

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA**

**Doctorado en Ingeniería Biomédica**

ETSEIB

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica

**Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa.**

Tesis para obtener el título de doctor por la  
Universitat Politècnica de Catalunya

Memoria presentada por:

**Edgar Benjamín Montufar Jiménez**

Dirigida por la Prof. Dra.:

**Maria Pau Ginebra Molins**

Barcelona, España

Julio de 2010

# Capítulo 5: Desarrollo y caracterización de espumas sólidas compuestas: empleo de polímeros naturales como agentes espumantes de la fase líquida.

---

## 5.1 Introducción

En los capítulos anteriores se ha verificado la eficiencia del método de espumado de la fase líquida, de un cemento óseo en base a fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP), para obtener espumas inyectables y autofraguables de hidroxiapatita (HA). También se caracterizaron los cementos compuestos con gelatina, alginato de sodio o extracto de soja, bajo el enfoque de usar estos biopolímeros como agentes espumantes multifuncionales. La razón de haber caracterizado previamente estos cementos compuestos, es que son el material que conformara la fase continua de las espumas sólidas obtenidas.

El concepto de espumante multifuncional surge de la posibilidad de incorporar en un solo aditivo la capacidad de generar con la fase líquida espumas estables, y también la capacidad de mejorar la inyectabilidad, la cohesión, la flexibilidad y/o el reconocimiento biológico del cemento base.

La propuesta de los biopolímeros antes mencionados como espumantes multifuncionales se basa en las siguientes características.

1. La alta solubilidad de los biopolímeros en agua.
2. La capacidad de las proteínas y los carbohidratos para formar y estabilizar sistemas coloidales.
3. La biocompatibilidad y la biodegradabilidad, que les permite a estos biopolímeros ser aprovechados como andamios para el relleno de cavidades, o sistemas de liberación de fármacos, genes y/o células (ver capítulo 2 sección 2.4).
4. Del capítulo 4 se sabe que la incorporación de estos biopolímeros en la fase líquida no impide la reacción de hidrólisis del  $\alpha$ -TCP.
5. Del capítulo 4 se sabe también que la gelatina y el extracto de soja mejoran la inyectabilidad de la pasta cementante.
6. La capacidad de la gelatina y el alginato para gelificar, con lo que se espera incrementar la cohesión de las pastas espumadas.
7. En el caso particular de la gelatina, el posible incremento de la adhesión celular por la presencia de la secuencia peptídica RGD [1]. En el caso del extracto de soja la posible estimulación de células mesenquimales para diferenciarse hacia osteoblastos, debido a la liberación de las isoflavonas [2,3]. Y en el caso del alginato de sodio sulfatado un posible efecto angeogénico [4].

Como se hace referencia en los capítulos 1 y 4, la gelatina y el alginato de sodio ya se emplean como aditivos en los cemento de fosfato de calcio (CPC), pero en ningún caso, incluido el extracto de soja, éstos polímeros se han utilizado como agentes espumantes de pastas cerámicas o cementos. La experiencia que se posee sobre el espumado de pastas cerámicas es la obtención de piezas en verde empleando surfactantes sintéticos, en la mayoría de los casos tóxicos, que posteriormente son sinterizadas para obtener cerámicas porosas utilizadas como intercambiadores de calor, catalizadores, filtros para metales líquidos, entre otras [5].

En este capítulo se determina que biopolímeros, en que concentraciones y para cuales proporciones líquido/polvo (L/P) de mezclado, originan espumas sólidas de HA, y se comparan con espumas de HA obtenidas con surfactantes sintéticos como el Tween 80

## 5.2 Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Obtener espumas de HA empleando como agentes espumantes:
  - la gelatina,
  - el alginato de sodio,
  - el extracto de soja, y/o
  - sus combinaciones.
2. Caracterizar las espumas de HA obtenidas en términos de cohesión y porosidad.
3. Seleccionar una formulación autofraguable *in situ* y una formulación prefraguada por cada agente espumante, en base a la cohesión en medio líquido y a la máxima macroporosidad de la espuma de HA.
4. Determinar las características macroestructurales de las espumas seleccionados.
5. Estudiar la cinética de la reacción de endurecimiento de las espumas autofraguables seleccionadas bajo condiciones fisiológicas simuladas.

## 5.3 Materiales y métodos

El desarrollo, selección y caracterización de las formulaciones de espumas de HA se llevó a cabo en las siguientes etapas: i) una etapa de caracterización de las disoluciones biopoliméricas empleadas como fase líquida del cemento, ii) una etapa de obtención y selección de espumas sólidas compuestas y iii) una última etapa de caracterización en términos de porosidad, cinética de reacción y propiedades mecánicas. A continuación se describe a detalle cada estudio realizado, y los materiales empleados.

### 5.3.1 Agentes espumantes de origen natural y polvo de cemento

#### 5.3.1.1 Biopolímeros empleados

Durante este trabajo se emplearon tres diferentes biopolímeros como agentes espumantes de la fase líquida del cemento: gelatina bovina, alginato de sodio y extracto de soja. A su vez, se probaron dos variedades de gelatina y tres variedades de alginato de sodio. En la tabla 5.1 se hace un compendio de los biopolímeros empleados y de sus características.



Tabla 5.1: Diferentes biopolímeros empleados en la obtención de cementos macroporosos.

Biopolímero	Variedad	Anotaciones		Proveedor
Gelatina bovina	Tipo A	Bloom = 250	PIE = 6 - 9.5	Rousselot AB - A
	Tipo B	Bloom = 250	PIE = 4.5 – 5.6	Rousselot LB - B
Alginato de sodio	Sin sulfatar	Ultra alto peso molecular	PM = 239500 DS = 0.0 %	Universidad de Ghent - Bélgica
	Sulfatado	Bajo peso molecular	PM = 25000 DS = 27.7 %	Universidad de Ghent - Bélgica
		Alto peso molecular	PM = 162500 DS = 6.6 %	Universidad de Ghent - Bélgica
Extracto de soja				Universidad de Brighton - Reino Unido

PIE: punto isoelectrico; PM: peso molecular [Dalton]; DS: grado de sulfatación en %.

### 5.3.1.2 Preparación de la fase líquida del cemento

De acuerdo a los resultados del capítulo 4, todas las disoluciones poliméricas fueron preparadas con 2.5 % en peso/volumen (w/v) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, ref. 06586.0500) empleado como acelerante de la reacción de fraguado. La preparación y almacenamiento de las disoluciones se realizó de acuerdo a las condiciones descritas también en el capítulo 4 de esta memoria.

Disoluciones mixtas con acelerante, Tween 80 y biopolímero se prepararon disolviendo en este orden los componentes en agua destilada (millipore).

En el caso de disoluciones con más de un componente (con excepción del Tween 80), éstas fueron preparadas a partir de disoluciones independientes de cada polímero, y mezcladas justo antes de su aplicación. Las concentraciones de las soluciones de partida fueron calculadas para que al ser mezcladas en una proporción 1:1, la combinación produjera la concentración final deseada de cada componente. La tabla 5.2 muestra algunos ejemplos prácticos.

Tabla 5.2: Ejemplos de las concentraciones de las disoluciones A y B de partida, que al mezclarse en una proporción 1:1 originan la disolución final AB deseada.

Disolución final deseada	Disolución A	Disolución B
2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 5 % A + 5 % B	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % A	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % B
2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 5 % A + 20 % B	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % A	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 40 % B
2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % A + 5 % B	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 20 % A	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % B
2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 % A + 20 % B	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 20 % A	2.5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 40 % B

### 5.3.1.3 Fase sólida del cemento

El polvo del cemento consistió en la mezcla de 98 % de α-TCP y 2 % en peso de HA precipitada (pHA; Alco, ref. 1.02143.1000). El tamaño medio de partícula del α-TCP fue de 7.34 μm con una superficie específica de 1.99 m<sup>2</sup>/g. La preparación y las características detalladas del polvo corresponden a las descritas en el apartado 3.3.1 de esta memoria.

### 5.3.2 Estudio de espumabilidad y estabilidad de las espumas preparadas con las disoluciones biopoliméricas

Con el objetivo de determinar que disoluciones biopoliméricas eran aptas para obtener espumas de HA, se determinó la espumabilidad y la estabilidad de las espumas líquidas preparadas con diferentes contenidos de biopolímero en disolución, añadiendo en todos los casos 2.5 % w/v de acelerante de la reacción de fraguado del cemento.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis, se tomó el Tween 80 como agente espumante modelo en la obtención de cementos macroporosos, por lo que en el caso de disoluciones biopoliméricas con baja o nula espumabilidad se incorporó 0.5 % w/v de Tween 80 (Sigma, ref. P4780) en el líquido con la intención de mejorar las propiedades espumantes de la disolución. La tabla 5.3 muestra las diferentes disoluciones estudiadas.

Tabla 5.3: Diseño experimental seguido durante la caracterización de la espumabilidad y la estabilidad de las disoluciones de biopolímero.

Biopolímero	% de polímero en el líquido	% de Tween 80	Nomenclatura
<b>Alginato sin sulfatar</b>	2	0	2An
	4	0	4An
	2	0.5	2An-T
	4	0.5	4An-T
<b>Alginato sulfatado de bajo peso molecular</b>	2	0	2As
	6	0	6As
	2	0.5	2As-T
	6	0.5	6As-T
<b>Gelatina de bovino tipo B</b>	10	0	10Gb
	15	0	15Gb

Los porcentajes manejados son en peso volumen (w/v).

#### 5.3.2.1 Determinación de la espumabilidad y de la estabilidad de las disoluciones

La espumabilidad de las disoluciones se definió como el incremento porcentual en volumen del líquido producido por el proceso de espumado. La ecuación 5.1 describe el cálculo realizado:

$$\%E = \frac{V_E - V_l}{V_l} * 100 \quad \text{EQ 5.1}$$

Donde: %E es el porcentaje de espumabilidad,  $V_E$  es el volumen máximo de espuma alcanzado y  $V_l$  es el volumen de líquido con el cual se formó la espuma.

Para este estudio en particular, el espumado de las disoluciones se realizó inyectando aire, a una velocidad constante, por la parte inferior de una columna vertical de vidrio graduada, la cual contenía en su interior el líquido a espumar (ver figura 5.1a). El volumen inicial de líquido fue de 2 ml. El espumado se realizó a temperatura ambiente hasta que la altura de la espuma en la columna alcanzó el máximo posible.

Por otro lado, la estabilidad de la espuma se consideró como el tiempo de vida media de la espuma formada. El tiempo de vida media se definió como el tiempo necesario para obtener la mitad del volumen máximo de espuma alcanzado.

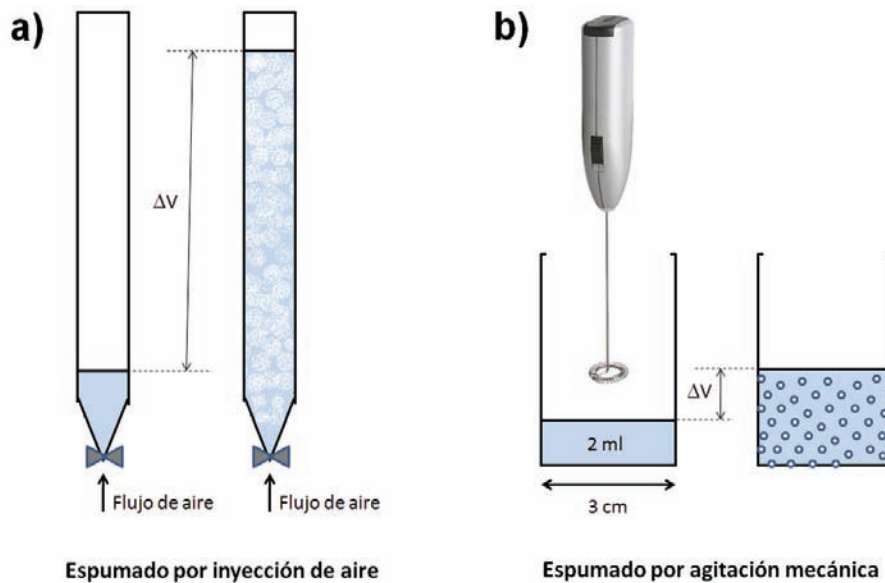


Figura 5.1: Esquema de los dos métodos de espumado empleados en este capítulo. a) Espumado por inyección de aire en una columna para determinar la espumabilidad de la fase líquida y la estabilidad de la espuma, y b) espumado por agitación mecánica usado para obtener las espumas de HA. Los dos esquemas están hechos a escalas diferentes.

### 5.3.3 Desarrollo y caracterización de espumas compuestas auto-fraguables y prefraguadas

La segunda etapa del desarrollo de espumas sólidas compuestas fue la obtención de cementos macroporosos, aplicando el método del espumado de la fase líquida.

#### 5.3.3.1 Método de espumado

El método de espumado empleado es el mismo que se describe en el capítulo 3 de esta tesis. Consistió en espumar 2 ml de disolución de fase líquida por agitación mecánica durante un minuto dentro de recipientes de polipropileno de 3 cm de diámetro por 7 cm de alto (Eurotubo – Deltalab). El agitador empleado para formar la espuma se describe a detalle en el capítulo 3 de esta memoria, y fue operado a una velocidad en aire de 12000 rpm (1.5v), ver figura 5.1b.

En el caso especial de las disoluciones de gelatina, éstas fueron precalentadas a 55 °C y mantenidas a esta temperatura durante el espumado para obtener la disolución en estado líquido lo suficientemente manipulable. El resto de las disoluciones se espumaron a temperatura ambiente.

Posteriormente al espumado, el polvo del cemento fue agregado en un solo paso sobre la espuma dentro del mismo recipiente. La mezcla de ambos componentes constó de dos etapas. En la primera, la mezcla con espátula se realizó lentamente provocando que la espuma mojara al polvo. En la segunda etapa, la mezcla se realizó con más fuerza y velocidad con movimientos circulares para conseguir homogenizar la pasta. Sin embargo, se tuvo precaución de no exceder la fuerza para no romper las burbujas de la espuma.

A excepción de los cementos con gelatina que se mezclaron a 55 °C, la mezcla del polvo con la espuma líquida se realizó a temperatura ambiente. En todos los casos el tiempo total máximo de mezcla fue de 1.5 minutos.

Una vez homogenizada la pasta de cemento se moldeó mediante espátula o por inyección dentro de moldes de teflón para obtener cilindros de 6 mm de diámetro por 12 mm de alto. Los moldes empleados fueron previamente impregnados con un aceite desmoldeante (Desmold 420 Solyplast) para facilitar la extracción y obtener mayor macroporosidad abierta en la superficie de las muestras.

Para llevar a cabo la reacción de fraguado, los cementos macroporosos fueron colocados a 37 °C durante 7 días, envueltos en papel aluminio para evitar la pérdida de agua de las muestras.

Se adoptaron dos estrategias distintas en el diseño de espumas de HA. Por un lado, se desarrollaron formulaciones de cementos inyectables y autofraguables *in situ*, y por otro lado, cementos aptos para la fabricación de andamios macroporosos prefraguados en el laboratorio. La figura 5.2 muestra un esquema de ambas estrategias y lista las características principales requeridas en ambos tipos de material.

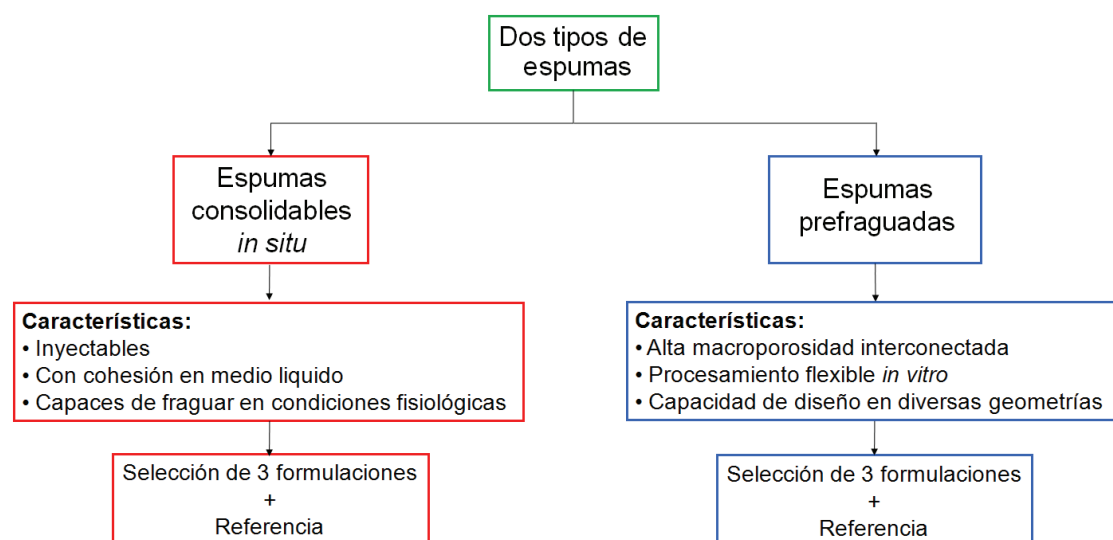


Figura 5.2: Esquema que representa las dos aplicaciones de los cementos macroporosos compuestos a desarrollar, y que enlista las características que deben poseer. Fueron seleccionadas tres formulaciones de cemento compuesto más una referencia para cada aplicación.

### 5.3.3.2 Formulaciones de cemento estudiadas

En el caso de los cementos espumados con gelatina se estudió el efecto de la concentración (5, 10 y 15 %) y el tipo de gelatina (gelatina bovina tipo A o B) para varias proporciones L/P (0.47, 0.55, 0.65, 0.75, y 0.80 ml/g).

Para el alginato de sodio se estudió el efecto del tipo de alginato (sin sulfatar de ultra alto peso molecular, sulfatado de alto peso molecular y sulfatado de bajo peso molecular), la concentración (1, 2, 4 y 6 %), la incorporación de 0.5 % de Tween 80 para incrementar la espumabilidad de la fase líquida y la proporción L/P (0.55, 0.60, 0.65, 0.75 y 0.80 ml/g).

Con extracto de soja se estudió el efecto del contenido de soja (5 y 20 %), la incorporación de 0.5 % de Tween 80 para incrementar la espumabilidad de la fase líquida y la proporción L/P (0.40, 0.55 y 0.65 ml/g).

Finalmente, en el caso de los cementos compuestos con alginato de sodio o extracto de soja, se probó el empleo de la gelatina bovina (tipo A y B) como promotor de la cohesión del cemento compuesto espumado.

Las tablas 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 muestran las diferentes formulaciones de cemento compuesto estudiadas para cada biopolímero. Las concentraciones mostradas hacen referencia al contenido de biopolímero en la fase líquida expresado en w/v para la gelatina, el alginato, y el Tween 80, y en w/w para el extracto de soja.

*Tabla 5.4: Formulaciones de cemento estudiadas en base a gelatina bovina tipo A.*

<b>Biopolímero</b>	<b>Contenido en el líquido [%w/v]</b>	<b>Proporción L/P [ml/g]</b>
<b>Gelatina tipo A</b>	10	0.80
	15	0.47
	15	0.65
	15	0.80

*Tabla 5.5: Formulaciones de cemento estudiadas en base a gelatina bovina tipo B.*

<b>Biopolímero</b>	<b>Contenido en el líquido [%w/v]</b>	<b>Proporción L/P [ml/g]</b>
<b>Gelatina Tipo B</b>	5	0.55
	5	0.65
	5	0.75
	10	0.55
	10	0.65
	10	0.75
	10	0.80
	15	0.55
	15	0.65
	15	0.75
	15	0.80

Tabla 5.6: Formulaciones de cemento estudiadas en base a alginato de sodio sin sulfatar.

Biopolímero principal	Contenido en el líquido [% w/v]	Polímero secundario	Proporción L/P [ml/g]
Alginato de sodio	2	–	0.80
	4	–	0.80
	1	0.5 % de Tween 80	0.55
	1	0.5 % de Tween 80	0.65
	2	0.5 % de Tween 80	0.55
	2	0.5 % de Tween 80	0.65
	2	0.5 % de Tween 80	0.80
	4	0.5 % de Tween 80	0.55
	4	0.5 % de Tween 80	0.65
	4	0.5 % de Tween 80	0.80
	2	10 % de Gel tipo A	0.55
	2	10 % de Gel tipo A	0.65
	2	5 % de Gel tipo B	0.65
	2	10 % de Gel tipo B	0.55
	2	10 % de Gel tipo B	0.65
	2	15 % de Gel tipo B	0.65

Tabla 5.7: Formulaciones de cemento estudiadas en base a alginato de sodio sulfatado.

Biopolímero principal	Contenido en el líquido [%w/v]	Polímero secundario	Proporción L/P [ml/g]
Alginato de sodio sulfatado	2*	–	0.80
	6*	–	0.80
	2*	0.5 % de Tween 80	0.80
	6*	0.5 % de Tween 80	0.80
	2*	5 % de Gel tipo B	0.55
	2*	10 % de Gel tipo B	0.55
	2*	5 % de Gel tipo B	0.65
	2*	10 % de Gel tipo B	0.65
	2*	5 % de Gel tipo B	0.75
	2*	10 % de Gel tipo B	0.75
	1**	0.5 % de Tween 80	0.55
	1**	0.5 % de Tween 80	0.60
	2**	0.5 % de Tween 80	0.55
	2**	0.5 % de Tween 80	0.60
	4**	0.5 % de Tween 80	0.55

\*bajo peso molecular; \*\*alto peso molecular.

Tabla 5.8: Formulaciones de cemento estudiadas en base a extracto de soja.

Biopolímero principal	Contenido en el líquido [%w/w]	Biopolímero secundario	Proporción L/P [ml/g]
	20	–	0.40
	20	0.5 % de Tween 80	0.40
	5	5 % Gel tipo A	0.65
	20	5 % Gel tipo A	0.65
Extracto de soja	5	5 % Gel tipo B	0.65
	20	5 % Gel tipo B	0.65
	5	5 % Gel tipo B	0.55
	5	10 % Gel tipo B	0.55
	20	5 % Gel tipo B	0.55
	20	10 % Gel tipo B	0.55

### 5.3.3.3 Nomenclatura de las espumas de HA compuestas con biopolímeros

La nomenclatura empleada en este capítulo varía ligeramente a la utilizada en el capítulo 4, donde se desarrollaron los compuestos biopolímero/CPC. En primer lugar, a pesar de que no se indica, todas las disoluciones de biopolímero, y por ello todas las espumas de HA, contienen 2.5 % w/v de acelerante de la reacción de fraguado (ver sección 5.3.1.2). En segundo lugar, la nomenclatura general de las espumas de HA se resume en la siguiente ecuación:

$$\#1 \text{ Componente 1} - \#2 \text{ Componente 2} - \text{Condición} - \text{L/P} \quad \text{EQ 5.2}$$

El primer número (#1) corresponde al contenido en la fase líquida del biopolímero principal utilizado (Componente 1), el cual puede corresponder a gelatina tipo A (Ga), gelatina tipo B (Gb), alginato de sodio (An), alginato de sodio sulfatado (As) o extracto de soja (S).

El segundo número (#2) corresponde al contenido opcional en la fase líquida de un segundo polímero (componente 2). En este caso las posibles opciones son Tween 80 (T), Ga ó Gb.

Las concentraciones de los componentes están expresadas en % w/v, a excepción del extracto de soja que está expresado en % w/w.

En algunos casos en particular se hará mención a la condición de procesamiento del cemento (Condición), empleando la siguiente nomenclatura NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado e inyectado.

Finalmente se puede o no mencionar la proporción L/P, expresada en ml/g, usada en la preparación del cemento.

Un ejemplo de esta nomenclatura es 2As-0.5T-E-0.80, la cual significa cemento con 2 % w/v de alginato de sodio sulfatado más 0.5 % w/v de Tween 80, espumado y mezclado bajo una proporción L/P de 0.80 ml/g.

### 5.3.3.4 Ensayo de cohesión para los cementos macroporosos compuestos

La cohesión en medio líquido de la pasta cementante es la propiedad decisiva en la selección del tipo de aplicación del cemento espumado. Si la pasta de cemento no tiene cohesión entonces no puede fraguar *in situ* y por tanto solo se puede usar para fabricar espumas sólidas prefraguadas. Por esta razón, en esta etapa se probaron dos métodos para determinar la cohesión del cemento en agua. Además, se propuso una escala de cohesión, asignando un valor discreto denominado índice de cohesión.

Los métodos empleados para determinar la cohesión fueron:

- 1) La inyección directa de la pasta espumada en agua a 37 °C.
- 2) La inyección de la pasta espumada dentro de un orificio creado en una esponja de poliuretano, la cual en el momento de la inyección estaba completamente mojada y sumergida en agua a 37 °C.

La intención de usar la esponja de poliuretano fue la de simular la estructura trabecular del hueso, para probar si el cemento es capaz de adherirse a las paredes porosas de la esponja.

Bajo ambas metodologías la pasta de cemento se inyectó justo después de la preparación. Los cementos fueron preparados bajo el protocolo descrito en la sección 5.3.3.1.

En cuanto al índice de cohesión, éste asigna valores enteros entre 1 y 4 unidades a las pastas de cemento de acuerdo al comportamiento en contacto con el líquido. La tabla 5.9 resume las asignaciones propuestas.

