (2009), 3299-3306.
- [88] Chronology of Bioactive Glass development and clinical applications. Larry Hench. *New Journal of glass and ceramics*: 3 (2013), 67-73.
- [89] Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. Hench LL. *Bioceramics. J Am Ceram Soc*; 81 (1998), 1705-1728.
- [90] Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Lutz-Christian Gerhardt and Aldo R. Boccaccini. *Materials*: 3 (2010), 3867-3910.
- [91] Biomateriales and tissue engineering. Donglu S. Springer, (2004).

[92] Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solution. Huang W, Day DE, Kittiratanapiboon K, Rahaman MN. *J Mater Sci Mater Med*: 17 (2006), 583–596.

[93] Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function.] Ducheyne P, Qiu Q. *Biomaterials*: 20 (1999), 2287–2303.

[94] Bioceramics: From Concept to Clinic. Hench L. J. *Am. Ceram. Soc.:* 74 (1991), 1487–1510.

[95] Toxicology and biocompatibility of bioglasses. Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, Hench LL. *J Biomed Mater Res.:* 15 (1981), 805–817.

[96] 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffold for bone tissue engineering. Chen ZQ, Thompson ID, Boccaccini AR. *Biomaterials*: 27 (2006), 2414–2425.

[97] In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. Yao A, Wang DP, Huang W, Rahaman MN, Day DE. *J Am Ceram Soc.:* 90 (2007), 303–306.

Proyectos científicos-tecnológicos

⌚ Desarrollo de sustratos bioabsorbibles para ingeniería de tejidos, en el marco del Proyecto de Investigación en Ciencia y Tecnología PICT12-00935 Start-up de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Monto asignado: \$300.000 Directora: E Hermida. Fecha de inicio: 2009, Fecha de finalización: 2013. Institución beneficiaria: CNEA

⌚ Degradación estructural y funcional de membranas sintéticas y biológicas- PIP 0095. Proyecto trianual que reúne a 4 grupos de investigación de CONICET, dirigido por Horacio Corti. Otorgado por CONICET. Monto: \$100.000/año. Fecha de inicio: 2011, Fecha de finalización: 2013. Institución beneficiaria: CNEA.