*Tabla 5.9: Índices de cohesión asignados a las pastas de cemento compuesto espumadas e inyectadas, en función del comportamiento al contacto con agua a 37 °C.*

Índice de cohesión	Condición de prueba	
	Inyección directa en líquido	Inyección dentro de la espuma polimérica
1	Se desintegra inmediatamente.	Sale de la cavidad inmediatamente.
2	Se desintegra en un periodo de 24 horas.	Más de un 30 % de la pasta sale de la cavidad en un periodo de 24 horas.
3	Se sueltan algunas partículas de la superficie, pero el cemento fragua.	Se sueltan algunas partículas de la superficie, pero el cemento fragua dentro de la cavidad.
4	Cohesión completa.	Cohesión completa y fraguado dentro de la cavidad.

Adicionalmente, con el objetivo de simular las condiciones ambientales de una sala de operaciones, la preparación de los cementos se llevó a cabo a una temperatura ambiente de 20 °C. En el caso de las formulaciones de cemento con gelatina, la fase líquida fue precalentada y mantenida a 55 °C dentro de un recipiente térmico para realizar el espumado y el mezclado con el polvo de cemento.

Finalmente, las espumas que presentaron cohesión (índice de cohesión de 3 o 4) fueron fraguadas durante 7 días por inmersos en solución de Ringer (0.9 % NaCl), para observar mediante microscopía estereoscópica (Olympus SZ51) la existencia de macroporosidad en la



estructura consolidada. En las muestras que combinaron cohesión y macroporosidad se determinó la porosidad total, a través de inmersión en mercurio (ver capítulo 3 sección 3.3.5.5).

### 5.3.3.5 Caracterización de las espumas sólidas obtenidas

Las espumas sólidas obtenidas después de 7 días de fraguado envueltas en papel de aluminio fueron analizadas en términos de porosidad, densidad esquelética y macroestructura, de acuerdo a la tabla 5.10. Este estudio se realizó para correlacionar los resultados de espumabilidad y estabilidad con la macroporosidad incorporada por el proceso de espumado.

*Tabla 5.10: Técnicas de caracterización de los cementos compuestos macroporosos.*

Propiedad de interés	Técnica de análisis empleada	Número de muestras
<b>Porosidad total</b>	Inmersión en mercurio	n = 3
<b>Macroporosidad total</b>	Inmersión en mercurio	n = 3
<b>Densidad esquelética</b>	Picnometría de helio (Micromeritics, AccuPyc 1330)	n = 5
<b>Macroestructura</b>	Microscopía electrónica de barrido (Jeol JSM 6400)	n = 1

También se estudió el cambio en la porosidad que produjo inyectar la pasta espumada a través de una jeringa comercial con capacidad para 5 ml, y apertura de la boquilla de 2 mm de diámetro, sin dejar transcurrir tiempo entre el mezclado y la inyección de la pasta.

Las muestras empleadas para la inmersión en mercurio fueron cilindros de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura. Muestras no espumadas, obtenidas con las mismas soluciones biopoliméricas y proporciones L/P, fueron preparadas como controles para verificar la eficacia del espumado. Las mismas probetas se usaron para determinar la densidad esquelética de los materiales (ver capítulo 3 sección 3.3.5.6). Las muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB) se prepararon y se observaron de acuerdo al capítulo 3, sección 3.3.5.4.

### 5.3.3.6 Criterios de selección

Como formulaciones inyectables y autofraguables *in situ* se seleccionaron todas aquellas que combinaron cohesión y macroporosidad después de ser inyectadas y fraguadas. Sin embargo, para continuar la caracterización *in vitro* e *in vivo*, se seleccionó una sola formulación de cemento compuesto por cada biopolímero principal; la selección se realizó teniendo en cuenta el balance de las siguientes propiedades:

1. Cohesión adecuada.
2. Máxima porosidad total obtenida.
3. Máximo contenido del biopolímero principal.

En cuanto a las formulaciones prefraguadas, éstas se seleccionaron entre aquellos cementos compuestos preparados con las proporciones L/P más altas, moldeados por espátula y fraguados envueltos en papel de aluminio, puesto que fueron los que mayor macroporosidad interconectada presentaron. Finalmente y de forma similar a las formulaciones autofraguables, un solo compuesto por cada biopolímero fue seleccionado en base a:

1. Máxima porosidad obtenida.

### 5.3.3.7 Caracterización de la porosidad abierta

Una vez seleccionada una formulación de cemento por cada biopolímero y aplicación, éstas se caracterizaron en términos de porosidad abierta, o lo que es igual, porosidad interconectada. La técnica que permitió medir la cantidad de porosidad abierta fue la porosimetría de intrusión de mercurio (MIP). Mediante esta técnica se cuantificó la densidad aparente, la porosidad abierta total, la microporosidad abierta (poros con conexiones de tamaños entre 6 nm y 5  $\mu\text{m}$ ) y la macroporosidad abierta (poros con conexiones de tamaños entre 5 y 360  $\mu\text{m}$ ) de las formulaciones seleccionadas. La distribución de la porosidad (calculada de acuerdo al capítulo 2 sección 2.6.1) se representó gráficamente en función del tamaño de entrada de poro en escala logarítmica. Las muestras empleadas fueron dos cilindros de cemento espumados bajo las condiciones descritas en la sección 5.3.3.1, fracturados a mano por la mitad de la sección transversal.

Los cementos autofraguables fueron moldeados por inyección y fraguados por inmersión en solución de Ringer, mientras que los cementos prefraguados fueron moldeados con espátula y fraguados envueltos en papel de aluminio para evitar la pérdida de agua. En ambos casos durante 7 días a 37 °C.

La macroestructura de las espumas compuestas seleccionadas también se caracterizó mediante MEB (ver tabla 5.10). Finalmente, a las espumas consideradas como inyectables y autofraguables, se les determinó el diámetro de los macroporos mediante análisis de imagen (software empleado: Adobe Phothoshop CS4).

## 5.3.4 Estudio cinético de la reacción de endurecimiento

### 5.3.4.1 Diseño experimental

El estudio cinético consistió en seguir la evolución de las propiedades listadas en la tabla 5.11, para los siguientes puntos de tiempo durante el endurecimiento de las espumas autofraguables seleccionadas: 0, 2, 8, 24, 168, 288, 480 y 648 horas.

El medio de fraguado que simuló las condiciones fisiológicas fue la disolución de Ringer, la cual consiste en 0.9 % en peso de NaCl en agua.

Tabla 5.11: Propiedades analizadas durante el estudio cinético.

Propiedad	Técnica de caracterización
% de reacción	Difracción de rayos X
Superficie específica	Adsorción de nitrógeno a 77 °K
Microestructura	Microscopía electrónica de barrido
Comportamiento mecánico	Resistencia a la compresión
Liberación de los polímeros al medio de fraguado	Espectroscopia de infrarrojos

Por otro lado, debido a los problemas que puede comportar el empleo de la gelatina de origen bovino, se probó de forma opcional el empleo de gelatina de porcino tipo B (Rousselot, ref. LP – B. Bloom = 250), para la fabricación de las espumas que contienen gelatina en la formulación.

Por último, se analizó también el fraguado de las espumas en medio de cultivo celular MEM sin la adición de suero fetal. En este caso particular, se calculó el porcentaje en el avance de la

reacción de fraguado a un único tiempo. El tiempo estudiado se seleccionó en base a los resultados del estudio cinético en solución de Ringer y correspondió a 24 horas de reacción.

#### **5.3.4.2 Preparación de las muestras**

La fabricación de los cementos compuestos macroporosos se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente (ver sección 5.3.3.1). La pasta cementante obtenida fue moldeada mediante inyección dentro de moldes de teflón. Inmediatamente los cementos fueron sumergidos en disolución de Ringer y colocados en una estufa a 37 °C, hasta cumplirse el tiempo de ensayo.

En este estudio en particular el cemento de referencia (no espumado) fue fabricado bajo una proporción L/P = 0.35 ml/g, 2.5 % w/v de acelerante y moldeado con espátula (RefA-0.35).

#### **5.3.4.3 Métodos de caracterización**

Porcentaje de reacción: El avance de la reacción de fraguado a los diferentes tiempos de ensayo se determinó mediante difracción de rayos X (DRX), de acuerdo al capítulo 3 sesión 3.3.5.8. Los ensayos de difracción se realizaron sobre las muestras ensayadas a compresión previamente pulverizadas a mano en un mortero de ágata.

A diferencia del capítulo 3, el porcentaje de avance de la reacción se determinó midiendo el área bajo la curva de los picos principales de difracción del  $\alpha$ -TCP.

Superficie específica. La superficie específica a los diferentes tiempos de ensayo se determinó de acuerdo al capítulo 3 sección 3.3.5.9. Los ensayos se realizaron sobre las muestras ensayadas a compresión.

Microestructura. La superficie de fractura de las muestras ensayadas a compresión fue analizada por microscopía electrónica de barrido (MEB; Jeol JSM 6400) de acuerdo al capítulo 3, sección 3.3.5.4.

Resistencia a la compresión: La resistencia a la compresión y el módulo elástico a compresión fueron determinados de acuerdo al capítulo 3 sección 3.3.5.7.

Las muestras probadas fueron cilindros de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura, fraguados durante los tiempos seleccionados. Las muestras fueron ensayadas bajo una condición de humedad total. Un mínimo de 10 probetas fueron empleadas en cada caso.

Espectroscopia de infrarrojos: La liberación de los biopolímeros desde el cemento hacia el medio de fraguado se estudió a través de espectroscopia de infrarrojos (IR; espectrofotómetro por transformada de Fourier Bomem MB-120). El estudio consistió en detectar los cambios en las bandas del espectro, entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , en función del tiempo de reacción con respecto a los espectros obtenidos para los componentes en estado puro (alginato de sodio, gelatina y extracto de soja). Las muestras ensayadas fueron fragmentos de las probetas ensayadas a compresión previamente trituradas a mano en un mortero de ágata. Las muestras de los biopolímeros puros fueron el polvo triturado completamente seco. Para obtener los espectros se agregó bromuro de potasio (KBr) a cada muestra en una proporción aproximada de 200:2 (KBr:muestra).

### 5.3.5 Análisis estadístico de los resultados

Las pruebas de igualdad de medias se realizaron aplicando la prueba estadística t de Student. El criterio de rechazo o aceptación de la hipótesis nula se fijó en un porcentaje de confiabilidad del 0.05 %.

## 5.4 Resultados y discusión

### 5.4.1 Espumabilidad y estabilidad de las disoluciones de biopolímeros

Con el método de espumado por insuflado de aire dentro de una columna, las disoluciones poliméricas formaron espumas con burbujas poliédricas con diámetros mayores a 1 cm, con paredes líquidas delgadas fáciles de romper al contacto. No obstante, debido al mayor tamaño de las burbujas, la sensibilidad de esta técnica es elevada, pudiendo detectar cambios pequeños de espumabilidad para diferentes biopolímeros y concentraciones.

En la figura 5.3 se muestra la espumabilidad y la estabilidad de las espumas de biopolímero, determinadas con el método de insuflado de aire.

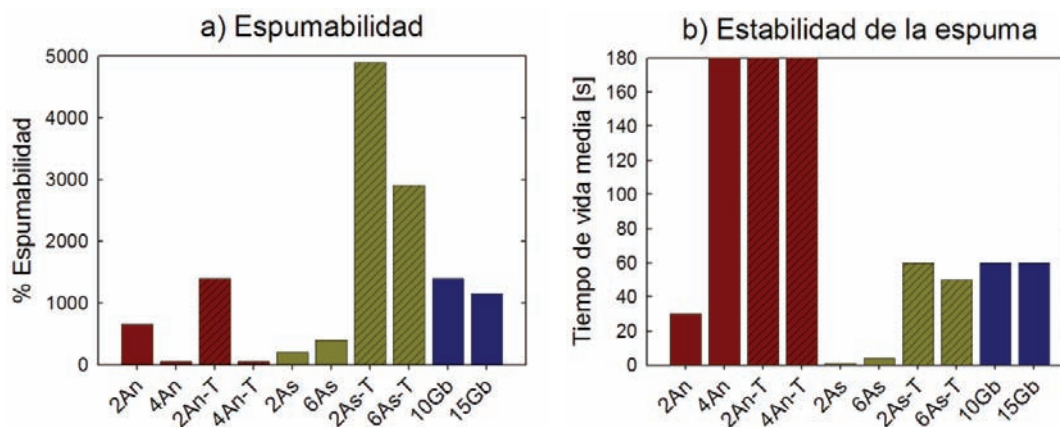


Figura 5.3: Espumabilidad y estabilidad de las espumas obtenidas con los biopolímeros a través del método de insuflado de aire dentro de una columna de vidrio.

**Espumabilidad:** Como primer punto se puede ver que la espumabilidad de las disoluciones de alginato de sodio fue relativamente baja y disminuyó con el incremento de la concentración. Esto se debe a que la disolución más concentrada se hace más viscosa, lo que dificulta la incorporación de aire en el líquido. Por otro lado, con la adición de 0.5 % de Tween 80 la espumabilidad de la disolución al 2 % de alginato se incrementó al doble, mientras que la disolución del 4 % continuó sin espumarse.

Por su parte, las disoluciones de alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular tienen una viscosidad similar a la del agua. Pero como se muestra en la figura 5.3 la espumabilidad fue muy baja, por lo que el alginato sulfatado de bajo peso molecular no actúa como espumante. La incorporación de 0.5 % de Tween 80 en la disolución de alginato sulfatado incrementó considerablemente la espumabilidad, de forma comparable a como lo hace con el agua pura. En la figura 5.3 se observa también que el incremento de la concentración de alginato sulfatado disminuyó la espumabilidad de la disolución que contiene Tween 80.

Por otro lado, la espumabilidad de las disoluciones de gelatina fue mayor que la espumabilidad de las disoluciones de alginato de sodio sin sulfatar y alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular ambos sin Tween 80, pero no fue tan alta como la de las disoluciones de alginato sulfatado más Tween 80. Asimismo, la espumabilidad de la disolución de gelatina al 10 % fue ligeramente mayor que la del 15 %. Nuevamente, la diferencia se puede atribuir a la viscosidad de la disolución que se incrementa con el aumento del contenido de gelatina.

*Estabilidad:* En cuanto a la estabilidad de las espumas, a pesar de que las disoluciones de alginato de sodio son poco espumables, éstas fueron las que presentaron con gran diferencia la mayor estabilidad con y sin la incorporación de Tween 80 en la disolución. La excepción a esta regla se encontró en la disolución al 2 % de alginato sin Tween 80, que es la de menor viscosidad de las disoluciones de alginato de sodio sin sulfatar estudiadas.

Resulta extraño hablar de estabilidad de las espumas si las disoluciones de partida prácticamente no son espumables. Tal es el caso de las disoluciones de alginato de sodio al 4 % con y sin la incorporación de Tween 80. No obstante, en estos casos alguna burbuja formada dentro del líquido, ya sea por el espumado o durante la preparación de la disolución, es capaz de permanecer durante horas sin romperse, aunque el incremento de volumen que origina no sea significativo.

Las disoluciones de alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular sin Tween 80 fueron ligeramente más espumables que las disoluciones de alginato de sodio sin sulfatar más concentradas. Sin embargo, y a pesar de incorporar más burbujas, al dejar de espumar las pocas burbujas formadas colapsaron inmediatamente. Por lo que el alginato sulfatado de bajo peso molecular no es un estabilizador de las espumas, probablemente por la baja viscosidad de sus disoluciones. No obstante, la adición de Tween 80 incrementó la estabilidad de las espumas obtenidas, sin presentar diferencias considerables con respecto a la concentración de alginato sulfatado.

De acuerdo a estos resultados, el alginato de sodio no es un espumante natural a pesar de poseer grupos laterales negativos en la estructura. Una posible explicación es que la distribución de los grupos es homogénea en la molécula y por tanto no cuenta con zonas de carga negativa y zonas de carga neutra o positiva alejadas, por lo cual no actúa como tensoactivo. Sin embargo, dependiendo del peso molecular, el alginato de sodio puede llegar a ser un gran estabilizador de las espumas, debido a la alta viscosidad de la disolución, pero se debe moderar el empleo porque en exceso impide la espumabilidad de las disoluciones. Además, las pocas burbujas atrapadas en las disoluciones más viscosas pueden llegar a permanecer por largos periodos de tiempo. Finalmente, se puede decir que en este sistema, el efecto mayoritario del Tween 80 es el de formar la espuma, en tanto que el efecto mayoritario del alginato de sodio es el de estabilizarla.

Las espumas de gelatina fueron tan estables como las espumas de alginato sulfatado más Tween 80. La estabilidad no se modificó con el cambio en la concentración de gelatina en el intervalo estudiado. Sin embargo, la estabilidad no llegó a ser tan alta como la estabilidad mostrada por las disoluciones de alginato de sodio sin sulfatar de ultra alto peso molecular.

Es sabido que la gelatina es un espumante natural empleado en gran variedad de procesos, principalmente para la obtención de productos alimentarios, como natas o helados [6]. La gelatina tipo B, que tiene una carga neta negativa, es un buen espumante y estabilizador de espumas bajo las condiciones probadas, y no necesita de la incorporación de agentes surfactantes como el Tween 80 para mejorar la obtención de espumas líquidas.

En base a estos resultados se puede proponer cualitativamente que la espumabilidad es inversamente proporcional, mientras que la estabilidad es directamente proporcional a la viscosidad de la disolución. Sin embargo, la constante de proporcionalidad no fue determinada, ya que se requiere de los valores cuantitativos de viscosidad, los cuales no fueron medidos en este trabajo. Además, cabe mencionar que la viscosidad depende de la concentración de la disolución y del peso molecular del soluto, que en este caso corresponde al biopolímero empleado.

Se puede decir, de forma cualitativa, que algunos factores que incrementan la espumabilidad de la fase líquida de los cementos son:

- La baja viscosidad de la fase líquida a espumar.
- En algunos casos específicos el uso adicional de un surfactante.

También se puede decir que los factores que incrementan la estabilidad de la espuma líquida son:

- La alta viscosidad de la fase líquida espumada.
- En algunos casos específicos el uso adicional de un surfactante.

Finalmente, la selección del agente espumante, para obtener los mejores resultados en la fabricación de CPC macroporosos, debe hacerse balanceando las características de la disolución, de tal forma que posea la mayor espumabilidad posible a la par de una buena estabilidad. En base a los resultados obtenidos se propone la siguiente jerarquización, de mejor a peor disolución de agente espumante:

$$2As-T > 6As-T > 2An-T > 10Gb > 15Gb > 2An > 2As > 6As > 4An-T > 4An$$

#### 5.4.2 Cohesión en medio líquido de las pastas de cemento compuesto

La cohesión es una propiedad indispensable de las pastas empleadas como relleno óseo, debido a que de ella depende que el material permanezca en el sitio de la lesión, sin desintegrarse hasta que termine de fraguar. Si la pasta se desintegrara, no llega a formar un cuerpo sólido, y por tanto no cumpliría con la función de relleno, además de que las partículas liberadas de cemento podrían causar daños en el tejido circundante.

Por lo anterior, a continuación se describen algunos aspectos generales de la prueba y del índice de cohesión propuestos.

Al inyectar el cemento dentro de la cavidad de la esponja se observó que la pasta era capaz de desplazar el agua del interior del orificio y que no se disolvía en el medio; por lo que se espera que la presión sanguínea no sea un inconveniente en el relleno de defectos óseos *in vivo*.

Es importante señalar que la inyección del cemento dentro de la esponja se realizó con el orificio en posición vertical (ver figura 5.4 superior), no obstante, en esa posición la fuerza de gravedad estabiliza la pasta dentro del orificio, por lo que inmediatamente después de terminar la inyección, el orificio se colocó en posición horizontal, posición en la que se determinó el índice de cohesión del cemento.

Para los cementos con índice de cohesión 4 (ejemplos mostrados en la figura 5.4 inferior – izquierda) no se observaron desprendimientos de material durante un periodo mínimo de 24 horas en contacto con agua a 37 °C. En los cementos inyectados dentro de la esponja se pudo apreciar una pequeña protuberancia sobre la superficie, originada por el fin del cordón de la pasta inyectada.



Figura 5.4: Imágenes de las pruebas de cohesión llevadas a cabo y ejemplos de pastas cementantes con y sin cohesión. Arriba: imagen de la inyección dentro de la cavidad de la esponja. Abajo-izquierda: Imágenes de pastas con un índice 4 de cohesión, dentro de la espuma y directamente en medio líquido. Abajo-derecha: Imágenes de pastas con un índice 1 de cohesión, dentro de la espuma y directamente en medio líquido.

En la mayoría de los casos el índice de cohesión asignado fue el mismo tanto en esponja como directamente en el líquido. Sin embargo, para algunas formulaciones la cohesión fue mayor dentro de la esponja, lo cual indica que las paredes del orificio ayudan a mantener la integridad de la pasta durante el fraguado. Este resultado es importante puesto que la esponja simula mejor la condición esperada *in vivo*.

Por otro lado, la desintegración de los cementos sin cohesión fue también bastante clara, tanto directamente en el líquido como en la esponja (ver figura 5.4 inferior – derecha). Las pastas sin cohesión se desintegraron produciendo gránulos de material en la posición inicial y/o la vecindad del sitio de inyección.

Además, en algunos casos en los cementos con cohesión se observó un halo de turbidez alrededor de la pasta inyectada directamente en el líquido. El halo podría deberse a la disolución parcial de la pasta, pero en ningún caso se observó la desintegración del material.



Finalmente, en todos los casos de formulaciones que presentaron cohesión dentro del orificio de la esponja, los cementos se fijaron con considerable firmeza. Probablemente la ligera dilución de la pasta (halo visto en las muestras inyectadas directamente en agua) le permita penetrar en los poros ubicados en la superficie del orificio, y al endurecer genere la unión mecánica con la esponja, que *in vivo* podría ser la estructura trabecular ósea.

#### 5.4.2.1 Cohesión de las diversas formulaciones de cementos compuestos

En las tablas 5.12, 5.13, 5.14, 5.15 y 5.16 se resumen los resultados de cohesión y la presencia o no de macroporos en los cementos compuestos con gelatina tipo A, gelatina tipo B, alginato de sodio, alginato de sodio sulfatado y extracto de soja, respectivamente.

Cabe mencionar que en algunos casos para mejorar la cohesión de las espumas se hicieron mezclas de polímeros. En particular a las espumas obtenidas con alginato de sodio, sulfatado y sin sulfatar, o extracto de soja se les incorporó un 5 o un 10 % w/v de gelatina tipo A o B.

*Gelatina tipo A:* Prácticamente en ningún caso los cementos espumados con gelatina tipo A tuvieron cohesión, a excepción de la espuma obtenida con 15 % de gelatina tipo A con L/P = 0.80 ml/g (15Ga-0.80) que mostró un índice de cohesión de tan solo 3 unidades.

Tabla 5.12: Resultado de los ensayos de cohesión realizados con las pastas de cementos compuestos espumados con gelatina bovina tipo A, y presencia de macroporosidad en los compuestos con cohesión. Porosidad observada mediante microscopía óptica.

Biopolímero	Contenido [%w/v]	Proporción L/P [ml/g]	Índice de cohesión en agua	Índice de cohesión dentro de la esponja	Macroporosidad
Gelatina A	10	0.80	2	2	n.a.
	15	0.47	2	2	n.a.
	15	0.65	2	1	n.a.
	15	0.80	3	3	-

n.a.: no aplica la determinación pues la pasta no presentó cohesión.

*Gelatina tipo B:* Por otro lado, prácticamente todas las formulaciones espumadas con gelatina tipo B tuvieron cohesión, valorada con un índice de 4, para un amplio intervalo de concentraciones y proporciones L/P.

La cohesión de las espumas compuestas con 5 % de gelatina B disminuyó con el incremento de la proporción L/P, mientras que para 10 y 15 % de gelatina la cohesión fue relativamente constante, entre L/P 0.55 y 0.75 ml/g. Este resultado sugiere que el mayor contenido de gelatina tipo B incrementa la cohesión de las pastas fabricadas con mayores proporciones L/P. Sin embargo, la cohesión de las espumas fabricados con L/P = 0.80 ml/g disminuyó obteniendo un índice de cohesión 3, siendo esta proporción L/P la más alta que se puede emplear para asegurar la cohesión de las pastas compuestas con 10 ó 15 % de gelatina tipo B.



*Tabla 5.13: Resultado de los ensayos de cohesión realizados con las pastas de cementos compuestos espumados con gelatina bovina tipo B, y presencia de macroporosidad en los compuestos con cohesión. Porosidad observada mediante microscopía óptica.*

Biopolímero	Contenido [%w/v]	Proporción L/P [ml/g]	Índice de cohesión en agua	Índice de cohesión dentro de la esponja	Macroporosidad
<b>Gelatina B</b>	5	0.55	4	4	NO
	5	0.65	3	3	-
	5	0.75	1	1	n.a.
	10	0.55	4	4	NO
	10	0.65	4	4	SI
	10	0.75	4	4	SI
	10	0.80	3	3	SI
	15	0.55	3	3	-
	15	0.65	4	4	SI
	15	0.75	4	4	SI
	15	0.80	3	3	SI

n.a.: no aplica la determinación pues la pasta no presentó cohesión; SI: si macroporos; NO: no macroporos.

Los resultados sugieren que la gelatina B actúa como un gel promotor de la cohesión, permitiendo obtener formulaciones de espumas inyectables aptas para relleno óseo. No obstante, no todas las pastas con cohesión dieron origen a macroporos en la estructura, por tal motivo solo aquellas con proporción L/P mayor o igual a 0.65 ml/g fueron seleccionados para su futura caracterización.

Un factor que debe tomarse en cuenta al espumar cementos con gelatina, es mantener la temperatura de la fase líquida y de la pasta a 55 °C, por lo menos hasta obtener una pasta homogénea para inyectar. Si la temperatura baja, entonces la fase líquida gelifica impidiendo el espumado y el mezclado con el polvo. Por otro lado, la pasta con gelatina también es susceptible de gelificar por lo que debe inyectarse mientras esté caliente, si se enfría entonces el cemento endurece y queda atrapado al interior de la jeringa. No obstante, no se comprobó si el gelificado de la pasta es reversible térmicamente, como se revierte el gelificado de las diluciones de gelatina.

Alginato de sodio sin sulfatar: Para los cementos compuestos con alginato de sodio más gelatina se observó algo similar a los compuestos con gelatina sola. Los compuestos con alginato más gelatina tipo A no tuvieron cohesión, mientras que los compuestos con alginato más gelatina B sí la tuvieron. Sin embargo, el índice de cohesión no llegó a ser de 4 a pesar de emplear proporciones L/P muy por debajo de 0.80 ml/g.

En cuanto a la presencia de macroporosidad sólo el compuesto 2An-10Gb con L/P = 0.55 ml/g presentó gran cantidad de macroporos. Desafortunadamente, al incrementar el contenido de gelatina al 15 % para brindar mayor cohesión, la viscosidad de la fase líquida fue tan alta que no pudo ser espumada.

Tabla 5.14: Resultado de los ensayos de cohesión realizados con las pastas de cementos compuestos espumados en base a alginato de sodio, y presencia de macroporosidad en los compuestos con cohesión. Porosidad observada mediante microscopía óptica.

Biopolímero principal	Contenido [% w/v]	Polímero secundario	Proporción L/P [ml/g]	Índice de cohesión en agua	Índice de cohesión dentro de la esponja	Macroporosidad
Alginato de sodio	1	0.5 % Tween 80	0.55	1	3	n.a.
	1	0.5 % Tween 80	0.65	1	2	n.a.
	2	0.5 % Tween 80	0.55	4	4	SI
	2	0.5 % Tween 80	0.65	1	3	n.a.
	2	0.5 % Tween 80	0.80	1	1	SI
	4	0.5 % Tween 80	0.55	4	4	NO
	4	0.5 % Tween 80	0.65	4	4	NO
	2	10 % Gel A	0.55	2	2	n.a.
	2	10 % Gel A	0.65	1	1	n.a.
	2	5 % Gel B	0.65	2	3	n.a.
	2	10 % Gel B	0.55	3	3	SI
	2	10 % Gel B	0.65	3	3	-
	2	15 % Gel B	0.65	3	3	NO

n.a.: no aplica la determinación pues la pasta no presentó cohesión; SI: si macroporos; NO: no macroporos.

Por otro lado, para los cementos compuestos con alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80, la espuma con la mayor macroporosidad obtenida con una proporción L/P = 0.80 ml/g no tuvo cohesión. Sin embargo, el incremento del contenido de alginato incrementó ligeramente la cohesión de pastas preparadas con L/P entre 0.55 y 0.65 ml/g. Cabe mencionar que estas espumas mostraron mejor cohesión dentro de la esponja que directamente en agua.

El incremento de la proporción L/P produjo la disminución de la cohesión de los cementos con 1 y 2 % de alginato más Tween 80, mientras que con 4 % no se encontraron cambios en el intervalo estudiado.

Desafortunadamente, sólo una formulación con alginato de sodio más Tween 80 tuvo buena cohesión y presentó simultáneamente macroporosidad en la estructura, la cual corresponde a 2 % de alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80, con L/P = 0.55 ml/g (2An-0.5T-0.55).

Alginato de sodio sulfatado: A diferencia de los cementos compuestos con alginato de sodo sin sulfatar, los compuestos con alginato sulfatado de bajo peso molecular más gelatina tipo B no tuvieron cohesión. Esto puede ser atribuido al punto isoeléctrico de la gelatina tipo B (ubicado entre 4.5 y 5.6), que bajo las condiciones de trabajo (pH mayor a 7) origina una carga neta negativa de la gelatina en disolución. Considerando que el alginato sulfatado también es altamente negativo (mas que el alginato sin sulfatar), se puede genera una repulsión isostática entre ambos polímeros que provoca la desintegración de la pasta cementante. Lo cual también explicaría que el índice de cohesión de los cementos compuestos con gelatina B y alginato de sodio sin sulfatar no llegara a ser de 4 (ver tabla 5.14).

Por otro lado, las espumas compuestas con alginato sulfatado de bajo peso molecular más 0.5 % de Tween 80, con L/P = 0.80 ml/g, que mostraron la mayor macroporosidad, tampoco tuvieron cohesión. No obstante, los compuestos con alginato sulfatado de alto peso molecular más 0.5 % de Tween 80 tuvieron mayor cohesión. Probablemente las causas de la mejor cohesión son la mayor viscosidad, la presencia de mayor carga negativa aportada por los grupos sulfato, y el mayor entrecruzamiento del hidrogel que se forma con las cadenas poliméricas más largas y los iones calcio del cemento.

Finalmente y a diferencia de los compuestos con alginato de sodio sin sulfatar, varios compuestos con alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular con 0.5 % de Tween 80 mostraron macroporosidad aceptable como se indica en la tabla 5.15.

*Tabla 5.15: Resultado de los ensayos de cohesión realizados con las pastas de cementos compuestos espumados en base a alginato de sodio sulfatado, y presencia de macroporosidad en los compuestos con cohesión. Porosidad observada mediante microscopía óptica.*

Biopolímero principal	Contenido [%w/v]	Polímero secundario	Proporción L/P [ml/g]	Índice de cohesión en agua	Índice de cohesión dentro de la esponja	Macroporosidad
Alginato de sodio sulfatado	2*	0.5 % Tween 80	0.80	1	1	SI
	2*	5 % Gel B	0.55	1	1	n.a.
	2*	10 % Gel B	0.55	2	3	n.a.
	2*	5 % Gel B	0.65	1	1	n.a.
	2*	10 % Gel B	0.65	1	2	n.a.
	2*	5 % Gel B	0.75	1	1	n.a.
	2*	10 % Gel B	0.75	1	1	n.a.
	1**	0.5 % Tween 80	0.55	4	4	SI
	1**	0.5 % Tween 80	0.60	3	3	SI
	2**	0.5 % Tween 80	0.55	4	4	SI
	2**	0.5 % Tween 80	0.60	3	3	SI
	4**	0.5 % Tween 80	0.55	4	4	NO

\*bajo peso molecular; \*\*alto peso molecular; n.a.: no aplica la determinación pues la pasta no presentó cohesión; SI: si macroporos; NO: no macroporos.

Extracto de soja: Por su parte los cementos macroporosos compuestos únicamente con extracto de soja no tuvieron cohesión en agua, a pesar de la baja proporción L/P con la que se prepararon (L/P = 0.40 ml/g). Para superar el inconveniente y en vista de la buena cohesión que indujo la gelatina sobre los compuestos con alginato, se probaron compuestos soja más gelatina para mejorar esta propiedad.

Como resultado se encontró que la incorporación de gelatina tipo A en los compuestos con soja tampoco favoreció la cohesión. Sin embargo, la adición de gelatina tipo B si la incrementó.

Para los compuestos con soja más gelatina B se siguió el comportamiento típico del cemento, es decir, para mayor proporción L/P menor cohesión. Por su parte mayor cantidad de extracto de soja o gelatina incrementaron la cohesión del material.

Finalmente, en los compuestos con buena cohesión sólo fue observada macroporosidad en aquellas formulaciones con 5 o 10 % de gelatina con 20 % en peso de soja y L/P = 0.55 ml/g.

*Tabla 5.16: Resultado de los ensayos de cohesión realizados con las pastas de cementos compuestos espumados en base a extracto de soja, y presencia de macroporosidad en los compuestos con cohesión. Porosidad observada mediante microscopía óptica.*

Biopolímero principal	Contenido [%w/w]	Polímero secundario	Proporción L/P [ml/g]	Índice de cohesión en agua	Índice de cohesión dentro de la esponja	Macroporosidad
	20	–	0.40	2	2	SI
	5	5 % Gel A	0.65	1	1	n.a.
	20	5 % Gel A	0.65	1	1	n.a.
Extracto de soja	5	5 % Gel B	0.65	2	2	n.a.
	20	5 % Gel B	0.65	2	2	n.a.
	5	5 % Gel B	0.55	3	3	-
	5	10 % Gel B	0.55	4	4	NO
	20	5 % Gel B	0.55	4	4	SI
	20	10 % Gel B	0.55	4	4	SI

n.a.: no aplica la determinación pues la pasta no presentó cohesión; SI: si macroporos; NO: no macroporos.

#### 5.4.2.2 Biopolímeros como promotores de la cohesión

El índice de cohesión de los cementos compuestos dependió principalmente de la proporción L/P y del biopolímero empleado como agente espumante. La proporción L/P es una de las variables de proceso más importantes en el control de las propiedades finales de los cementos. En el capítulo 3 se comprobó que el incremento de la proporción L/P facilita la incorporación de macroporos, desafortunadamente, el aumento de la L/P está limitado por la cohesión de la pasta cementante y por la resistencia mecánica de la estructura fraguada, las cuales son menores cuanto mayor es la proporción L/P.

Una de las funciones esperadas de los biopolímeros usados como agentes espumantes fue incrementar la cohesión de las pastas de cemento espumadas. La hipótesis se basa en la capacidad de la gelatina y del alginato de sodio para gelificar, esperando que la formación del gel retenga las partículas de reactivo durante el fraguado, incrementando la cohesión.

Bajo esta hipótesis, la formación y la estabilidad del gel son los factores primordiales para incrementar la cohesión. El mecanismo de formación del gel de gelatina y de alginato es muy diferente. La gelatina gelifica por el acomplejamiento de las cadenas proteicas entre sí mismas al reducirse la temperatura de la disolución por debajo de 37 °C [6,7], mientras que la formación del gel de alginato requiere la presencia de cationes bivalentes como el calcio para formar uniones entre las diferentes cadenas del carbohidrato [8].

El gel del alginato de sodio formado con los iones calcio del cemento no resultó ser lo suficientemente rígido como para permitir obtener pastas de cemento con cohesión con proporciones L/P superiores a 0.60 ml/g. Probablemente la insuficiente rigidez del gel se deba

a la baja concentración de alginato en disolución y/o al empleo del acelerante de la reacción de fraguado del cemento, el cual puede bloquear los sitios de la cadena polimérica que se enlazan para formar el gel [8]. Pese a ello, no son factibles concentraciones mayores de alginato debido a que reducen la espumabilidad de la disolución, y el empleo del acelerante es necesario para obtener formulaciones de cemento con tiempos de fraguado adecuados para uso clínico (ver capítulo 4). Para obtener mayor cohesión se propuso emplear el alginato sulfatado de alto peso molecular, puesto que a mayor peso molecular la viscosidad es mayor y la desintegración de la pasta es más difícil. Además, las cadenas poliméricas de mayor longitud favorecen la rigidez del gel [8], manteniendo más unidas a las partículas que conforman la pasta y por tanto mejorando la cohesión.

Como se explicó, el gelificado de los biopolímeros es un factor importante en la cohesión, sin embargo, también se encontró una influencia de la carga eléctrica del biopolímero. De forma cualitativa se observó que biopolímeros con carga neta negativa, como la gelatina tipo B o el alginato de sodio, brindan mayor cohesión a la pasta de  $\alpha$ -TCP. También se observó cualitativamente que mezclas de biopolímeros con cargas negativas, como la gelatina tipo B más el alginato de sodio, disminuyen la cohesión. Es difícil encontrar la razón exacta de este comportamiento, pero una posible explicación es la repulsión de ambos polímeros dentro de la pasta por poseer ambos cargas negativas.

Por último, se observó que mezclas de biopolímeros con carga negativa más biopolímeros eléctricamente neutros, por ejemplo la gelatina tipo B más el extracto de soja, sí favorecen la cohesión, probablemente porque el polímero cargado negativamente no se repele con el polímero neutro.

Las interacciones eléctricas a nivel molecular entre los biopolímeros y el  $\alpha$ -TCP son difíciles de interpretar empleando únicamente los resultados aquí presentados, por lo que se sugiere un estudio más detallado para comprender el mecanismo electrostático de cohesión. Debido a la compleja estructura molecular de los biopolímeros, especialmente la gelatina, tal vez sea necesario emplear simulaciones moleculares informáticas.

Por otro lado, dentro del intervalo de concentraciones estudiado, la gelatina bovina tipo B fue el biopolímero que brindó la mayor cohesión, permitiendo obtener pastas espumadas aptas para relleno óseo hasta con proporciones L/P de 0.75 ml/g. Por el contrario, la gelatina bovina tipo A no incrementó la cohesión.

Puesto a que ambas gelatinas empleadas tienen la misma capacidad para gelificar (Bloom de 250), es probable que la diferencia entre ambas gelatinas esté relacionada con el punto isoeléctrico (PIE) de estas proteínas. Como ya se mencionó, la gelatina tipo B bajo las condiciones de trabajo (pH de la disolución de acelerante mayor a 7) tiene una carga eléctrica neta negativa (PIE entre 4.5 y 5.6). En cambio la gelatina tipo A (con PIE entre 6 y 9.5) tiende a ser eléctricamente neutra en disolución con el acelerante. Lo cual reafirma la hipótesis de que la mayor cohesión se debe en parte a interacciones electrostáticas entre el polímero con carga negativa y el  $\alpha$ -TCP, las cuales desaparecen cuando el biopolímero es eléctricamente neutro, tal es el caso de la gelatina tipo A o el extracto de soja. Bajo esta hipótesis es probable que polímeros con carga neta positiva no brinden cohesión al cemento en base a  $\alpha$ -TCP.

Finalmente, el extracto de soja es un biopolímero altamente hidrófilo pero eléctricamente neutro, que fluidifica a la pasta de cemento y no promueve la cohesión, aún con proporciones L/P tan bajas como 0.40 ml/g. Como solución se propuso la incorporación de gelatina a los cementos compuestos con extracto de soja. Como resultado se pudieron fabricar cementos compuestos soja más gelatina B con cohesión hasta con proporciones L/P de 0.55 ml/g.

En el capítulo 3 se encontró que la mayor proporción L/P con la que las espumas obtenidas únicamente con Tween 80 tienen cohesión es de 0.50 ml/g. Al comparar este dato con la proporción L/P con la que las espumas obtenidas con biopolímeros tienen cohesión se observa que la gelatina tipo B permitió incrementar casi al doble la proporción L/P máxima de fabricación, lo que significa poder incorporar mayor macroporosidad en la estructura. Sin embargo, la adición del alginato de sodio con 0.5 % de Tween 80 y del extracto de soja con 5 % de gelatina, permitió incrementar la máxima proporción L/P de 0.50 a 0.55 ml/g. El incremento podría parecer insignificante, no obstante, es relevante para el compuesto con soja y gelatina, en el que la macroporosidad abierta fue mayor, aunque de menor tamaño, en comparación con la espuma con cohesión mas macroporosa obtenida en el capítulo 3 (0.5%T-0.50).

### 5.4.3 Caracterización de las espumas sólidas compuestas

Como ya se ha podido observar, el método de espumado de la fase líquida empleando como agentes espumantes a polímeros de origen natural resultó ser eficaz para la obtención de cementos macroporosos compuestos. A continuación se describen, polímero a polímero, las características de las espumas sólidas obtenidas, empleando la mayor proporción L/P para maximizar la porosidad introducida por el espumado.

#### 5.4.3.1 Espumas compuestas con gelatina bovina

*Porosidad:* La figura 5.5 resume la porosidad total y la macroporosidad total, medidas por inmersión en mercurio, de los cementos compuestos espumados con gelatina bovina tipo A y B, moldeados con espátula o por inyección dentro de los moldes. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

La porosidad total de los compuestos con gelatina no espumados es del orden de 60 % y no se modificó con el incremento de la cantidad del polímero, ni con el tipo de gelatina empleado.

Para los cementos compuestos con gelatina tipo A el método de espumado no incrementó significativamente la porosidad total. Mientras que con gelatina B, el espumado sí incrementó la porosidad total, siendo significativamente mayor el efecto en el compuesto con 10 % gelatina.

De forma general, la porosidad total de los cementos macroporosos compuestos con gelatina tipo B, fue mayor a la de los cementos compuestos con gelatina tipo A. Finalmente, el proceso de inyección de la pasta no disminuyó la porosidad total de los cementos espumados (a excepción del compuesto con 15 % de gelatina A).

Por otro lado, como muestran los datos en las figuras 5.5 b y d, para calcular la macroporosidad total de los compuestos espumados, se definió como inexistente la macroporosidad de los compuestos no espumados. Las mismas figuras muestran que la macroporosidad total de los cementos espumados con gelatina tipo A se incrementó con el

aumento de la cantidad de gelatina en disolución. Por el contrario, con gelatina tipo B la macroporosidad total disminuyó con el incremento de la concentración. Este último resultado concuerda con la menor espumabilidad de la disolución al 15 % de gelatina B, observada anteriormente (ver figura 5.3).

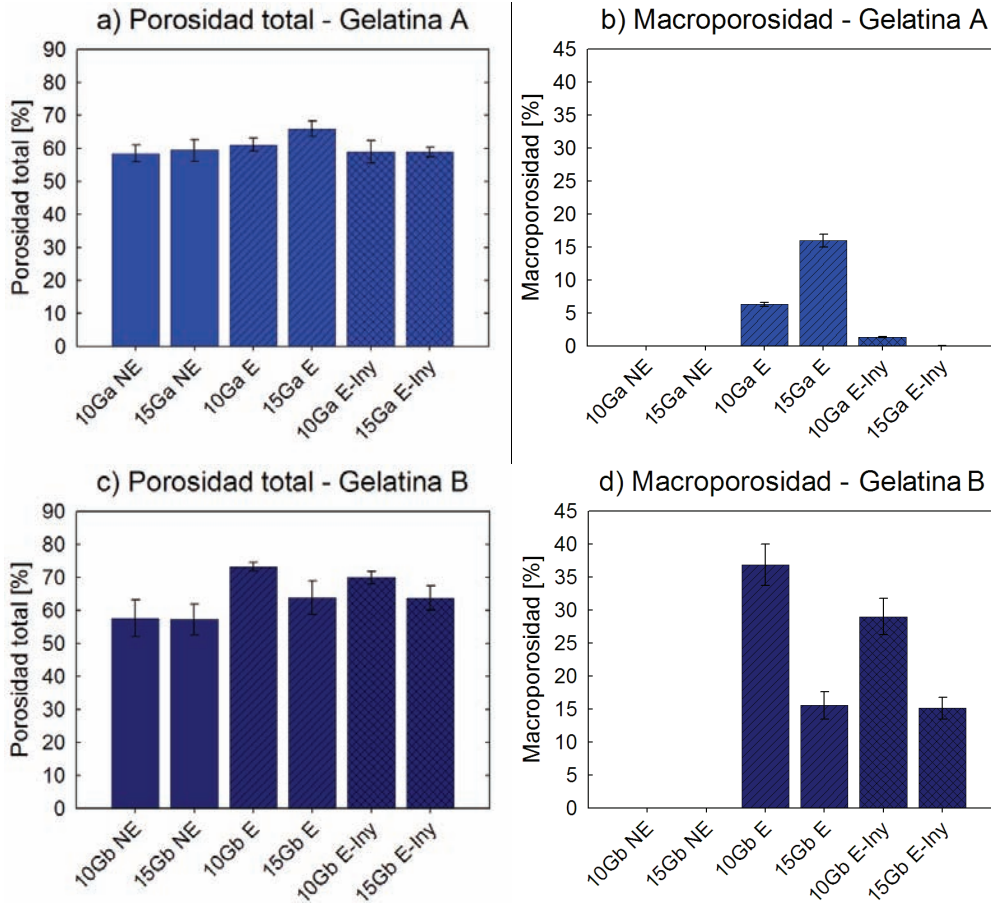


Figura 5.5: a y b) porosidad total y macroporosidad total respectivamente para los compuestos con gelatina bovina tipo A (Ga); c y d) porosidad total y macroporosidad total respectivamente para los compuestos con gelatina bovina tipo B (Gb), ambos preparados con 2.5 % de acelerante y una proporción L/P = 0.80 ml/g, bajo diferentes condiciones de procesado: NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. Valores determinados por inmersión en mercurio. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Por último, los datos e la figura 5.5 revelan que el proceso de inyección disminuyó la macroporosidad del cemento espumado con 10 % de gelatina B, pero no modificó la macroporosidad del cemento compuesto con 15 % de gelatina B, lo que sugiere que la pasta espumada con 15 % de gelatina es más estable. Mientras que para gelatina A, el proceso de inyección eliminó la macroporosidad de todos los compuestos espumados.

**Macroestructura:** La morfología de la macroporosidad introducida en los cementos espumados con 10 y 15 % gelatina tipo B se muestra respectivamente en las figuras 5.6 y 5.7. No se tomaron imágenes de las espumas sólidas obtenidas con gelatina tipo A debido al menor contenido de macroporosidad y la eliminación de la misma por la inyección de la pasta.



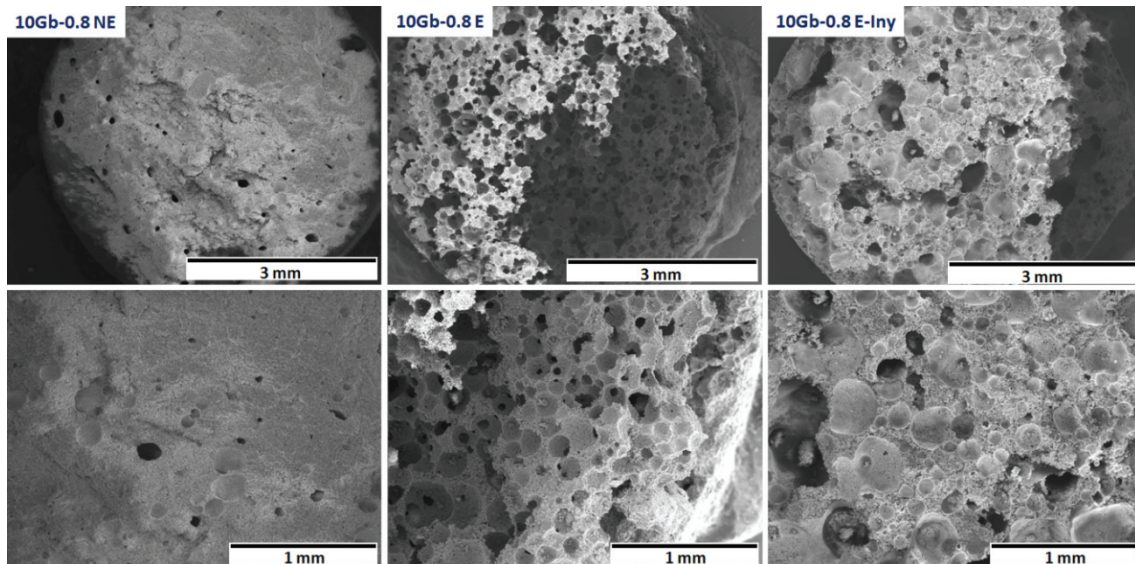


Figura 5.6: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 10 % de gelatina bovina tipo B (Gb), bajo diferentes condiciones de procesamiento (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

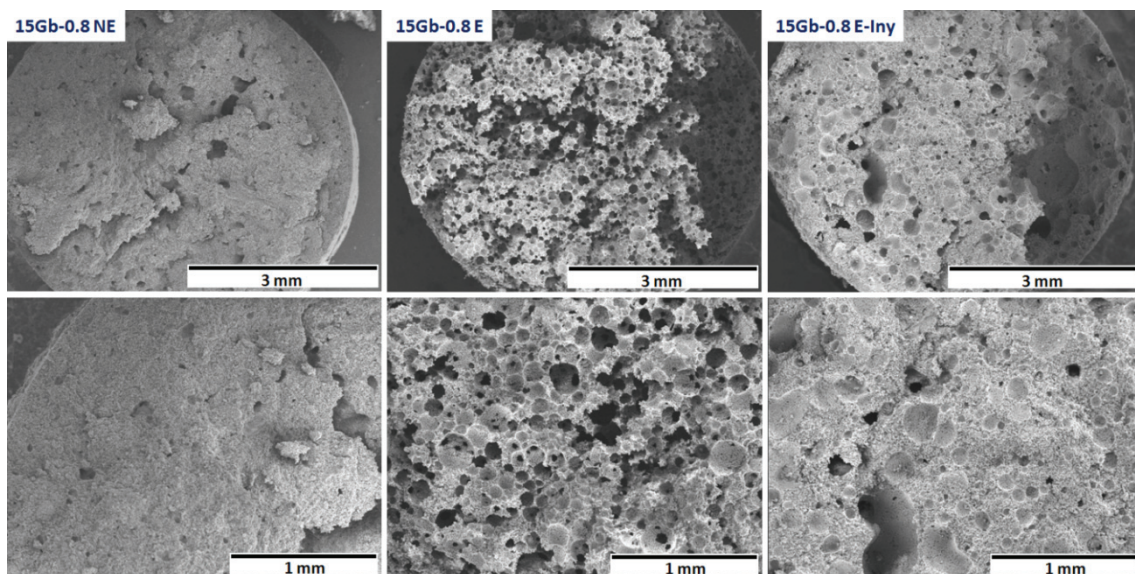


Figura 5.7: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 15 % de gelatina bovina tipo B (Gb), bajo diferentes condiciones de procesamiento (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Tanto para 10 como para 15 % de gelatina B las imágenes de MEB mostraron que los cementos no espumados poseen muy pocos macroporos producidos por el aire atrapado durante el mezclado, lo cual valida la hipótesis tomada para el cálculo de la macroporosidad total.



Las imágenes de los cementos espumados y moldeados con espátula muestran claramente la introducción de macroporos esféricos que reproducen la morfología de la espuma líquida con un cierto grado de conectividad. Por otro lado, comparando las estructuras de las muestras espumadas de la figura 5.6 con las de la 5.7, se observa que el incremento de la concentración de gelatina produce macroporos de menor diámetro.

Además, tanto para 10 como para 15 % de gelatina se observó que el moldeado por inyección redujo la conectividad entre macroporos y deformó ligeramente la morfología esférica de los mismos.

En resumen, los cementos compuestos con gelatina tipo B producen estructuras con mayor macroporosidad que los cementos compuestos con gelatina A. Con 10 % de gelatina B es posible obtener cementos con mayor volumen de macroporos y de mayor tamaño. Finalmente, el proceso de inyección deforma la estructura de la espuma sólida y parece reducir la conectividad entre los macroporos.

#### 5.4.3.2 Espumas compuestas con alginato de sodio sin sulfatar

**Porosidad:** La figura 5.8 resume la porosidad total y la macroporosidad total, medidas por inmersión en mercurio, de los cementos compuestos espumados con alginato de sodio sin sulfatar con y sin Tween 80, moldeados con espátula o por inyección dentro de los moldes. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

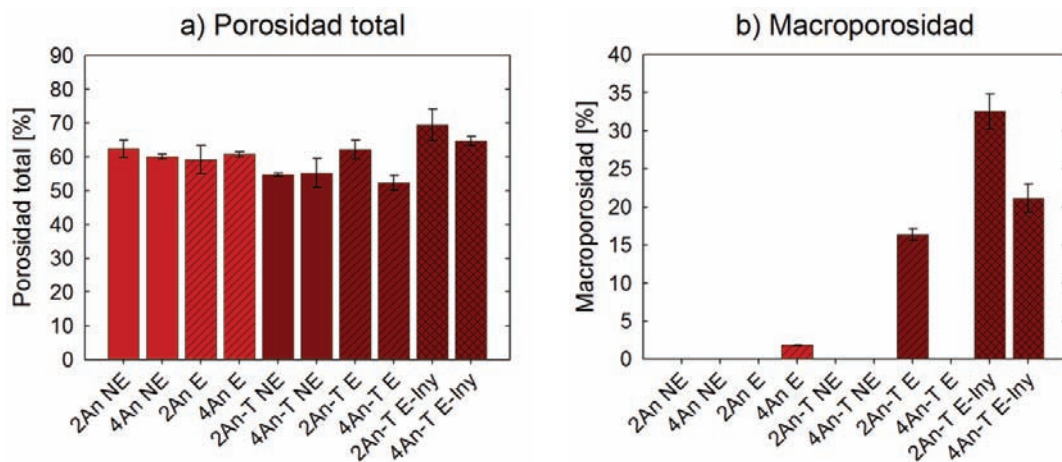


Figura 5.8: a) porosidad total y b) macroporosidad total para los compuestos con alginato de sodio (An) y alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80 (An-T), ambos preparados con una proporción L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante, bajo diferentes condiciones de procesado: NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. Valores determinados por inmersión en mercurio. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Los compuestos con alginato de sodio sin Tween 80, no espumados, tienen una porosidad total cercana al 60 %, similar a la obtenida para los homólogos con gelatina puesto que se prepararon con la misma proporción L/P.

En el compuesto espumado con 2 % de alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80, la porosidad total presentó un claro incremento con respecto a al cemento no espumado, mientras que con 4 % de alginato de sodio más Tween 80 no hubo diferencia. Este resultado concuerda con la menor espumabilidad de la disolución de 4 % de alginato comparada con la espumabilidad de la disolución de 2 % de alginato, ambas con Tween 80 (ver figura 5.3).

Es importante mencionar que se encontró que el moldeo por inyección incrementó la porosidad total de los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar.

En cuanto a la macroporosidad, al igual que para los compuestos con gelatina, ésta se consideró inexistente para los compuestos con alginato de sodio no espumados (ver figura 5.8b). El cálculo del porcentaje de macroporosidad para los cementos espumados mostró que el método de espumado no genera macroporosidad si no se incorpora Tween 80 a la disolución de alginato de sodio sin sulfatar.

En la figura 5.8b se observa que la incorporación del Tween 80 en la disolución de alginato de sodio incrementó considerablemente el porcentaje de macroporosidad del compuesto espumado con 2 % de alginato, mientras que para el compuesto con 4 % de alginato más Tween 80, el incremento no se produjo. Resultado que reafirma que las disoluciones sin espumabilidad no generan macroporos en los cementos.

Finalmente, se observó que el proceso de inyección incrementó la cantidad de macroporosidad introducida en los compuestos con alginato, tanto para 2 y 4 %, siendo más poroso el compuesto con menor contenido de biopolímero.

**Macroestructura:** La nula macroporosidad de los cementos espumados con alginato de sodio sin Tween 80 se verificó mediante las imágenes de MEB (figura 5.9), donde no se observaron diferencias significativas entre los cementos no espumados y espumados; resultado que concuerda con la baja espumabilidad de estas disoluciones.

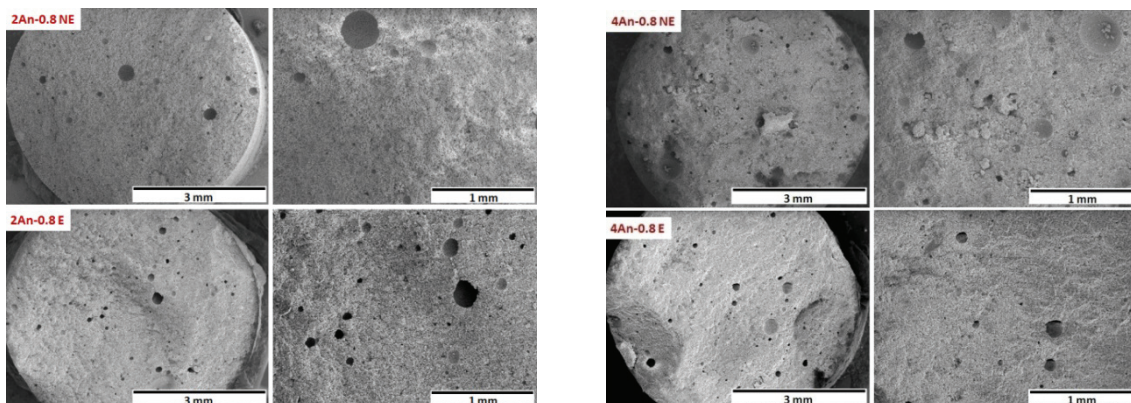


Figura 5.9: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (en cada cuadro a la izquierda y a la derecha), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 2 y 4 % de alginato de sodio sin sulfatar (An) (cuadro izquierdo y cuadro derecho respectivamente), ambos sin Tween 80, bajo diferentes condiciones de procesado: arriba no espumados (NE) y abajo espumados (E). L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

En cuanto a la macroestructura de los compuestos con 2 y 4 % de alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80 éstas se presentan respectivamente en las figuras 5.10 y 5.11.

Para el cemento compuesto con 2 % de alginato de sodio más Tween 80 sin espumar (Fig. 5.10) se observan algunos macroporos aislados, que probablemente provienen de burbujas de aire atrapadas en la pasta durante el mezclado y el moldeo del cemento. La presencia de estos macroporos en las muestras no espumadas puede generar una ligera subestimación del contenido de macroporosidad total calculado para las muestras espumadas.

En las imágenes correspondientes a la condición de espumado se distingue la presencia de los macroporos introducidos por el espumado, los cuales son esféricos, de tamaño uniforme y presentan algunas macro conexiones entre sí. En las mismas imágenes no es posible diferenciar entre los macroporos inducidos por el espumado y los macroporos originados por burbujas atrapadas durante el moldeo.

Finalmente, las muestras espumadas con 2 % de alginato mantuvieron la porosidad introducida después de la inyección. Sin embargo, se observó la presencia de macroporos de diámetro diferente que probablemente se originaron durante la preparación de la jeringa y el moldeo (aire atrapado), y que son la razón del incremento de macroporosidad observado después de la inyección (ver figura 5.8).

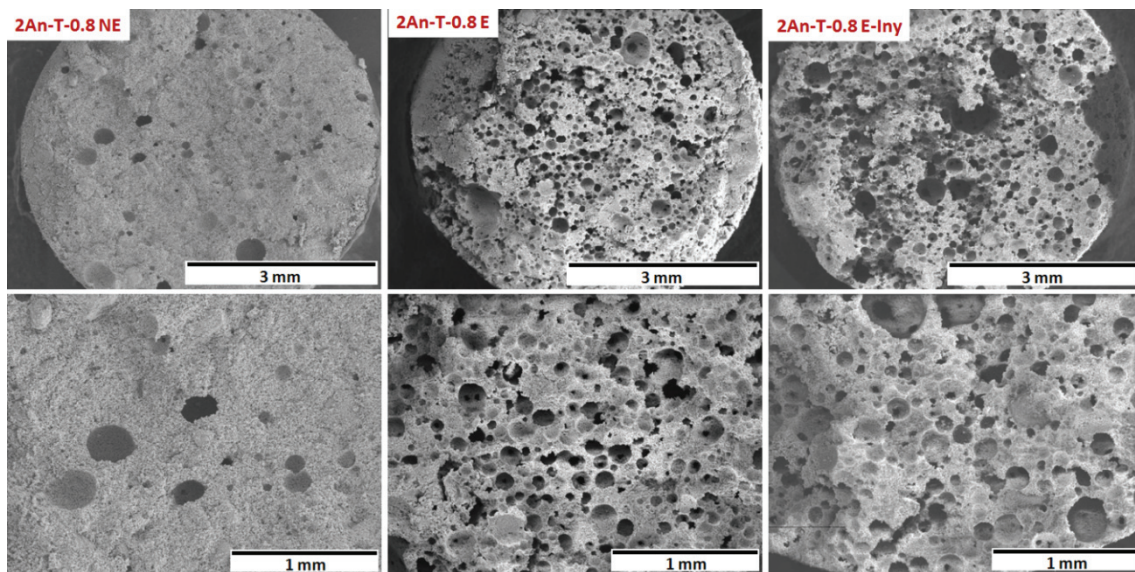


Figura 5.10: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 2 % de alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80 (2An-T), bajo diferentes condiciones de procesado (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

Por otro lado, el cemento compuesto con 4 % de alginato de sodio más Tween 80, presentó gran cantidad de macroporos incluso cuando no se sometió a espumado (ver figura 5.11); los macroporos observados fueron esféricos y aislados y probablemente provienen de burbujas atrapadas durante la preparación de la disolución de alginato, la mezcla con el polvo de cemento y/o el moldeo de la pasta.



La misma cantidad y morfología de macroporos se observó en la muestra espumada. La nula espumabilidad de la disolución al 4 % de alginato más Tween 80 en conjunto con la extrema estabilidad de las burbujas atrapadas en ella, sugieren que los macroporos observados se originaron por burbujas de aire atrapadas desde la preparación de la disolución o la mezcla con el polvo del cemento, y que no se forman por el proceso de espumado. Teniendo en cuenta la hipótesis de partida para el cálculo de la macroporosidad total (ver capítulo 3 sección 3.3.5.5), la similitud entre las muestras no espumadas y espumadas explica también que en la figura 5.8b no se observaran diferencias en el porcentaje de macroporosidad entre ambas condiciones.

Finalmente, en la muestra espumada e inyectada se observó un ligero incremento en el número de macroporos, lo cual concuerda con el incremento en la macroporosidad visto en la figura 5.8b.

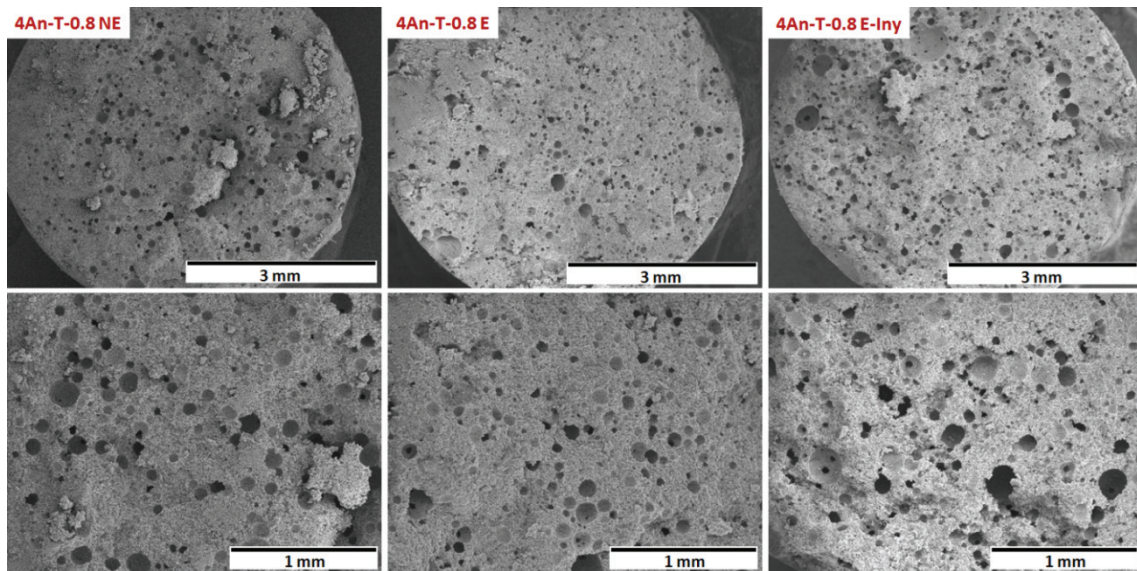


Figura 5.11: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 4 % de alginato de sodio más 0.5 % de Tween 80 (4An-T), bajo diferentes condiciones de procesado (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

En resumen, los compuestos con alginato de sodio espumados sin Tween 80 no incorporan macroporosidad, mientras que con 0.5 % de Tween 80 la macroporosidad introducida es mayor para la formulación que contiene un 2 % de alginato de sodio.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el espumado de los cementos compuestos con alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular sólo se realizó incorporando Tween 80 en la fase líquida.

### 5.4.3.3 Espumas compuestas con alginato de sodio sulfatado

**Porosidad:** Los resultados de porosidad total y macroporosidad total, determinados por inmersión en mercurio, para los cementos espumados con alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular con 0.5 % de Tween 80, moldeados con espátula o por inyección dentro de los moldes se presentan en la figura 5.12. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

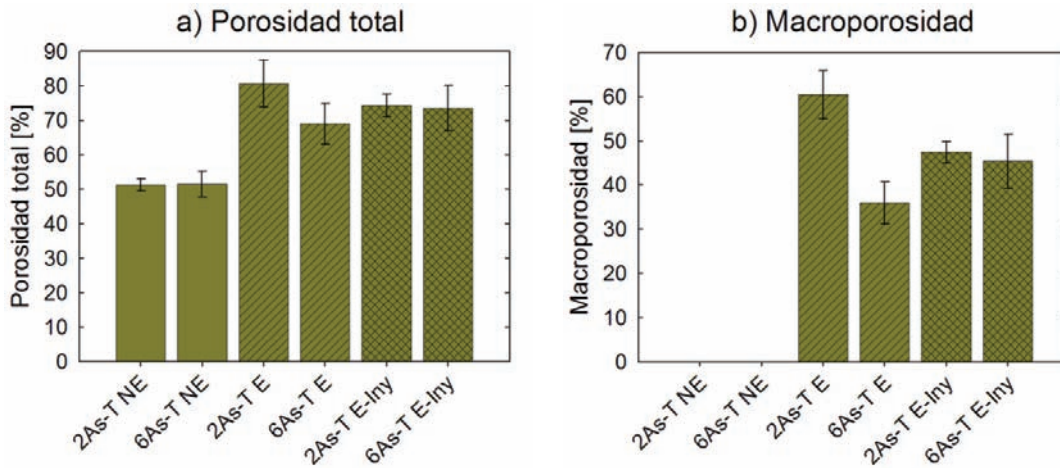


Figura 5.12: a) porosidad total y b) macroporosidad total para los compuestos con alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular más 0.5 % de Tween 80 (As-T), preparados con una proporción L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante, bajo diferentes condiciones de procesado: NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. Valores determinados por inmersión en mercurio. Cementos fraguados durante 7 días envueltas en papel de aluminio.

La porosidad total obtenida para los cementos no espumados fue ligeramente mayor a 50 % y no se observaron diferencias en función del contenido de alginato sulfatado. La porosidad total para estos compuestos es menor a la porosidad de los compuestos con alginato de sodio sin sulfatar y gelatina preparados con la misma proporción L/P, lo que sugiere una mayor compactación del material a nivel microestructural, producida probablemente por la precipitación de cristales de menor tamaño tal como se describió en el capítulo 4 de esta memoria.

Por su parte, la porosidad total de los compuestos con alginato sulfatado más Tween 80 se incrementó considerablemente con el proceso de espumado. El aumento observado fue mayor con 2 % de alginato sulfatado que con 6 %, aunque las diferencias entre ambos no fueron significativas. De igual forma, el moldeado por inyección no modificó significativamente la cantidad de porosidad total de las muestras espumadas.

En cuanto a la macroporosidad de los cementos no espumados, ésta se volvió a considerar como nula por definición para calcular el porcentaje de macroporosidad total de los compuestos espumados. Por otro lado, para las muestras espumadas, la macroporosidad total si mostró diferencias significativas entre 2 y 6 % de alginato de sodio sulfatado más Tween 80, siendo considerablemente mayor la macroporosidad obtenida para 2 %.

Es importante remarcar que la macroporosidad total obtenida en el compuesto con 2 % de alginato sulfatado más Tween 80, fue mayor que las más altas macroporosidades obtenidas para los compuestos con gelatina y alginato de sodio sin sulfatar, lo cual es reflejo de que la disolución al 2 % de alginato sulfatado más Tween 80 es la que combina la mejor espumabilidad con una adecuada estabilidad de la espuma (ver figura 5.3).

Finalmente, el moldeo por inyección del compuesto con 2 % de alginato sulfatado redujo la cantidad de macroporosidad total introducida, mientras que para 6 % no produjo diferencias significativas. A pesar de la disminución en el porcentaje de macroporosidad total con la inyección, los compuestos espumados con alginato sulfatado más Tween 80 fueron más macroporosos que los compuestos con gelatina o alginato de sodio sin sulfatar.

**Macroestructura:** En lo que se refiere a las imágenes de la macroestructura de los cementos compuestos con 2 y 6 % de alginato sulfatado más Tween 80, espumados y no espumados, éstas se presentan respectivamente en las figuras 5.13 y 5.14.

Los cementos con 2 y 6 % de alginato sulfatado no presentaron macroporos en la estructura cuando no fueron espumados, lo que valida la hipótesis para el cálculo de la macroporosidad total en los cementos espumados. En cambio, con el espumado la incorporación de macroporos esféricos e interconectados es claramente notable. El diámetro de los macroporos en el compuesto con un 2 % de alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular fue mayor que el diámetro de los macroporos obtenidos con 6 %. Sin embargo, parece haber mayor número de interconexiones en el cemento con 6 % de alginato sulfatado.

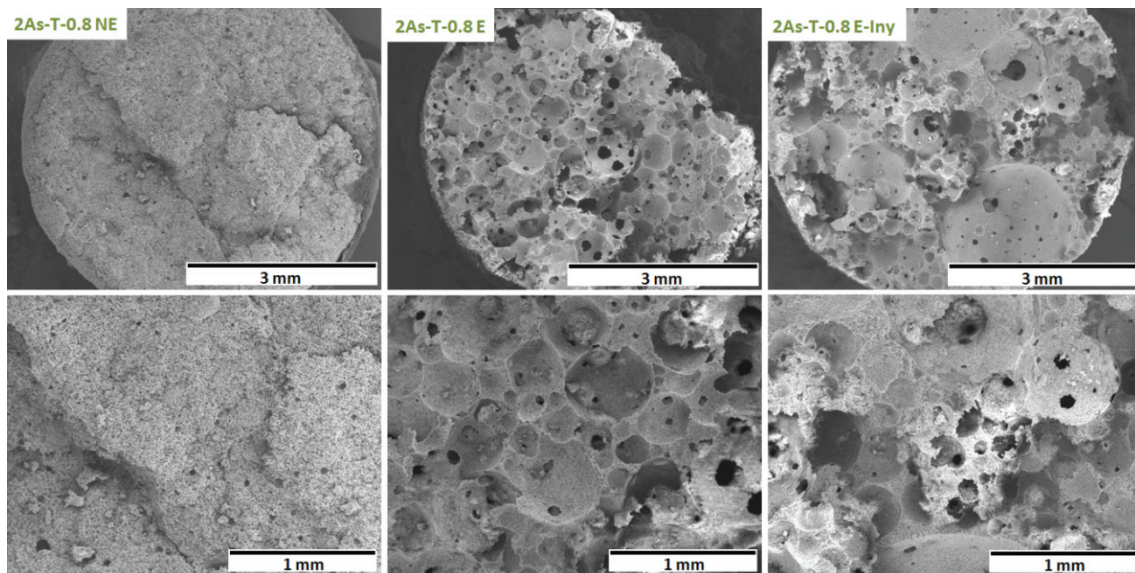


Figura 5.13: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 2 % de alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular más 0.5 % de Tween 80 (2As-T), bajo diferentes condiciones de procesamiento (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeo por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.



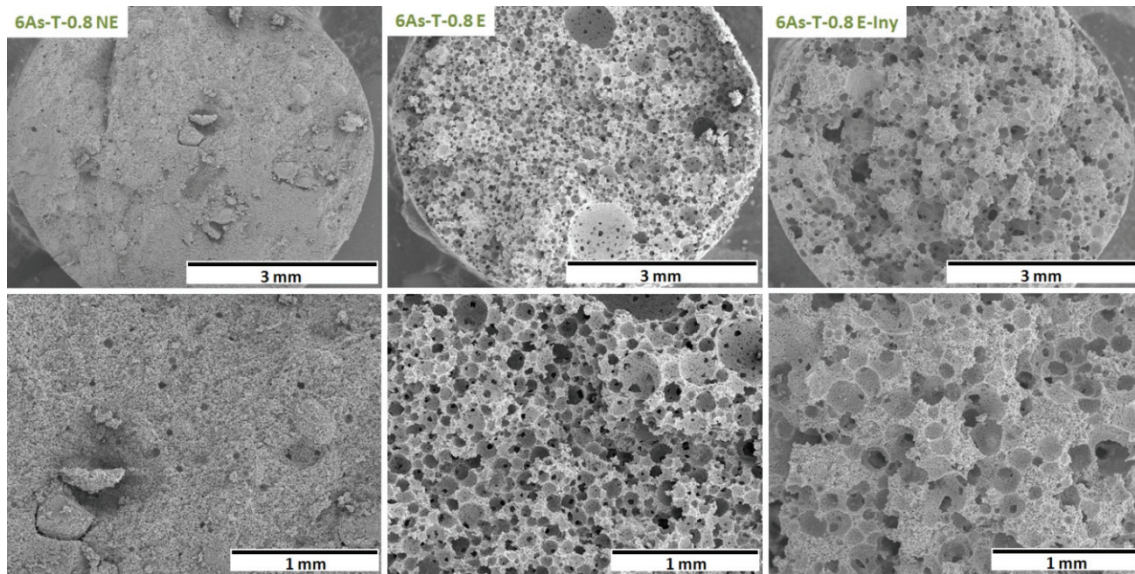


Figura 5.14: Imágenes de MEB, a dos diferentes magnificaciones (arriba y abajo), correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos con 6 % de alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular más 0.5 % de Tween 80 (6As-T), bajo diferentes condiciones de procesamiento (de izquierda a derecha): NE: no espumado, E: espumado y E-Iny: espumado y moldeado por inyección. L/P = 0.80 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

En la figura 5.14 a baja magnificación, para la estructura correspondiente al cemento espumado, se observa dos macroporos con un diámetro considerablemente mayor al resto. Estos dos macroporos no provienen del proceso de espumado sino que son burbujas de aire atrapadas en la pasta de cemento durante el moldeado de la muestra.

Para el cemento compuesto con 2 % de alginato sulfatado, la inyección modificó la morfología de los macroporos, incorporando poros de mayor diámetro, producto también del aire atrapado en la jeringa con la que se inyectó el material (figura 5.13, muestra 2As-T-0.80 E-Iny).

Finalmente, en el cemento inyectado con 6 % de alginato de sodio sulfatado no se encontraron macroporos originados por el moldeo, pero si se observó la deformación de la macroporosidad y una ligera disminución de la conectividad.

En resumen, los cementos compuestos con alginato sulfatado de bajo peso molecular con 0.5 % de Tween 80 son los que incorporaron mayor macroporosidad, comparados con los cementos compuestos con alginato de sodio sin sulfatar o gelatina, cuando fueron preparados bajo la misma proporción L/P. Este resultado concuerda con el mejor balance entre espumabilidad y estabilidad de las espumas formadas con las disoluciones de alginato sulfatado de bajo peso molecular más Tween 80.

#### 5.4.3.4 Espumas compuestas con extracto de soja

**Porosidad:** Los resultados de porosidad total y macroporosidad total, determinados por inmersión en mercurio, para los cementos compuestos con soja, con y sin la incorporación de 0.5 % de Tween 80, preparados con una proporción L/P de 0.40 ml/g y 2.5 % de acelerante, moldeados con espátula se presentan en la figura 5.15. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

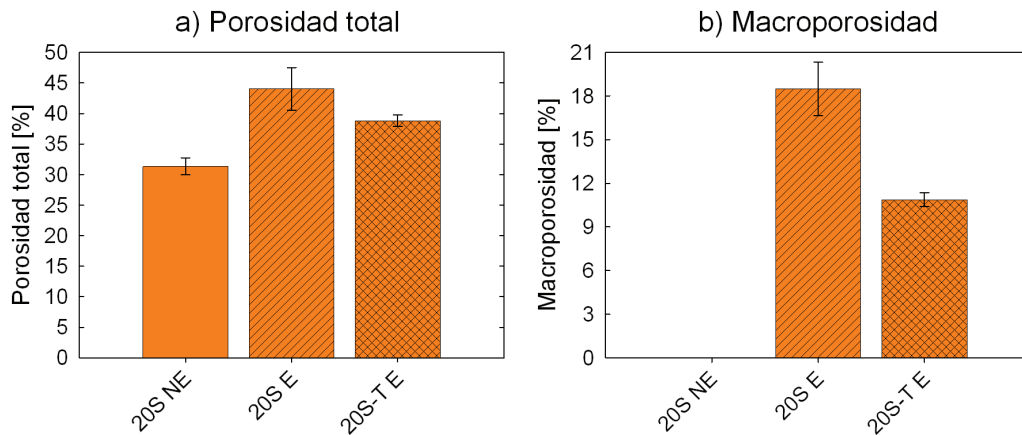


Figura 5.15: a) porosidad total y b) macroporosidad total para los compuestos con extracto de soja (S) y extracto de soja con 0.5 % de Tween 80 (S-T), ambos preparados con una proporción L/P = 0.40 ml/g y 2.5 % de acelerante, bajo diferentes condiciones de procesado: NE: no espumado y E: espumado. Valores determinados por inmersión en mercurio. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.

La porosidad total del cemento compuesto con un 20 % de extracto de soja no espumado fue aproximadamente del 30 %, valor menor comparado con la porosidad del resto de los compuestos estudiados, debido a la menor proporción L/P de mezclado. Aún con la baja proporción L/P empleada, el espumado resultó ser eficaz para incrementar la porosidad total de los cementos compuestos con soja.

No obstante, y a diferencia de los compuestos con alginato, la incorporación del Tween 80 en los compuestos con soja redujo la cantidad de porosidad introducida.

Por otro lado, la macroporosidad de los cementos compuestos no espumados se consideró nuevamente nula para calcular la macroporosidad total introducida durante el proceso de espumado. Los valores obtenidos confirmaron que la incorporación de Tween 80 en los compuestos con soja reduce notablemente la macroporosidad introducida, por lo que no se recomienda el empleo de Tween 80 en conjunto con el extracto de soja para obtener cementos macroporosos.

**Macroestructura:** Las imágenes de MEB mostradas en la figura 5.16 permitieron corroborar los resultados de los cálculos de porosidad.

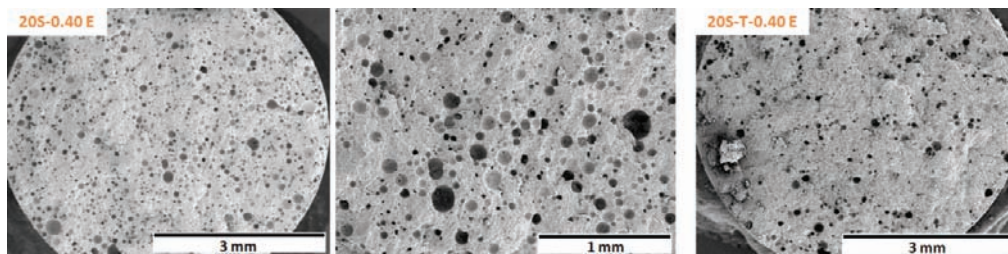


Figura 5.16: Imágenes de MEB, correspondientes a la superficie de fractura de cementos compuestos espumados con 20 % de extracto de soja (20S) (cuadro de la izquierda a dos diferentes magnificaciones) y 20 % de extracto de soja más 0.5 % de Tween 80 (20S-T) (rectángulo de la derecha). L/P = 0.40 ml/g y 2.5 % de acelerante. Cementos fraguados durante 7 días envueltos en papel de aluminio.



En las imágenes se observa que el método de espumado es eficaz, obteniéndose poros esféricos relativamente homogéneos en tamaño y con cierto grado de conectividad. Se observa también que sin Tween 80 los compuestos con extracto de soja contienen mayor número de macroporos (ver Fig. 5.16 cuadro izquierdo).

En cuanto a la conservación de la porosidad después de la inyección, ésta se mantuvo inalterada, debió al efecto licuante de la soja sobre la pasta cementante.

En resumen, los cementos compuestos con soja son fácilmente espumables y no requieren de Tween 80 para ser espumados.

**5.4.3.5 Relación entre espumabilidad, estabilidad y macroporosidad**

Se puede decir que existe una relación de la espumabilidad y la estabilidad de las espumas líquidas con la macroporosidad introducida en los cementos, de tal forma que los cementos más macroporosos se obtienen con disoluciones de elevada espumabilidad y alta estabilidad.

Prueba de dicha relación es que la priorización de espumantes sugerida al final de la sección 5.4.1 resultó ser válida. Tal como se muestra en la tabla 5.17 sólo se cometió un error en diez propuestas, debido a que la disolución con 10 % de gelatina B resultó ser más eficiente en la incorporación de macroporosidad que la disolución con 2 % de alginato de sodio con un 0.5 % de Tween 80.

*Tabla 5.17: Comparación entre la eficiencia de las disoluciones biopoliméricas propuesta para introducir macroporosidad en los cementos (en función de los resultados de espumabilidad y estabilidad reportados en la sección 5.4.1) y los resultados experimentales de porcentaje de macroporosidad introducida obtenidos en la sección 5.4.3.*

Eficacia propuesta	Nomenclatura de la disolución biopolimérica									
	Mayor									Menor
	2As-T	6As-T	2An-T	10Gb	15Gb	2An	2As	6As	4AnT	4An
% de macroporosidad obtenida en el sólido	60	45	16	37	15	0	0	0	0	0

Al mismo tiempo, la espumabilidad es un factor de mayor peso que la estabilidad, ya que a pesar de la elevada estabilidad de algunas burbujas formadas en las disoluciones con la menor espumabilidad, éstas no generaron cementos macroporosos. Tal es el caso de las formulaciones con cero por ciento de macroporosidad mostradas en la tabla 5.17.

En base a estos resultados se propone que una buena espuma líquida se puede conseguir balanceando la espumabilidad y la estabilidad de la disolución, a través de regular la viscosidad por medio de la concentración, peso molecular y el tipo de biopolímero empleado. Se entiende por buena espuma líquida aquella que incorpora gran cantidad de aire en forma de burbujas con suficiente estabilidad para resistir el mezclado con la fase sólida del cemento sin que se rompan las burbujas. Por lo que no necesariamente el balance de ambas propiedades debe ser equilibrado, y se recomienda que se favorezca la espumabilidad.

En base a lo anterior se asevera que la determinación de la espumabilidad de la fase líquida y de la estabilidad de la espuma obtenida es una herramienta para la postulación de formulaciones de cementos macroporosos.

#### **5.4.3.6 Modificación de la macroporosidad por el proceso de moldeo**

En función de la estabilidad de la espuma, los esfuerzos generados durante la mezcla de la espuma líquida y el polvo de cemento pueden llegar a romper o simplemente incrementar el tamaño de las burbujas, debido a la coalescencia de las mismas. Adicionalmente, una cuestión es cómo se modifica la morfología de la porosidad debido al proceso de moldeo, ya sea mediante espátula o por inyección.

Se observó que los esfuerzos producidos durante la inyección deforman los poros esféricos y disminuyen la conectividad entre ellos (ver figuras 5.6 y 5.7). Este efecto se minimiza si la pasta se inyecta inmediatamente después de la preparación, debido a que en ese punto la fluidez de la pasta es máxima. Sin embargo, mientras transcurre el tiempo, la pasta fragua y en algunos casos los biopolímeros gelifican reduciendo la inyectabilidad. Por otro lado, cuando la pasta aún no gelifica, los biopolímeros la hacen más fluida (ver capítulo 4 sección 4.4.6), motivo adicional para inyectar el cemento lo más rápidamente posible.

Otro fenómeno observado fue la incorporación de macroporos ajenos al proceso de espumado (ver figura 5.13). Es relevante decir que las pastas obtenidas con fases líquidas con alta estabilidad fueron las más propensas a este fenómeno. Dichos macroporos se asocian a la metodología de moldeo y la carga de la jeringa con la pasta de cemento.

Durante el moldeo con espátula, al colocar las diferentes capas de pasta sobre la cavidad del molde, éstas pueden atrapar burbujas de aire. Para evitarlo se debe introducir la pasta en un costado de la cavidad, de tal forma que la pasta fluya sobre la pared hasta el fondo del molde y deje espacio para la salida del aire por el otro costado.

Algo similar sucede cuando se llena la jeringa para inyectar el material. Para evitar atrapar aire durante la preparación de la jeringa esta debe colocarse en posición horizontal y la pasta debe introducirse con espátula únicamente por el costado de la pared inferior, de tal forma que quede libre un canal entre la pasta y la pared superior de la jeringa. Este canal permitirá el paso del aire cuando se coloque el embolo y la conducirá hasta la apertura antes de que la pasta la cierre evitando el atrapado de aire. Finalmente, para evitar un mal llenado de la cavidad del molde, la inyección debe realizarse bajo un procedimiento especial. Para ello, la punta de la jeringa debe colocarse en el fondo de la cavidad para iniciar la inyección. Posteriormente, conforme la pasta cubre el fondo de la cavidad, la jeringa debe desplazarse lentamente hacia la superficie hasta llenar por completo el molde.

Estas técnicas reducen la incorporación de poros ajenos al espumado, pero no garantizan su completa eliminación.

### **5.4.4 Selección de formulaciones**

#### **5.4.4.1 Formulaciones de espumas autofraguables *in situ***

La tabla 5.18 lista las formulaciones de cemento que combinaron buena cohesión con macroporosidad, así como el valor de la porosidad total medida por inmersión en mercurio.

Estas espumas pueden ser aptas para el relleno de defectos óseos mediante inyección, es decir son inyectables y autofraguables *in situ*.

*Tabla 5.18: Resumen de las formulaciones de espumas que combinan cohesión de la pasta inyectada con macroporos en la estructura fraguada, y valores de porosidad total obtenidos mediante inmersión en mercurio.*

Biopolímero principal	Contenido [%]	Biopolímero secundario	Proporción L/P [ml/g]	Porosidad total [%]	Seleccionada
<b>Gelatina B</b>	10	–	0.65	58.30 ± 4.14	
	10	–	0.75	61.39 ± 3.40	
	15	–	0.65	57.14 ± 5.52	
	15	–	0.75	65.25 ± 3.91	SI
<b>Alginato de sodio</b>	2	0.5 % Tween 80	0.55	60.95 ± 1.36	
<b>Alginato de sodio sulfatado</b>	1**	0.5 % Tween 80	0.55	59.27 ± 1.39	
	1**	0.5 % Tween 80	0.60	61.82 ± 2.08	
	2**	0.5 % Tween 80	0.55	57.82 ± 2.34	SI
	2**	0.5 % Tween 80	0.60	64.00 ± 1.58	
<b>Extracto de soja</b>	20 wt	5 % gel B	0.55	66.79 ± 1.50	SI
	20 wt	10 % gel B	0.55	51.87 ± 1.38	

\*\* indica alginato de alto peso molecular. Se marca con “SI” a las formulaciones con las que se continuara el estudio.

Desafortunadamente varias de las formulaciones con mayor macroporosidad obtenidas con L/P = 0.80 ml/g no presentaron cohesión, principalmente aquellas basadas en alginato de sodio sin sulfatar. Sin embargo, el empleo de alginato sulfatado de alto peso molecular permitió obtener formulaciones con cohesión hasta con L/P de 0.60 ml/g. En cuanto a los compuestos con gelatina tipo B, la proporción L/P máxima se redujo a 0.75 ml/g para asegurar la cohesión de las espumas compuestas.

Como se planteó en un inicio, para continuar el estudio fue seleccionada una sola formulación de espuma por cada biopolímero principal en su composición. La misma tabla 5.18 indica qué formulaciones fueron escogidas.

La formulación de espuma compuesta con gelatina se seleccionó en base a la mayor porosidad y mayor contenido de biopolímero introducido.

La selección del compuesto con extracto de soja se basó en el máximo de porosidad alcanzado y la incorporación de un 5 % de gelatina tipo B fue necesaria para brindar cohesión a la pasta de la espuma compuesta. Aún así, como se puede ver comparando los valores de la tabla 5.18 con los de la figura 5.15, la porosidad total obtenida espumando la disolución soja/gelatina superó la del compuesto espumado únicamente con extracto de soja.

Por último, debido a que no hubo diferencias significativas en porosidad entre los compuestos con alginato de sodio y alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular, y a que se espera que los grupos sulfato favorezcan la angiogénesis, se decidió seleccionar un compuesto en

base a alginato sulfatado de alto peso molecular. Sin embargo, la formulación seleccionada no concuerda con la formulación de mayor porosidad, debido a la decisión conservadora de asegurar la máxima cohesión de la pasta espumada.

#### 5.4.4.2 Formulaciones de espumas prefraguadas

No menos importante fue la selección de formulaciones prefraguadas, es decir, cementos altamente macroporosos e interconectados, que a pesar de no tener cohesión puedan ser fraguados bajo condiciones especiales en el laboratorio, para su futura aplicación como bloques porosos para relleno óseo o sustratos para cultivo celular en tres dimensiones.

En este caso se seleccionaron los compuestos que permitieron obtener una mayor macroporosidad, sin ser necesario el requisito de que la pasta tuviera cohesión. Las formulaciones seleccionadas y el valor de porosidad total medido por inmersión en mercurio se presentan en la tabla 5.19.

*Tabla 5.19: Resumen de las formulaciones de cementos compuestos que, a pesar de no tener cohesión, presentaron los mayores contenidos de macroporosidad, y valor de la porosidad total medido por inmersión en mercurio.*

Biopolímero principal	Contenido [%]	Biopolímero secundario	Proporción L/P [ml/g]	Porosidad total [%]	Seleccionada
Gelatina B	10	–	0.80	73.20 ± 1.28	SI
	15	–	0.80	63.88 ± 5.06	
Alginato sulfatado	2*	0.5 % Tween 80	0.80	80.73 ± 6.79	
	2**	0.5 % Tween 80	0.80	66.86 ± 2.76	SI
Extracto de soja	20 wt	–	0.40	49.63 ± 4.28	
	20 wt	5 % gel B	0.60	68.62 ± 2.46	SI

\*bajo peso molecular; \*\*alto peso molecular. Se marca con “SI” a las formulaciones con las que se continuara el estudio.

Nuevamente se escogió una única formulación por cada biopolímero principal para la futura caracterización. Las formulaciones seleccionadas se indican en la tabla 5.19. Un factor externo que afectó la selección de composiciones prefraguadas fue la disponibilidad del alginato de sodio sulfatado de bajo peso molecular. Este biopolímero generó los sustratos sin cohesión con la mayor macroporosidad, no obstante, para mejorar la cohesión se propuso el empleo de alginato sulfatado de alto peso molecular, por lo que el proveedor de este componente dirigió sus esfuerzos a incrementar el peso molecular, abandonando la producción del alginato sulfatado de bajo peso molecular. Como resultado la formulación más macroporosa se descartó. Pese a ello, los cementos macroporosos con alginato sulfatado de alto peso molecular (con la adición imprescindible de 0.5 % de Tween 80), preparados bajo una proporción L/P de 0.80 ml/g, incorporaron gran cantidad de macroporosidad.

Por otro lado, el compuesto espumado con 20 % w/w de soja más 5 % w/v de gelatina B, con L/P = 0.60 ml/g, fue más poroso que el compuesto espumado únicamente con 20 % w/w de soja y L/P = 0.40 ml/g, por lo que el compuesto soja/gelatina B fue seleccionado como formulación prefraguada.

### 5.4.5 Porosidad abierta en las espumas seleccionadas

En la sección anterior se seleccionaron tres formulaciones autofraguables y tres formulaciones prefraguadas. A continuación se presentan los resultados de la caracterización de la porosidad abierta determinada mediante MIP correspondientes a estas formulaciones.

#### 5.4.5.1 Porosidad abierta de las espumas autofraguables *in situ*

La tabla 5.20 lista la densidad esquelética determinada por picnometría de helio y la densidad aparente, la porosidad total, la macroporosidad y la nano/microporosidad abiertas determinadas por MIP, para las formulaciones de espumas compuestas autofraguables *in situ* y el cemento inorgánico no espumado usado como control, preparado con 2.5 % w/v de acelerante de la reacción de fraguado bajo una proporción L/P de 0.35 ml/g (RefA.0.35).

Tabla 5.20: Propiedades texturales de las formulaciones autofraguables de espumas de HA. La densidad esquelética fue determinada por picnometría de helio, los demás parámetros mediante MIP.

Nomenclatura	Densidad aparente [g/ml]	Densidad esquelética [g/ml]	Porosidad Total [%]	Macro porosidad (5 – 360 µm) [%]	Nano/micro porosidad (6 nm – 5 µm) [%]
RefA – 0.35	1.69	2.74	35.12	2.46	32.66
15Gb – 0.75	1.02	2.55	59.13	9.62	49.51
2As** – 0.5T– 0.55	1.22	2.66	49.60	3.63	45.97
20S – 5Gb – 0.55	0.88	2.52	62.37	31.96	30.41

Gb: gelatina bovina tipo B; As\*\*: alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular; T: Tween 80; S: extracto de soja.

La densidad esquelética de los cementos compuestos es menor a la densidad del cemento inorgánico de referencia debido a la incorporación de los biopolímeros en el material, los cuales tienen una densidad menor en comparación con la HA deficiente en calcio (CDHA), producto de la reacción de fraguado del cemento.

La espuma con mayor porosidad abierta total fue 20S-5Gb-0.55, seguida por la espuma 15Gb-0.75 y por último la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55. El mismo orden se siguió para la macroporosidad abierta con uniones mayores a 5 µm. Se observa también que con diferencia la espuma con mayor macroporosidad abierta es 20S-5Gb-0.55. En contraste, la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 tiene tan poca macroporosidad abierta como la referencia inorgánica sin espumar (RefA-0.35).

El hecho de que la macroporosidad abierta determinada por MIP sea tan baja, no significa que las espumas no sean macroporosas. Sino que los macroporos están unidos por aperturas menores al límite establecido como macroporosidad para esta técnica de análisis (5 µm).

En cuanto a la nano/microporosidad abierta, la espuma 20S-5Gb-0.55 junto con la referencia son los que menos cantidad poseen, en el primer caso porque la mayoría de la porosidad está conectada mediante ventanas de mayor tamaño y en el segundo caso porque la proporción L/P de preparación es relativamente baja. En cambio, en las espumas 15Gb-0.75 o 2As\*\*-0.5T-0.55, la porosidad está mayoritariamente conectada mediante canales de tamaño del orden nano/micrométrico.

La diferencia entre los valores de porosidad total mostrados en la tabla 5.18 y la tabla 5.20 se debe a la técnica de caracterización. En la tabla 5.18 la porosidad se determinó mediante inmersión en mercurio, es decir que el resultado contempla tanto la porosidad cerrada como la abierta y además cubre todo el intervalo de tamaños de poro. En cambio, en la tabla 5.20 la porosidad se determinó por MIP, que solo toma en cuenta a la porosidad abierta y se limita a los poros con uniones entre 6 nm y 360  $\mu\text{m}$ . De ahí los valores más bajos. Es importante remarcar que la porosidad abierta es la porosidad de interés en ingeniería de tejidos, porque es la porosidad accesible para las células.

Las imágenes de MEB de las formulaciones seleccionadas presentadas en la figura 5.17 revelan gran cantidad de macroporos en la estructura de las espumas. Sin embargo, con excepción de la espuma 20S-5Gb-0.55, la macroporosidad no se observa interconectada, lo que confirma el origen de la diferencia entre los valores de macroporosidad presentados en las tablas 5.18 y 5.20.

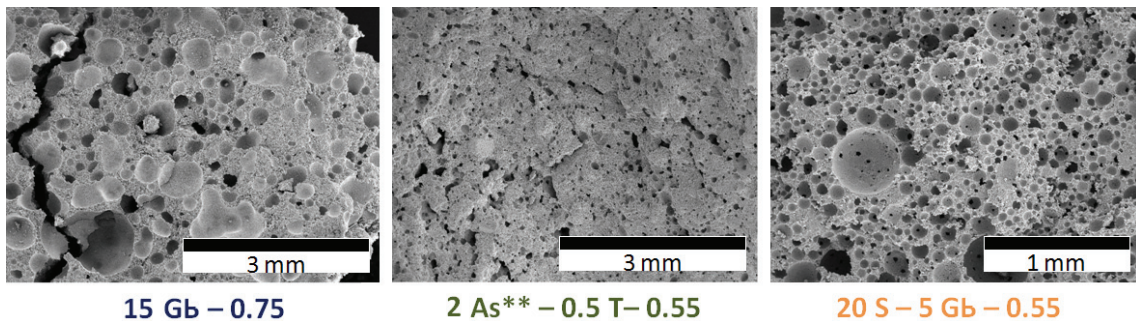


Figura 5.17: Imágenes por MEB de la macroestructura interna de los cementos compuestos autofraguables, inyectados y fraguados bajo condiciones fisiológicas simuladas.

En concordancia con las imágenes de MEB, la distribución de la porosidad presentada en la figura 5.18 muestra que solamente la espuma 20S-5Gb-0.55 presentó macroporosidad abierta con tamaño medio de entrada cercano a 20  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, el tamaño de entrada de la porosidad abierta del resto de las formulaciones de espumas es inferior a 10  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, sí es considerablemente mayor comparado con la nanoporosidad abierta de la referencia inorgánica no espumada (RefA-0.35). Por lo que se espera una mayor permeabilidad y una mayor reabsorción *in vivo*, que pueden dar como resultado una más rápida regeneración ósea en comparación con los cementos tradicionales sin espumar.

Al medir el diámetro de los macroporos por análisis de imagen en cada formulación de espuma, se encontró que los macroporos son considerablemente de mayor tamaño que las conexiones determinados por MIP (ver figura 5.18). Además, no existe un único tamaño de macroporo, sino que hay también un intervalo de tamaños. En el caso de la espuma 15Gb-0.75 los macroporos miden entre 80 y 480  $\mu\text{m}$ , mientras que para la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 los macroporos tiene tamaños entre 40 y 150  $\mu\text{m}$ , por último, los macroporos en la espuma 20S-5Gb-0.55 miden en promedio entre 50 y 250  $\mu\text{m}$ .



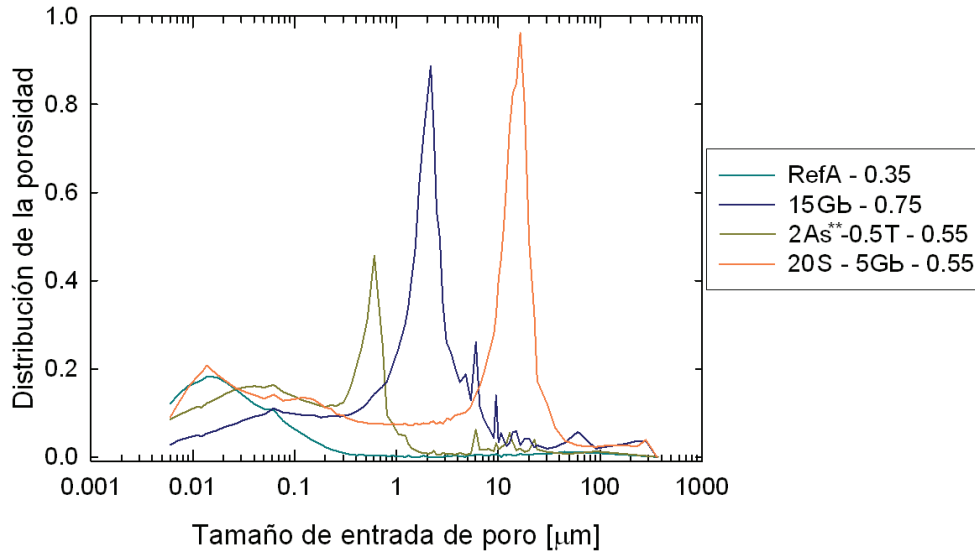


Figura 5.18: Distribución de la porosidad abierta en función del tamaño de entrada de poro, para los cementos compuestos autofraguables y el cemento de referencia inorgánico sin espumar, inyectados y fraguados bajo condiciones fisiológicas simuladas.

Cabe mencionar que la conectividad entre poros lograda después del proceso de inyección y del fraguado bajo condiciones fisiológicas simuladas no fue tan elevada como se esperaba y es difícil incrementar la macroporosidad abierta de estas formulaciones sin alterar la cohesión o la inyectabilidad. No obstante, el nivel de interconexión obtenido es comparable al de otros andamios que se estudian para regeneración ósea [9-13]. Adicionalmente, las espumas obtenidas tienen la ventaja de poder ser implantados mediante inyección, y además, la elevada nano/microporosidad de la CDHA que conforma la pared de las espumas podría acelerar la degradación del material, dando paso a la penetración de nuevo tejido óseo a los macroporos internos del implante.

#### 5.4.5.2 Porosidad abierta de las espumas prefraguadas

En lo que respecta a las formulaciones para obtener espumas prefraguadas, la tabla 5.21 muestra las características texturales de las mismas.

Tabla 5.21: Propiedades texturales de las formulaciones prefraguadas de espumas de HA. La densidad esquelética fue determinada por picnometría de helio, el resto de los valores fueron determinados mediante MIP.

Nomenclatura	Densidad aparente [g/ml]	Densidad esquelética [g/ml]	Porosidad Total [%]	Macro porosidad (5 – 360 $\mu\text{m}$ ) [%]	Nano/micro porosidad (6 nm – 5 $\mu\text{m}$ ) [%]
<b>0.5T – 0.55</b>	0.92	2.71	65.94	32.20	33.74
<b>10 Gb – 0.80</b>	0.97	2.59	54.74	6.05	48.69
<b>2 As** – 0.5 T – 0.80</b>	0.87	2.75	59.99	20.29	39.70
<b>20 S – 5 Gb – 0.60</b>	0.93	2.68	61.89	24.16	37.73

T: Tween 80; Gb: gelatina bovina tipo B; As\*\*: alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular; S: extracto de soja.

Como punto más destacable se encuentra el mayor volumen de macroporosidad abierta de estas formulaciones en comparación con las formulaciones autofraguables *in situ*. Esto se debe a la eliminación del requisito de cohesión de la pasta en medio líquido. Como se explicó en el capítulo 3 de esta tesis, la macroporosidad interconectada es un factor que disminuye considerablemente la cohesión de las pastas de cemento, debido a la mayor y más rápida penetración de fluidos en la estructura.

Como segundo punto se destaca que el control para las formulaciones prefraguadas corresponde a la espuma más macroporosa obtenida únicamente con Tween 80 como agente espumante, desarrollada en el capítulo 3 de esta tesis, y no en el cemento inorgánico sin espumar empleado como control de las formulaciones autofraguables *in situ*. La selección de este control se basó en la elevada eficiencia del Tween 80 como espumante, que permite obtener espumas macroporosas altamente interconectadas, pero sin cohesión de las pastas más porosas.

Las imágenes de MEB y la distribución de la porosidad abierta, presentadas respectivamente en las figuras 5.19 y 5.20, revelan que a pesar de la eficacia del proceso de espumado de la fase líquida empleando como agentes espumantes a polímeros naturales, el método es más eficiente si se utiliza el surfactante sintético Tween 80, ya que genera mayor porcentaje de macroporosidad abierta (área bajo la curva) y de mayor tamaño, utilizando concentraciones inferiores a las de los biopolímeros. Sin embargo, con la incorporación de los biopolímeros se espera incrementar el reconocimiento biológico del material a nivel molecular, para favorecer comportamientos celulares como la adhesión de células, la formación de vasos sanguíneos o la diferenciación osteoblástica.

En la figura 5.20 se observa también que el porcentaje de macroporosidad abierta disminuye conforme se incrementa la estabilidad de la pasta del cemento compuesto, en función del tipo de biopolímero empleado. Se ve que las disoluciones 20S-5Gb y 2As\*\*-0.5T generan pastas de similar estabilidad y por tanto originan el mismo grado de porosidad abierta (sin olvidar que ambos compuestos fueron fabricados con proporciones L/P diferentes). Mientras que la pasta de la espuma 15Gb-0.80 contiene menor cantidad de macroporos abiertos, probablemente por el gelificado de la gelatina que estabiliza la pasta, reduciendo la ruptura de las paredes de la espuma, que impide a la vez la formación de ventanas entre macroporos.

A pesar de que las formulaciones de espumas compuestas prefraguadas tienen elevada porosidad, el tamaño de la porosidad abierta obtenida es inferior al necesario para poder ser empleadas como andamio en ingeniería de tejido óseo, ya que los macroporos abiertos son pequeños para permitir la colonización celular y la angiogénesis (entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ ; ver figura 5.20). Por lo que se recomienda optimizar el proceso para obtener estructuras con características más adecuadas, es decir, mayor diámetro de las conexiones entre macroporos. Esto se puede lograr tomando ventaja de la flexibilidad del proceso en el laboratorio, probablemente combinando técnicas de espumado tales como la generación de gases o el sacrificio de partículas, con el espumado de la fase líquida.



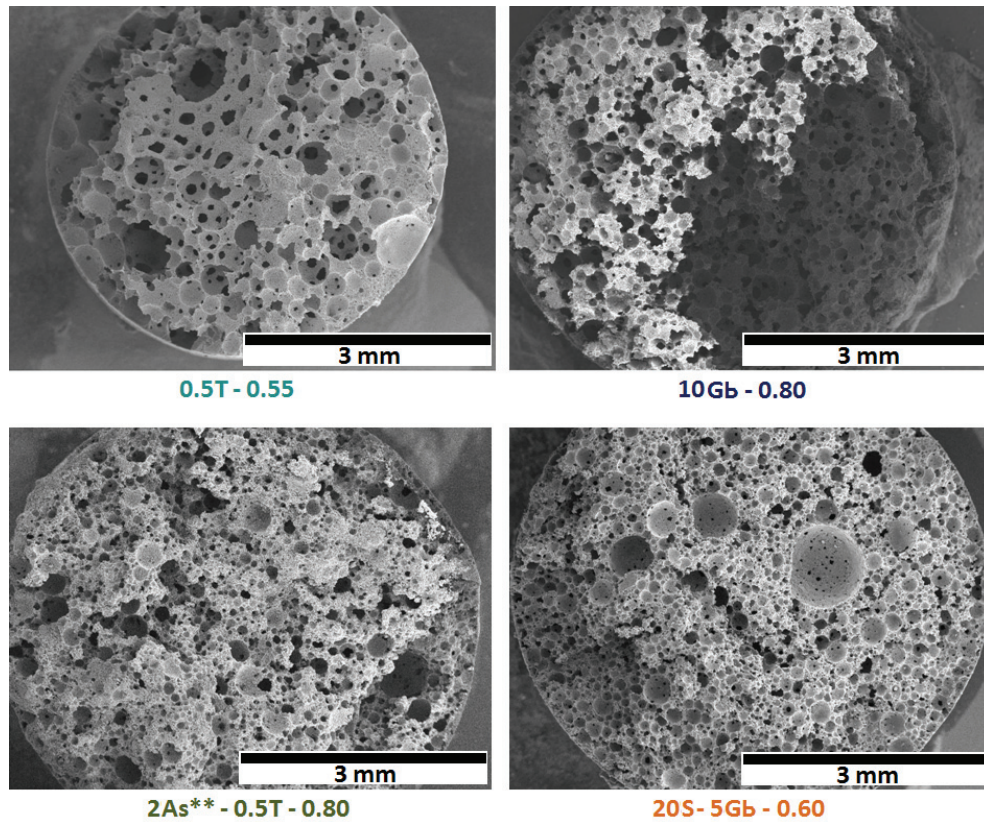


Figura 5.19: Imágenes de BEM, para las espumas de HA compuestas prefraguadas y la espuma de HA de referencia obtenida únicamente con Tween 80, moldeadas por espátula y fraguadas durante 7 días envueltas en papel de aluminio.

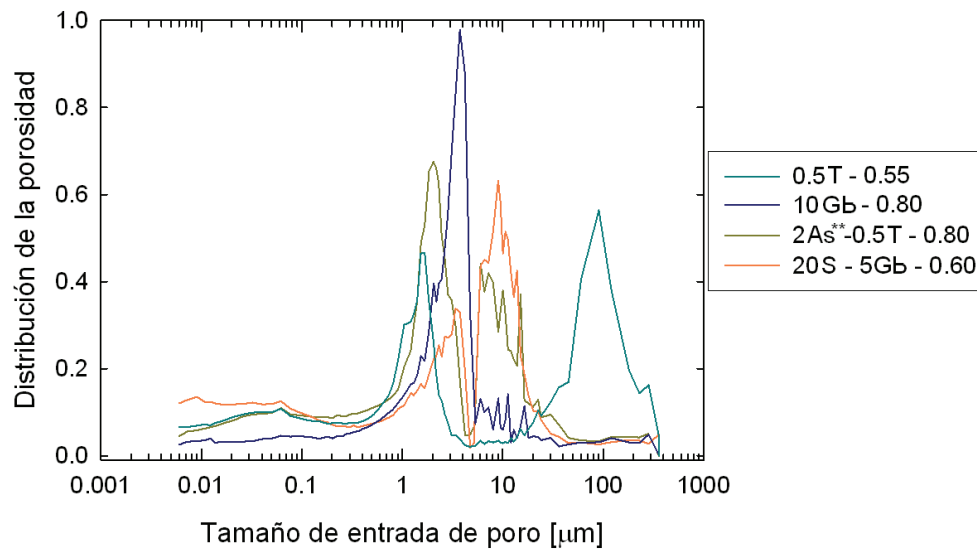


Figura 5.20: Distribución de la porosidad abierta en función del tamaño de entrada de poro, para las espumas de HA compuestas prefraguadas y la espuma de HA de referencia obtenida únicamente con Tween 80, moldeadas por espátula y fraguadas durante 7 días envueltas en papel de aluminio.

#### 5.4.5.3 Espumas autofraguables *in situ* vs. espumas prefraguadas

La selección realizada permite garantizar la cohesión de las espumas compuestas autofraguables *in situ*. Desafortunadamente, la disminución de la proporción L/P, la compresión de la pasta durante la inyección y la alta estabilidad de la pasta espumada por la incorporación de los biopolímeros, limitan la conectividad entre macroporos.

Por otro lado, el no requerir cohesión para las formulaciones prefraguadas permitió mayores ventajas al procesado *in vitro*, de las cuales destacan las siguientes:

1. Poder emplear las formulaciones de cemento compuesto fabricadas con las mayores proporciones L/P, lo cual incrementa la conectividad entre macroporos.
2. Realizar el moldeo mediante espátula, lo que también favorece la conectividad entre macroporos.
3. El fraguado de las formulaciones prefraguadas en atmósfera saturada de humedad permite que los biopolímeros se mantengan en el cemento y no se liberen en el medio hasta ser implantados o empleados como sustratos para el cultivo celular *in vitro*.

La liberación de los biopolímeros al ser implantadas las espumas no representa ningún inconveniente, sino que podría acelerar la degradación de las paredes de los macroporos, facilitando la colonización celular y por tanto podría acortar el tiempo de penetración de nuevo hueso; superando el inconveniente de la baja conectividad entre macroporos.

Como se puede observar de las tablas 5.20 y 5.21, la composición de las formulaciones autofraguables no es muy diferente a la composición de las formulaciones prefraguadas. Las diferencias entre ambas radican en los parámetros de procesado como la proporción L/P, el tipo de moldeo y el medio de fraguado. Sin embargo, estos cambios originaron diferencias relevantes en la macroestructura de cada tipo de compuesto.

Las similitudes y diferencias entre las formulaciones autofraguables y prefraguadas se resumen en la tabla 5.22.

En términos de macroporosidad total el espumado de la fase líquida empleando los polímeros naturales como espumantes fue tan eficaz como el espumado con Tween 80, la diferencia radica en el volumen de macroporosidad abierta conseguido.

Tabla 5.22: Comparación de las características entre las formulaciones autofraguables *in situ* y prefraguadas, obtenidas con polímeros naturales como agentes espumantes.

Tipo de formulación del cemento compuesto	Autofraguable <i>in situ</i>	Prefraguada
<b>Aplicación</b>	Relleno por inyección y regeneración de lesiones óseas de tamaño crítico	Fabricación <i>en el laboratorio</i> de sustratos para relleno óseo o aplicaciones <i>in vitro</i> de ingeniería de tejido óseo
<b>Cohesión</b>	Excelente	Sin cohesión
<b>Inyectabilidad</b>	Excelente	Inyectables pero se recomienda moldearlos por espátula
<b>Eficiencia del espumado con polímeros naturales</b>	Alta	Alta
<b>Replica de la espuma líquida inicial</b>	Alta	Excelente si se moldean con espátula
<b>Macroporosidad abierta entre 5 y 360 <math>\mu\text{m}</math></b>	Nula a excepción del compuesto con soja más gelatina	Poca
<b>Comparación con las espumas obtenidas sólo con Tween 80</b>	Menor macroporosidad abierta, mejor inyectabilidad, mayor cohesión y mayor similitud al tejido óseo	Macroporosidad total similar, menor conectividad entre macroporos y mayor similitud al tejido óseo

En el caso de las formulaciones con gelatina, la conectividad entre macroporos, y por tanto la macroporosidad abierta, es la menor debido a la gelificación que impide la ruptura de las paredes entre macroporos. Sin embargo, al incrementar la proporción L/P de 0.75 a 0.80 ml/g se consigue incrementar el diámetro máximo de las conexiones de 2  $\mu\text{m}$  a entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ , pese a ello, la cantidad de macroporosidad abierta por estas ventanas es baja.

Durante la obtención de piezas cerámicas en verde para su posterior sinterización, Studart [5] relaciona la baja conectividad entre macroporos con la elevada estabilidad de la suspensión cerámica espumada, que evita la apertura de uniones entre macroporos. Un fenómeno similar se observa también en el método de espumado por emulsión, donde Bohner [14] relaciona la conectividad de la porosidad con la inestabilidad de la emulsión durante el fraguado del cemento.

Para aumentar la macroporosidad abierta de las espumas compuestas con gelatina se sugirió espumar el cemento empleando una fase líquida con menor concentración de gelatina, con el objetivo de limitar la gelificación y favorecer la formación de uniones. La figura 5.21 muestra la distribución de la porosidad para la espuma 10Gb-0.80 y la compara con la espuma obtenida con 1 % de gelatina B en la fase líquida obtenida con la misma proporción L/P (1Gb-0.80).

Se observa como la macroporosidad abierta (poros con entradas mayores a 5  $\mu\text{m}$ ) se incrementa al disminuir el contenido de gelatina (área bajo la curva), hecho que corrobora la hipótesis de que las uniones entre macroporos se originan por la ruptura parcial de las paredes entre poros antes del fraguado del cemento. La cuantificación de la porosidad dio como resultado que al disminuir el contenido de gelatina la macroporosidad abierta paso de 6 a 15 %, y además, el tamaño de las uniones se incrementó de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ , a mayoritariamente entre 5 y 50  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a la cantidad de porosidad abierta por debajo de 5  $\mu\text{m}$ , ésta disminuyó debido a que parte de los macroporos pasaron a estar conectados por uniones de mayor tamaño, lo cual modifica la distribución tanto por arriba como por debajo de 5  $\mu\text{m}$ .

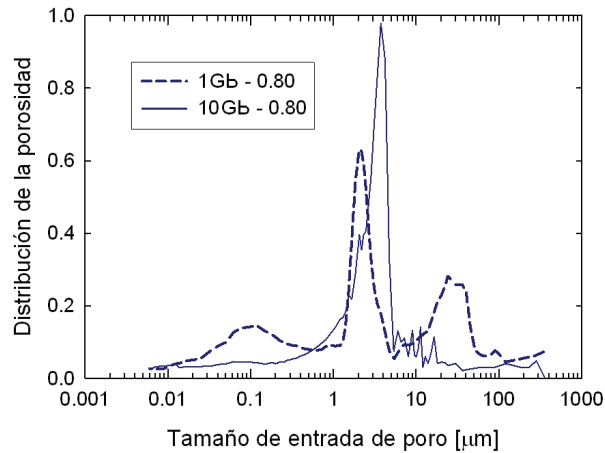


Figura 5.21: Distribución de la porosidad abierta en función de la tamaño de entrada de poro, para espumas con 1 ó 10 % de gelatina bovina tipo B, preparadas con una proporción L/P de 0.80 ml/g y fraguadas envueltas en papel de aluminio durante 7 días.

Por otro lado, entre los compuestos con alginato de sodio sulfatado más 0.5 % de Tween 80, el incremento de la proporción L/P de 0.55 a 0.80 ml/g propició considerablemente la formación de uniones entre macroporos, pasando de uniones menores a 1  $\mu\text{m}$  a uniones entre 5 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cabe mencionar que pese a que el tamaño de porosidad abierta en la espuma 2As\*\*-0.5T-0.80 es igual al de la espuma 10Gb-0.80, el volumen de macroporosidad abierta es mayor en el primer caso (mayor área bajo la curva en la figura 5.20), debido a la menor estabilidad del gel de alginato que permite la formación de mayor cantidad de conexiones.

A pesar de la menor proporción L/P de la espuma 20S-5Gb-0.60, el tamaño y la cantidad de los macroporos abiertos coincide con los obtenidos para la espuma 2As\*\*-0.5T-0.80 (ver figura 5.20). La disminución de la viscosidad de la pasta por la incorporación del extracto de soja y el menor contenido de gelatina explican la mayor formación de conexiones que dan lugar a una mayor macroporosidad abierta. La menor estabilidad de la pared entre macroporos, junto con la ligera disminución de la proporción L/P, explican también que la espuma autofraguable 20S-5Gb-0.55 mantenga las conexiones después de ser inyectada, aunque con una distribución de tamaño más estrecha centrada en aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  (ver figura 5.18).

#### 5.4.5.4 Morfología de la macroporosidad y conectividad entre macroporos

Por un lado, es un hecho que los compuestos autofraguables *in situ* y los prefraguados presentan una elevada porosidad abierta entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  (ver figuras 5.18 y 5.20) que pueden servir de canales para el intercambio de nutrientes o desechos celulares al interior del material. También pueden servir para integrar sistemas controlados de liberación de fármacos, tomando ventaja de que la consolidación de la estructura se lleva a cabo a temperatura ambiente [15,16].

Por otro lado, la morfología de la estructura sólida macroporosa obtenida por el método de espumado de la fase líquida reprodujo la morfología de la espuma de partida. Por tanto, los

factores que afectan el tamaño de las burbujas en la espuma líquida son los mismos que afectan el tamaño de los macroporos en el sólido.

En cuanto a la conectividad entre macroporos, ésta está ligada a la cantidad de macroporos introducidos y a la estabilidad de la pasta cementante espumada.

*Densidad de macroporos:* La macroporosidad abierta se origina por puntos de contacto entre macroporos, de tal forma que macroporos aislados no estarán interconectados por uniones macroscópicas. Por tanto, la mayor presencia o densidad de poros incrementa la probabilidad de tener uniones.

*Estabilidad de la pasta espumada:* La existencia de puntos de contacto entre las burbujas no es la única condición para obtener estructuras con macroporosidad abierta. Además de ello, la estabilidad de la pasta debe ser adecuada para permitir la formación de ventanas mediante la ruptura moderada de la pared; así pastas espumadas extremadamente estables no presentarían interconexiones.

Los factores que regulan la estabilidad de la pasta espumada son los mismos que intervienen en la estabilidad de la espuma líquida. Adicionalmente, una vez mezclada homogéneamente la espuma líquida con el polvo, éste le confiere un mayor nivel de estabilidad, debido a que la pared de la espuma pasa de ser líquido a ser una suspensión de partículas sólidas, lo que incrementa la viscosidad. Además, la suspensión de partículas o lo que es igual la pasta de cemento, endurece por efecto de la reacción de fraguado, terminando de estabilizar las burbujas incorporadas convirtiéndolas en macroporos en la estructura sólida final.

Como se puede intuir, el equilibrio entre espumabilidad y estabilidad no sólo es importante para obtener una buena espuma líquida, sino que también es importante para obtener macroporos con diámetro adecuado para la regeneración ósea, y más aun, con interconexiones de tamaño suficiente para que las células puedan colonizar la estructura.

De forma general, los factores que incrementan la introducción de macroporosidad en los cementos son:

- Fases líquidas del cemento con elevada espumabilidad.
- Espumas líquidas estables para resistir la mezcla con el polvo del cemento.
- Fases líquidas que incorporen fácilmente el polvo del cemento.
- Trabajar con proporciones L/P elevadas.
- Tiempos de fraguado lo suficientemente largos para mezclar el polvo con la espuma.

A su vez un factor que define el tamaño de los macroporos introducidos en el cemento es la viscosidad de la espuma líquida. En general, disoluciones más viscosas, es decir con mayor contenido de biopolímero, generan macroporos de menor diámetro. Tal es el caso de los resultados obtenidos con gelatina y alginato de sodio sulfatado reportados respectivamente en las figuras 5.6 - 5.7 y 5.13 - 5.14. Este hecho concuerda con los resultados de Studart durante la obtención de estructuras cerámicas macroporosas en verde, para la futura consolidación mediante sinterización [5], donde reporta que altas concentraciones de surfactante forman espumas con burbujas de menor tamaño, que a su vez generan poros de menor diámetro.

Como ya se mencionó, la viscosidad también incrementa la estabilidad de la espuma. Espumas estables propician que no se modifique el tamaño de las burbujas de la espuma durante el mezclado, debido a que reduce la coalescencia de burbujas. Por tanto espumas estables producen también macroporos de menor tamaño comparadas con espumas menos estables.

Finalmente, los factores que disminuyen la conectividad entre macroporos son:

- El rápido fraguado del cemento.
- La formación de un gel que estabiliza la pared, como en el caso de los cementos compuestos con gelatina.
- Las pastas espumadas con muy alta estabilidad, las cuales generan poros no conectados aunque ellos estén en contacto directo.
- La baja densidad de poros, lo cual disminuye la probabilidad de tener puntos de contacto entre macroporos.
- La inyección de la pasta espumada, si se inyecta a un tiempo próximo al tiempo de fraguado del cemento.

#### 5.4.6 Estudio cinético de la reacción de endurecimiento

El estudio cinético de la reacción de endurecimiento se realizó con las formulaciones de espumas seleccionadas como inyectables y autofraguables *in situ* (ver tablas 5.18 y 5.20). Como control se utilizó el cemento inorgánico no espumado, preparado con 2.5 % w/v de acelerante de la reacción de fraguado bajo una proporción L/P de 0.35 ml/g (RefA.0.35).

##### 5.4.6.1 Evolución del porcentaje de reacción

Los difractogramas obtenidos para cada espuma compuesta y cada tiempo se recogen en la figura 5.22. En ellos se puede observar como los picos de difracción correspondientes al  $\alpha$ -TCP disminuyen de intensidad conforme se incrementa el tiempo de reacción. También se puede apreciar como al transcurrir el tiempo aparecen y se incrementa la intensidad de los picos correspondientes al producto de la reacción de fraguado, en todos los casos CDHA como se comprobará con los resultados de IR [17,18].

El  $\alpha$ -TCP se indexó de acuerdo a la ficha cristalográfica JCPDS 09-0348, en tanto que la CDHA se indexó empleando la ficha JCPDS 09-0342 correspondiente a la HA, ya que pertenecen al mismo grupo cristalino.

Por otro lado, debido a la poca intensidad y al ancho de los picos de difracción del producto de reacción, se puede decir que la cristalinidad de la CDHA es baja, lo cual, junto con la deficiencia en calcio de la celda cristalina, significa mayor similitud con la fase mineral del tejido óseo. Se espera que este hecho incremente también la rapidez de reabsorción del material acortando el tiempo de regeneración de la lesión a tratar *in vivo*.



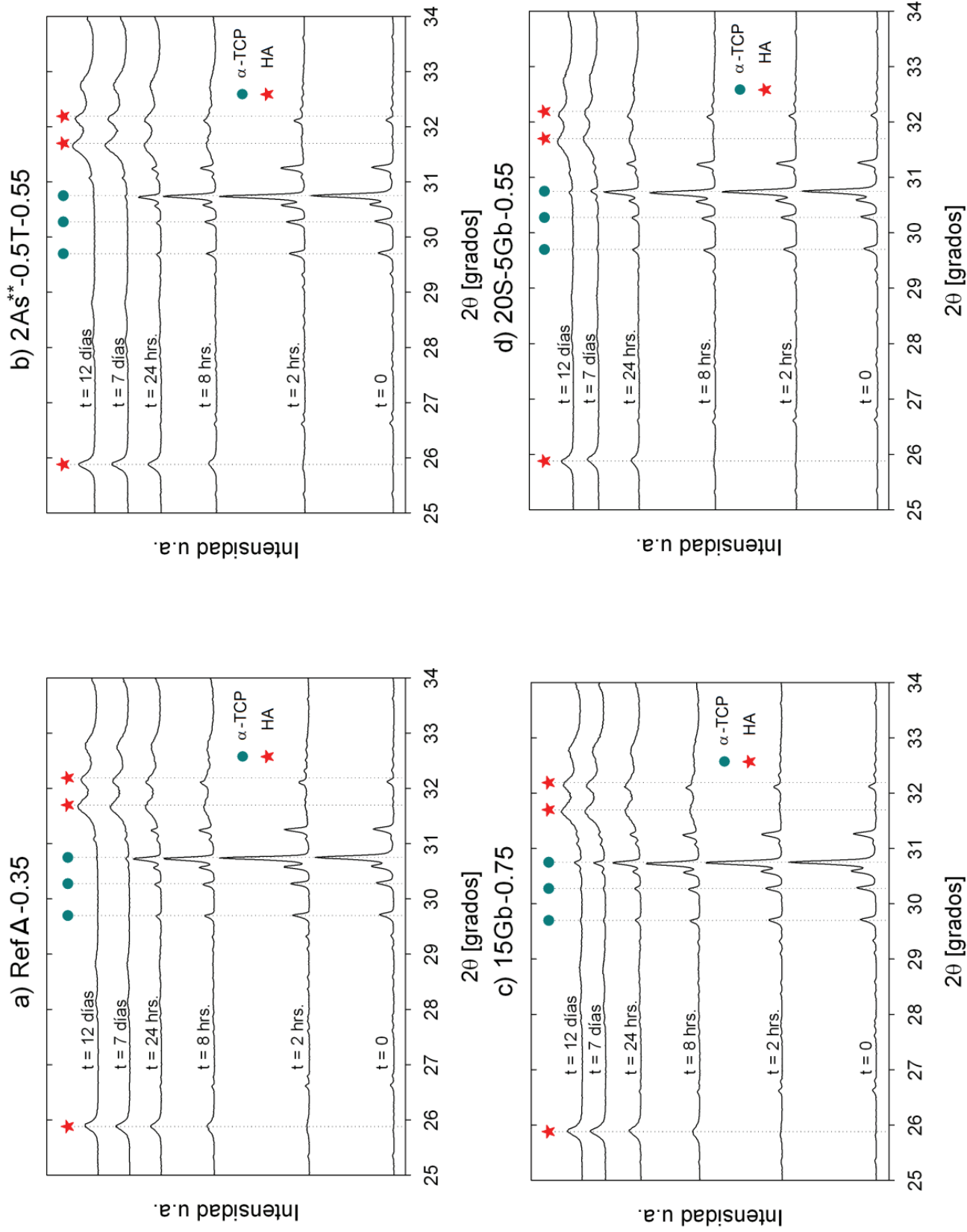


Figura 5.22: Diagramas de DRX después de 0, 2, 8, 24 horas, 7 y 12 días de reacción, para las diferentes formulaciones de espuma autofraguables in situ seleccionadas. Fraguadas por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C.

La cuantificación del avance de la reacción para las espumas autofraguables bajo condiciones fisiológicas simuladas se presenta en la figura 5.23. La gráfica muestra que el cemento de referencia alcanza el 49 % de transformación en 8 horas, posteriormente la cinética se retarda, para alcanzar el máximo de transformación obtenido (96 %) al tiempo de 168 horas (7 días). El cambio en la cinética está relacionado con el mecanismo controlante de la reacción. En un inicio la transformación es elevada porque depende únicamente de la reactividad del  $\alpha$ -TCP. Conforme avanza la conversión, el  $\alpha$ -TCP es envuelto por los cristales precipitados de CDHA, que generan un segundo mecanismo controlante, que es la difusión de iones a través de la capa del producto de reacción [19].

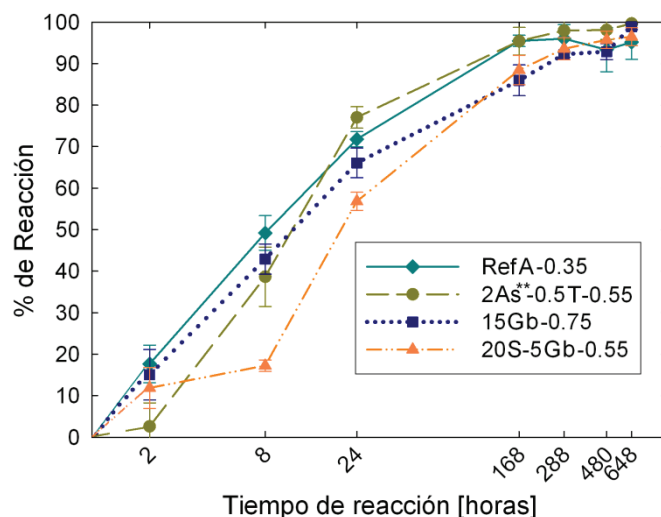


Figura 5.23: Porcentaje de conversión a CDHA en función del tiempo de reacción para las diferentes espumas autofraguables in situ seleccionadas.

Por otro lado, la cinética de reacción de la espuma 2As\*\*<sup>-</sup>-0.5T-0.55 es estadísticamente más lenta que la cinética del cemento de referencia durante las primeras 8 horas, alcanzando en este periodo tan solo el 39 % de transformación. Posteriormente la reacción se acelera igualando el porcentaje de conversión de la referencia a 168 horas. Por último, la reacción continúa para alcanzar prácticamente el 100 % de transformación a 288 horas (12 días). Una posible explicación del lento inicio de la reacción es la formación del gel de alginato con los iones calcio del cemento. Este secuestro inicial de iones podría retrasar la nucleación de los nuevos cristales y por tanto el alginato actúa como retardante. Una vez colmado el alginato con iones calcio, la saturación local de iones fosfato en la pasta se refleja en una cinética de precipitación más rápida por el efecto del ion común [20].

En cuanto a la espuma 15Gb-0.75, la cinética de reacción durante las primeras 24 horas no presentó diferencias significativas con respecto al cemento de referencia (RefA-0.35), obteniendo el 66 % de transformación a 24 horas. Sin embargo, a tiempos mayores a 24 horas, la cinética de transformación se torna más lenta en comparación con RefA-0.35, de tal forma que a 168 horas tan solo se logra un 86 % de transformación. Afortunadamente, al igual que la espuma 2As\*\*<sup>-</sup>-0.5T-0.55, la reacción continúa hasta obtener el máximo de conversión (93 %) al término de 288 horas (12 días).



Finalmente, la espuma 20S-5Gb-0.55 es la que menos rapidez de transformación alcanza durante las primeras 24 horas de inmersión, probablemente por el elevado contenido de materia orgánica que incorpora (17 % en peso), lo que dificulta la difusión de iones retrasando tanto la disolución del reactivo como la precipitación del producto. No obstante, de 24 a 168 horas el porcentaje de transformación pasa del 57 al 88 %, continuando hasta alcanzar el máximo de 96 % a 288 horas (12 días).

#### 5.4.6.2 Evolución de la superficie específica

Por su parte la superficie específica es otro indicador del avance de la reacción de los cementos, ya que durante la reacción las partículas poliédricas de  $\alpha$ -TCP obtenidas durante la molienda pasan a formar un mayor número de cristales de menor tamaño tal como se explica en el capítulo 2 de esta memoria (sección 2.3.3). Además, la superficie específica proporciona una idea relativa sobre el tamaño de los cristales que conforman la microestructura del cemento, es por ello que en la figura 5.24 se presenta la superficie específica en función del tiempo de reacción para cada compuesto estudiado.

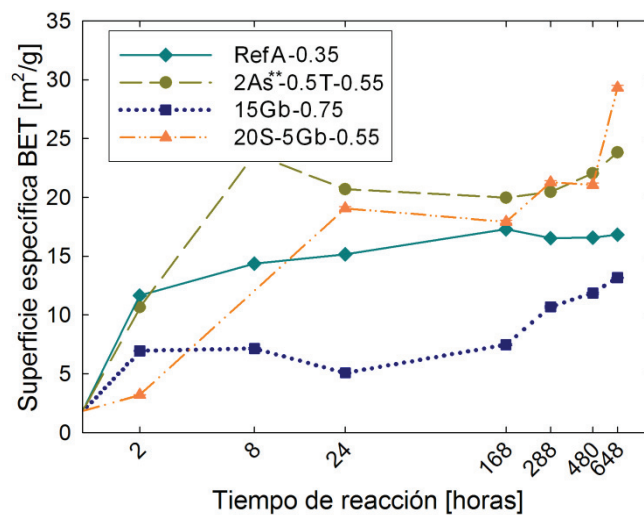


Figura 5.24: Evolución de la superficie específica en función del tiempo de reacción para las diferentes espumas autofraguables in situ seleccionadas.

Como se mencionó, conforme transcurre el tiempo de reacción la superficie específica se incrementa debido al crecimiento de los cristales de CDHA. A excepción de la espuma 20S-5Gb-0.55, cerca de un 50 % de superficie se alcanza alrededor de las 2 primeras horas de reacción. Mientras que la espuma 20S-5Gb-0.55 alcanza el valor medio en un tiempo entre 2 y 8 horas de reacción.

Las diferencias en superficie específica sugieren que los biopolímeros interfieren en el mecanismo de reacción del  $\alpha$ -TCP, lo cual explicaría también las diferencias observadas en la cinética de conversión a CDHA. No obstante, el hecho de que los resultados de DRX mostraran que el producto de reacción es HA, indica que los polímeros no modifican el producto de reacción, resultado que se comprobaba mas adelante con los resultados de IR. Las diferencias en superficie específica indican también que el efecto de los biopolímeros puede ser a nivel microestructural, produciendo cristales de CDHA de diferentes tamaños.

De acuerdo al valor tomado a 288 horas (12 días), hay dos cementos con superficie cercana a  $20 \text{ m}^2/\text{g}$ , que corresponde a 2As\*\*-0.5T-0.55 y 20S-5Gb-0.55, y dos con menor superficie, RefA-0.35 y 15Gb-0.75 con 16 y  $12 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente. Lo cual significa que en promedio los cristales de CDHA en la espuma obtenida con gelatina son de mayor tamaño, en tanto que los cristales en las espumas obtenidas alginato y soja/gelatina son de menor tamaño, todos con respecto a la referencia no espumada.

Por un lado, el menor tamaño de los cristales precipitados en presencia del alginato de sodio o el extracto de soja se puede relacionar con una menor difusión iónica durante el fraguado, que limita el crecimiento, al menos durante las primeras horas de reacción. Es probable que una vez que el polímero se libera hacia el medio de fraguado, éste deja de interferir en la difusión, y la reacción se hace más rápida como se muestra en la figura 5.23.

Por otro lado, el mayor tamaño de los cristales en presencia de gelatina concuerda con los resultados del capítulo 4, sección 4.4.4.1. Sin embargo, difieren de los reportados por Bigi [21,22] y Kevor [23], porque ellos reportan que los cristales de apatita precipitada son de menor tamaño cuando se incorpora la gelatina en el cemento de  $\alpha$ -TCP.

Cabe mencionar que después de 12 días de reacción no se observaron diferencias relevantes en el ancho de los picos de difracción de los diferentes materiales, lo que sugiere que las diferencias de tamaño en los dominios cristalinos de la HA, a causa de la incorporación de los biopolímeros no son detectables por DRX, al menos bajo las condiciones de ensayo aquí utilizadas.

Otro método con el que se puede observar la morfología y el tamaño de los cristales de CDHA en las espumas es mediante MEB.

#### 5.4.6.3 Evolución de la microestructura

Una imagen comparativa de las microestructuras de los cementos, correspondiente a una superficie de fractura después de 8 horas de reacción en solución de Ringer, se presenta en la figura 5.25. En ella se puede apreciar la aparición de los cristales de CDHA en cada formulación. Sin embargo, en la espuma 20S-5Gb-0.55 la presencia de cristales es menos evidente, puesto que estos tienen menor tamaño y prevalece la microestructura original del  $\alpha$ -TCP. Lo cual confirma la mayor lentitud de la reacción de hidrólisis, posiblemente a causa de la adsorción de materia orgánica sobre las partículas de reactivo.

Comparando las microestructuras en la figura 5.25, correspondientes a las espumas compuestas con la del cemento de referencia, parece ser que la presencia de la gelatina en la espuma 15Gb-0.75 es en forma de extensiones que unen a cada partícula de  $\alpha$ -TCP. En tanto que en la espuma 20S-5Gb-0.55, la materia orgánica parece estar en forma de agregados que cubren la superficie del  $\alpha$ -TCP. Finalmente, haciendo la comparación visual no se puede observar la presencia de la materia orgánica en la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55.

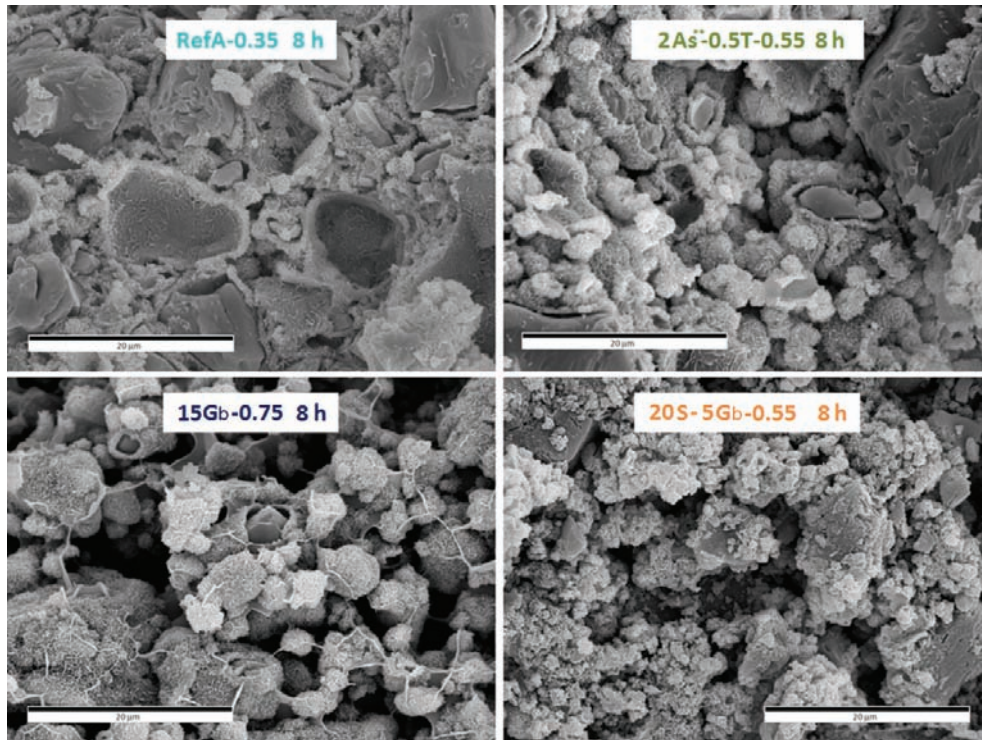


Figura 5.25: Imágenes por MEB de la microestructura de la superficie de fractura para el cemento de referencia y las diferentes formulaciones de espuma obtenidas con los biopolímeros. Imágenes obtenidas después de 8 horas de reacción por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C. Barra de escala = 20 µm.

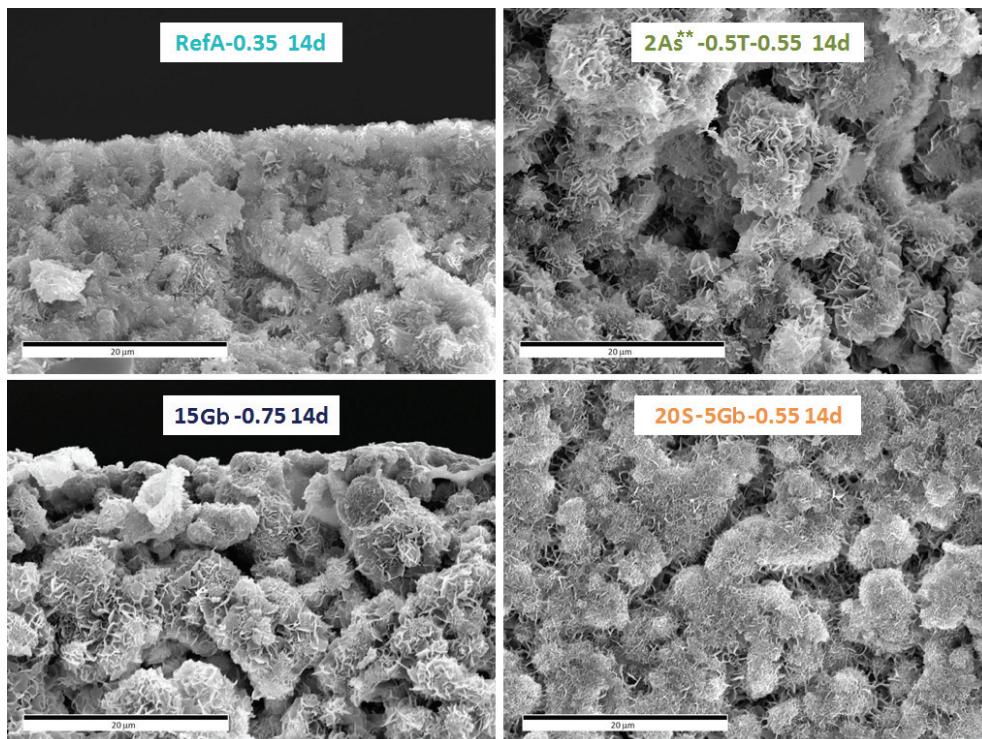


Figura 5.26: Imágenes por MEB de la microestructura de la superficie de fractura para el cemento de referencia y las diferentes formulaciones de espuma obtenidas con los biopolímeros. Imágenes obtenidas después de 14 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C. Barra de escala = 20 µm.



La figura 5.26 muestra las microestructuras de la superficie de fractura de los cementos después de 14 días (336 horas) de reacción por inmersión en disolución de Ringer. En las imágenes se aprecian la morfología final de los cristales entrecruzados de CDHA responsables del endurecimiento. Se distingue también la mayor continuidad entre los cristales en el cemento de referencia y la presencia de espacios entre agregados de cristales en las espumas compuestas originados por la mayor proporción L/P de mezclado (ver capítulo 3 sección 3.4.4.5). En las imágenes se observa cómo los cristales en las espumas 2As\*\*-0.5T-0.55 y 20S-5Gb-0.55 son ligeramente de menor tamaño que los cristales en el cemento RefA-0.35; además, parecen ser de tamaños similares tal como lo indicó el valor de superficie específica, resultado que concuerda en que ambos cementos fueron fabricados bajo la misma proporción L/P. En tanto que los cristales de la espuma 15Gb-0.75 parecen ser de mayor tamaño que los de la referencia, hecho que también concuerda con la menor superficie específica de esta espuma (ver figura 5.24).

Por último, después de 14 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer, la presencia de materia orgánica entre los cristales de CDHA no es evidente en ninguna espuma, (ver figura 5.26).

A través de las imágenes de MEB también se determinó que los cristales dentro de la estructura no son de tamaño homogéneo. De acuerdo a las imágenes mostradas en la figura 5.27, los cristales tienden a ser de mayor tamaño en las superficies (superficie externa de la muestra o superficie de poro). Por tanto, la superficie específica es tan solo un indicador del tamaño medio de los cristales precipitados y la correspondencia con las imágenes de MEB dependerá de la zona observada.

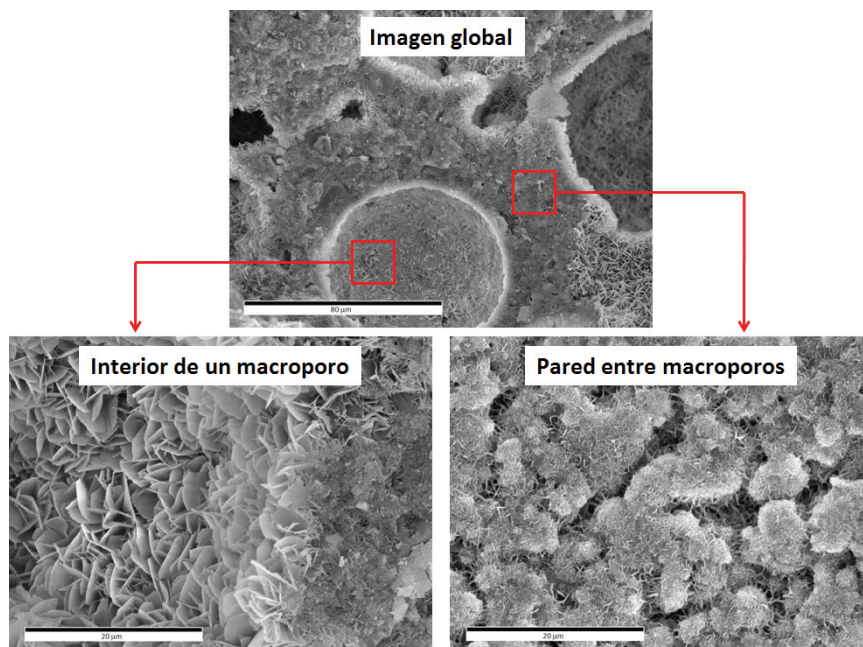


Figura 5.27: Imágenes por MEB correspondientes a la superficie de fractura de la espuma 20S-5Gb-0.55 fraguada durante 14 días por inmersión en Ringer a 37 °C. La imagen superior (barra = 80 μm) muestra el aspecto de un macroporo en la estructura, mientras que las imágenes en la parte inferior (barra = 20 μm) muestran los cristales de CDHA en el interior de un macroporo (izquierda) y en la pared entre macroporos (derecha).

#### 5.4.6.4 Espectroscopia de infrarrojos:

Otro método para monitorizar la reacción de fraguado de los cementos es a través de IR [19]. La figura 5.28 muestra los espectros IR para el polvo de cemento de partida y el cemento de referencia reaccionado durante 2 horas y 12 días. Para el polvo de partida (Ref-0.35,  $t = 0$ ) tan solo pueden observarse las bandas de deformación de los grupos tetraédricos del fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Estas son la banda más importante correspondiente a las extensiones triples  $\nu_3$  del enlace P-O centradas a  $1016 \text{ cm}^{-1}$ , en segundo término se tiene la banda correspondiente a las flexiones triples  $\nu_4$  del enlace O-P-O centrada en  $580 \text{ cm}^{-1}$ , y por último, la banda débil de las extensiones simétricas  $\nu_1$  del enlace P-O a  $956 \text{ cm}^{-1}$  [19].

Conforme avanza la reacción de hidrólisis aparecen dos bandas en el espectro de IR, éstas son  $3400$  y  $1620 \text{ cm}^{-1}$  que corresponden respectivamente a la extensión y la flexión de las moléculas de agua estructural, incorporadas en la celda cristalina para formar la HA. Además, la extensión principal del grupo fosfato  $\nu_3$  se agudiza y se desplaza a  $1024 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que la flexión  $\nu_4$  se desdobra produciendo dos bandas típicas de la HA en  $577$  y  $561 \text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, aparecen tres bandas u hombros de baja intensidad correspondientes únicamente a la CDHA, éstos son el hombro débil a  $1200 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la extensión  $\delta_{\text{OH}}$  del grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ , el hombro débil de vibración  $\nu_3$  del mismo grupo a  $1105 \text{ cm}^{-1}$  y la banda correspondiente a la extensión  $\nu_5$  del enlace P-OH a  $854 \text{ cm}^{-1}$  [19]. Con lo que se demuestra que el producto de la reacción de fraguado no es solo HA sino que es CDHA.

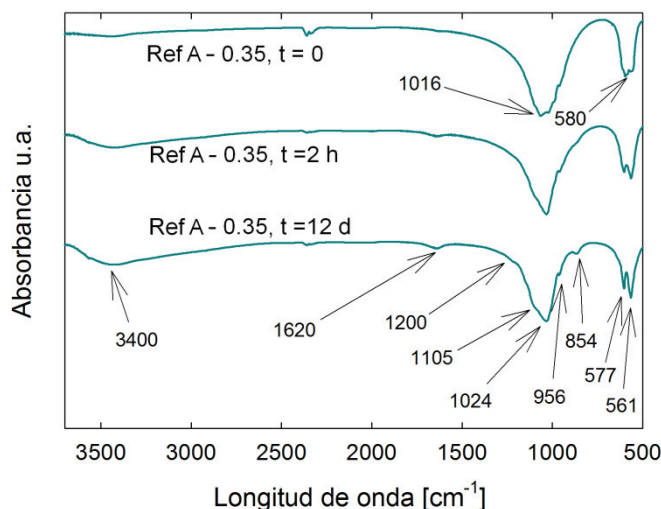


Figura 5.28: Espectros IR de absorbancia correspondientes al cemento de referencia después de 0, 2 horas y 12 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La figura 5.29 muestra el espectro IR para el alginato sulfatado puro ( $\text{DS} = 6.5$ ) más los espectros de la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 a 2 horas y 12 días de reacción. Para el alginato de sodio puro, un polisacárido, se observa una banda ancha intensa a  $3370 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las extensiones de los grupos OH, una banda débil a  $2910 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la extensión del enlace C-H, y dos bandas agudas correspondientes a las extensiones del grupo  $\text{COO}^-$  a  $1600$  y a  $1400 \text{ cm}^{-1}$ . Más adelante se encuentra la banda aguda correspondiente al grupo sulfato en una posición de  $1236 \text{ cm}^{-1}$ . Finalmente se encuentran dos bandas anchas correspondientes a las extensiones de los enlaces C-O y C-O-C a  $1085$  y  $1030 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [24].

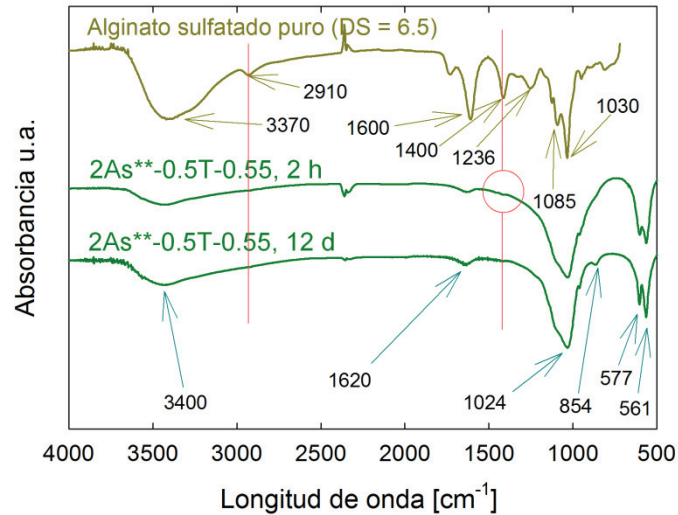


Figura 5.29: Espectros IR de absorbancia correspondientes al alginato sulfatado puro y a la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 después de 2 horas y 12 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C.

En cuanto a la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55, ésta presenta las bandas de la incorporación del agua estructural de la HA a 3400 y 1620  $\text{cm}^{-1}$ , también incorpora las extensiones  $\nu_3$  del grupo fosfato a 1024  $\text{cm}^{-1}$ , el desdoblamiento de las flexiones triples  $\nu_4$  para formar las bandas de HA a 577 y 561  $\text{cm}^{-1}$ , y la aparición de la banda débil de la CDHA a 854  $\text{cm}^{-1}$ , por lo que el compuesto reacciona para formar CDHA. Por otro lado, las extensiones de los grupo OH del carbohidrato se solapan con las extensiones de los OH del agua estructural de la apatita, asimismo, la extensión del grupo  $\text{COO}^-$  a 1600  $\text{cm}^{-1}$  y la extensión de los enlaces C-O y C-O-C, se solapan respectivamente con el agua estructural de la apatita y las extensiones  $\nu_3$  del fosfato. Sin embargo, la extensión C-H y la extensión  $\text{COO}^-$  a 2910 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  podrían servir para detectar la presencia del alginato de sodio en el compuesto. No obstante, debido a la baja cantidad de biopolímero en el cemento (1.1 % en peso) fue prácticamente imperceptible. Tan sólo a 1400  $\text{cm}^{-1}$  al tiempo de inmersión o reacción de 2 horas se logra apreciar una pequeña prominencia correspondiente a la extensión del grupo  $\text{COO}^-$ , la cual ya no es perceptible a 12 días de inmersión, lo que podría significar la completa liberación del poco contenido de alginato de sodio sulfatado.

La figura 5.30 muestra los espectros IR de la gelatina de bovino tipo B y de la espuma 15Gb-0.75 a 2 horas y 12 días de reacción. El espectro correspondiente a la gelatina pura muestra las bandas de extensión de la amida (N-H) A y B respectivamente a 3274 y 3047  $\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente a 2920  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda de extensión de los aminoácidos (C-H), seguida a 1647  $\text{cm}^{-1}$  por la banda de la amida I del enlace C=O y finalmente a 1527  $\text{cm}^{-1}$  por la banda de la amida II de la gelatina, correspondiente a la estructura helicoidal [24].

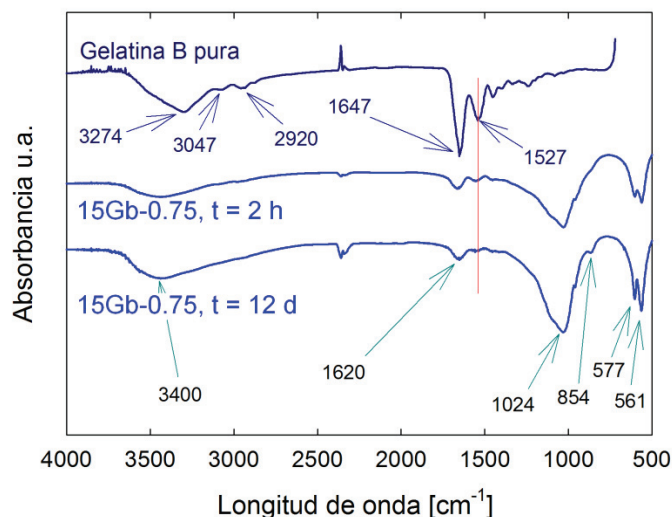


Figura 5.30: Espectros IR de absorbancia correspondientes a la gelatina bovina tipo B pura y a la espuma 15Gb-0.75 después de 2 horas y 12 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C.

La mayoría de las bandas de gelatina se solapa con las bandas de CDHA de la espuma fraguada, sin embargo, la banda a  $1527\text{ cm}^{-1}$  es única para la amida II de la gelatina y puede observarse tanto en el compuesto 15Gb-0.75 fraguado durante 2 horas y 12 días. No obstante, la intensidad es mayor al tiempo corto de inmersión. Este resultado prueba de forma cualitativa la presencia del biopolímero en la estructura a pesar de que en las imágenes de MEB a 12 días mostradas en la figura 5.26 no se observe. Por último, los espectros correspondientes a la espuma 15Gb-0.75, muestran las bandas de la HA y de la CDHA que reafirman la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP observada por difracción de rayos X.

La figura 5.31 muestra los espectros IR de la gelatina pura, el extracto de soja puro y de la espuma 20S-5Gb-0.55 a 2 horas y 12 días de reacción. El espectro IR correspondiente al extracto de soja se puede tratar como si fuese la suma del espectro correspondiente a la gelatina más el espectro correspondiente al alginato, debido a que es una mezcla de proteínas y carbohidratos; sin embargo, no corresponde a la mezcla real de ambos componentes. En la imagen se observa la banda a  $3370\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las extensiones de los grupos OH, la banda a  $2920\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las extensiones de los enlaces C-H, la banda a  $1735\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la amida I de la proteína (C=O), la banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los enlaces C-C, la banda a  $1410\text{ cm}^{-1}$  correspondiente los grupos  $\text{COO}^-$  de la fracción de carbohidratos del extracto de soja, la banda a  $1236\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos OH en los anillos fenólicos de las isoflavonas y finalmente las bandas a  $1110$  y  $1040\text{ cm}^{-1}$  correspondientes respectivamente a las extensiones de los enlaces C-O y C-O-C [24].



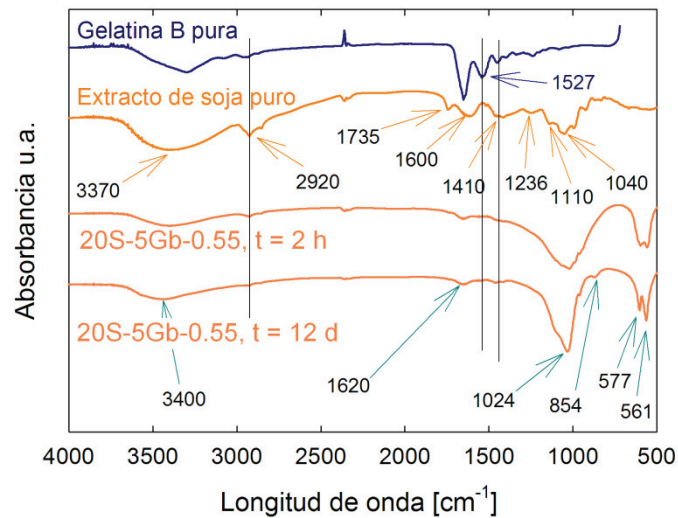


Figura 5.31: Espectros IR de absorbanza correspondientes a la gelatina bovina tipo B, el extracto de soja y a la espuma 20S-5Gb-0.55 después de 2 horas y 12 días de reacción por inmersión en disolución de Ringer a 37 °C.

La gelatina y el extracto de soja se distinguen fácilmente a través de las bandas de soja situadas a 1110 y 1040  $\text{cm}^{-1}$ , sin embargo, ambas se superponen a las bandas correspondientes a los fosfatos en la CDHA. Otra diferencia entre el extracto de soja y la gelatina es la banda de la amina II de la gelatina situada a 1527  $\text{cm}^{-1}$ , la cual no se superpone al espectro de la CDHA. No obstante, debido al bajo contenido de gelatina (2.27 % en peso), la banda de la amina II es inapreciable en la espuma 20S-5Gb-0.55, incluso en la sumergida únicamente durante 2 horas.

Por otro lado, las bandas situadas a 2920 y 1410  $\text{cm}^{-1}$  tampoco se superponen con las bandas de la CDHA, pero también son comunes para la gelatina y la soja. Esta se presenta como pequeñas protuberancias en los espectros de la espuma 20S-5Gb-0.55, por lo que se puede concluir que aún después de 12 días de inmersión cierta cantidad de los biopolímeros se mantiene dentro del material. Sin embargo, es difícil señalar si se trata de la gelatina, el extracto de soja o la mezcla de ambos. Además, los espectros de la espuma 20S-5Gb-0.55 muestran que reaccionan para formar CDHA, puesto que tienen todas las bandas características de este compuesto.

#### 5.4.6.5 Evolución de las propiedades mecánicas

Para finalizar el estudio de la cinética de reacción en Ringer, las figuras 5.32 y 5.33 muestran respectivamente la resistencia a la compresión y el módulo elástico a compresión de los cementos en función del tiempo de reacción. Puede observarse que ambas propiedades se incrementan conforme se lleva a cabo la hidrólisis, reflejo del incremento en número y en tamaño de los cristales precipitados que se autoensablan para crear una estructura de placas entrecruzadas (ver figura 5.26), de tal forma que cuanto mayor es el entrecruzamiento mayor es la resistencia.

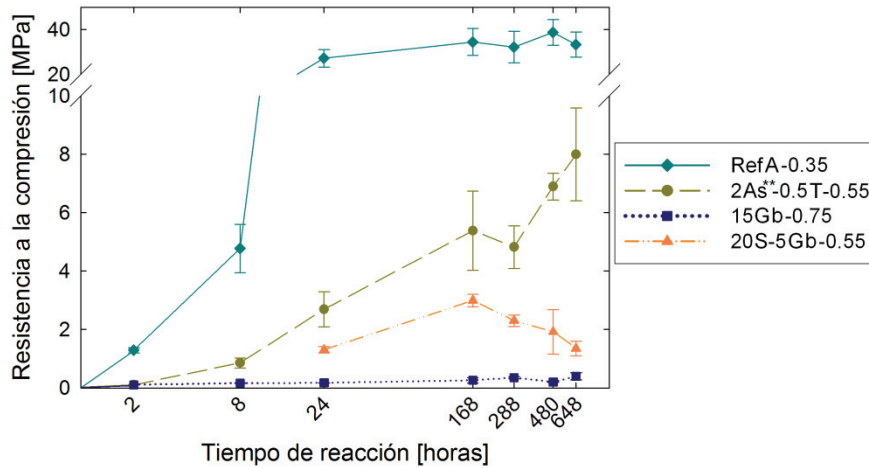


Figura 5.32: Resistencia a la compresión en función del tiempo de reacción por inmersión en solución de Ringer a 37 °C.

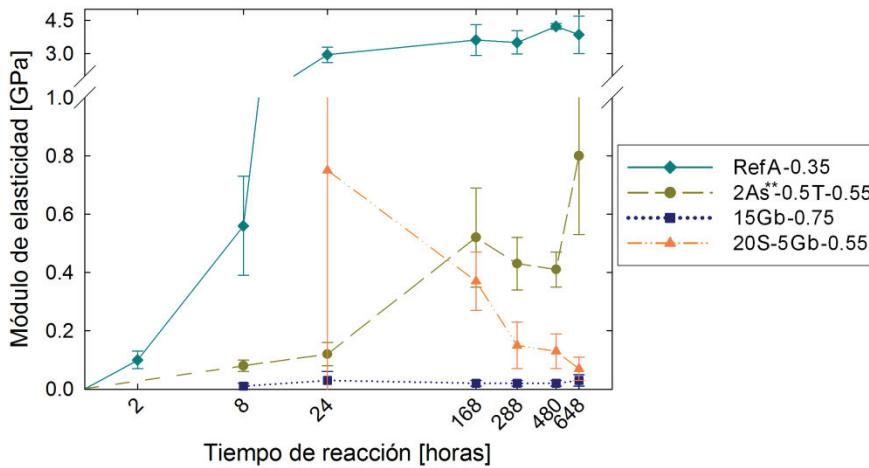


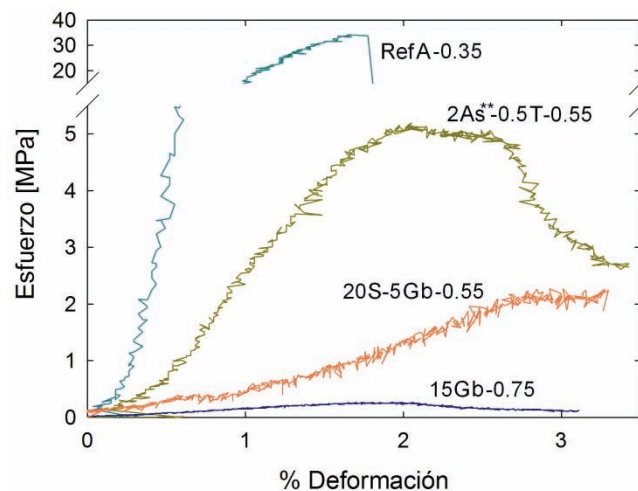
Figura 5.33: Módulo de elasticidad a compresión en función del tiempo de reacción por inmersión en solución de Ringer a 37 °C.

En las figuras anteriores se observa que el cemento de referencia (RefA-0.35) es el más rígido y resistente, lo cual se explica porque es el menos poroso, preparado con la proporción L/P más baja y no fue espumado. El incremento de la resistencia a la compresión y del módulo sigue una paridad con el avance del porcentaje de reacción. Durante las primeras 24 horas la referencia ya casi ha alcanzado el máximo de resistencia para finalmente a 288 horas (12 días) lograr el máximo de 35 MPa. Puede observarse que el rápido incremento de resistencia entre 0 y 24 horas concuerda con el intervalo de mayor transformación, y que el menor incremento después de 24 horas también coincide con el letargo de la cinética de fraguado (ver figura 5.23).

Por otro lado, las espumas 2As\*-0.5T-0.55 y 20S-5Gb-0.55 fueron preparadas bajo la misma proporción L/P = 0.55 ml/g, sin embargo, ambos tienen resistencias y módulos diferentes; la razón es la macroporosidad introducida. Como se observa en la tabla 5.20 la espuma 20S-5Gb-0.55 incorpora mayor volumen de porosidad, por tanto, la resistencia es menor en comparación con la espuma 2As\*-0.5T-0.55 que no es tan macroporosa.

La resistencia a la compresión y el módulo, al igual que la conversión a CDHA de la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 se incrementa casi constantemente hasta las 648 horas de reacción, sin embargo, estadísticamente el máximo de resistencia a la compresión (5.5 MPa) ya se ha alcanzado desde 168 horas (7 días). En cuanto a la espuma 20S-5Gb-0.55, la resistencia también alcanza su máximo (3 MPa) al tiempo de 168 horas, no obstante, a tiempos mayores se observa la caída de resistencia para finalmente soportar 1.3 MPa. Algo similar sucede con el módulo elástico de esta espuma, alcanzando el máximo a 24 horas y cayendo prácticamente hasta cero a las 648 horas. La caída puede estar relacionada con la liberación del extracto de soja y de la gelatina, ya que este es un proceso de degradación del material que incrementa la porosidad. Por otro lado, cabe mencionar que las propiedades mecánicas de la espuma 20S-5Gb-0.55, no fueron cuantificadas a tiempos menores de 24 horas debido a la lenta cinética de fraguado, que impidió el crecimiento de cristales como para endurecer la pasta (ver figura 5.25).

Los valores más bajos de resistencia a la compresión y de módulo elástico corresponden a la espuma 15Gb-0.75, la cual pareciera que no endurece con el transcurso del tiempo. No obstante, por los resultados de difracción de rayos X y de IR se sabe que reacciona. La baja resistencia mecánica de esta espuma se asocia a factores como: 1) el gran volumen de macroporosidad, 2) la elevada proporción L/P de fabricación y 3) la liberación de la gelatina hacia el medio de fraguado. La máxima resistencia alcanzada por la espuma 15Gb-0.75 fue de 0.35 MPa a las 288 horas (12 días) de reacción.



*Figura 5.34: Curvas esfuerzo-deformación a compresión para las diferentes formulaciones de espumas y el cemento de referencia fraguados durante 12 días por inmersión en Ringer a 37 °C. Nótese como la incorporación de los biopolímeros disminuye la rigidez e incrementa la deformación a la fractura del material.*

Finalmente, la figura 5.34 muestra una curva típica esfuerzo/deformación del ensayo de compresión para cada cemento fraguado durante 12 días. Nuevamente se aprecia que la referencia es el cemento más rígido y resistente, sin embargo, no es macroporoso. Le sigue la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55, con un módulo elástico de 4.5 GPa y menor resistencia debido a la macroporosidad introducida. Finalmente, con módulos aún más bajos, se encuentran las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55, mostrando valores respectivamente de 0.03 y 0.15 GPa.

No obstante, lo más importante a destacar de la figura 5.34 es que la incorporación de los biopolímeros disminuye la rigidez del cemento e incrementa la deformación a la fractura del material, tornándolo mecánicamente más similar al tejido óseo, en otras palabras, se prueba que la incorporación de los biopolímeros en las espumas sirve para más que para espumar la fase líquida y brindar cohesión e inyectabilidad a las pastas.

En resumen, todas las espumas compuestas estudiadas reaccionan para formar CDHA de baja cristalinidad y con tamaños de cristal de orden nanométrico. Esta característica en conjunto con la incorporación de los biopolímeros produce espumas compuestas menos rígidas y más deformables que el cemento sólo, de forma similar a como el colágeno incrementa la tenacidad del tejido óseo natural.

El avance en la conversión a CDHA, la evolución de la superficie específica y de las propiedades mecánicas siguen un comportamiento paralelo a lo largo de la reacción de hidrólisis o de endurecimiento del cemento, alcanzando cerca del 50 % del valor máximo a tiempos entre 8 y 24 horas de reacción, para finalmente obtener el máximo de cada parámetro a 12 días de reacción.

La resistencia a compresión de las espumas compuestas es relativamente baja y varía entre formulaciones, principalmente por las diferencias en macroporosidad. La resistencia mecánica que alcanzan las espumas de HA es adecuada sólo para la regeneración de lesiones óseas que no estén sometidas a carga. En el caso de lesiones sometidas a esfuerzos, se podrían implantar junto con algún soporte mecánico, como tornillos, placas o celdas vertebrales metálicas.

Por otro lado, la resistencia mecánica de las espumas con mayor contenido de materia orgánica (15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55) disminuyó después de alcanzar el valor máximo, probablemente a causa de la liberación de la materia orgánica hacia el medio de fraguado, lo que genera mayor porosidad.

#### **5.4.7 Fraguado de las espumas en medio de cultivo**

La figura 5.35 muestra los difractogramas correspondientes a las espumas compuestas fraguadas durante 24 horas por inmersión en Ringer o en medio de cultivo MEM. Se observa claramente que el descenso de intensidad de los picos correspondientes al reactivo es menor en aquellas muestras fraguadas en medio de cultivo. Resultado que se confirma cuantitativamente al calcular y comparar el porcentaje de avance de la reacción entre cada espuma y condición de fraguado, resultado mostrado también en la figura 5.35. Probablemente el retraso en el avance de la reacción en un medio de mayor similitud a los fluidos fisiológicos se deba a la adsorción de proteínas del medio de cultivo sobre el cemento, la cual genera una barrera que retarda la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP.

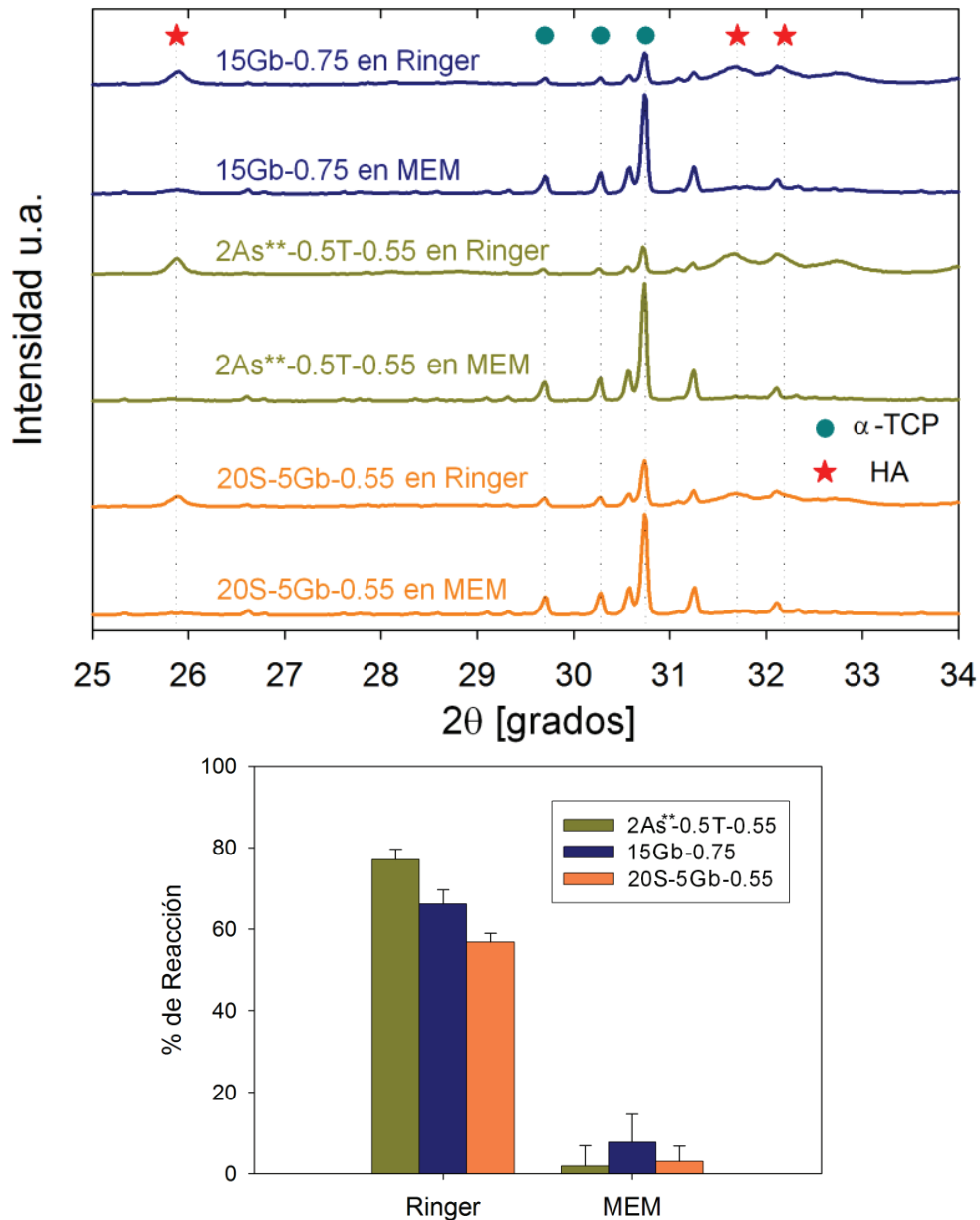


Figura 5.35: Arriba: diagramas de DRX de las diferentes espumas compuestas, fraguadas por inmersión en Ringer o en medio de cultivo MEM a 37 °C durante 24 horas. Abajo: comparación del avance de la reacción entre ambas condiciones de inmersión.

En base a este resultado se recomienda prefraguar a las espumas sumergiéndolas en agua o disolución de Ringer antes de proceder al cultivo de células sobre ellos. Por otro lado, es factible que los cementos compuestos reaccionen con mayor lentitud al ser implantados *in vivo*, lo cual no significa que no sean capaces de autoconsolidarse con el paso del tiempo.

#### 5.4.8 Formulaciones de cemento con gelatina porcina

Por último, la tabla 5.23 muestra el porcentaje de reacción, la superficie específica, la resistencia a la compresión y la porosidad total de las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55, fabricadas con gelatina bovina y gelatina porcina, ambas tipo B y Bloom de 250, fraguados durante diversos intervalos de tiempo por inmersión en Ringer.



Tabla 5.23: Diferencias en las propiedades de las espumas al sustituir la gelatina de origen bovino por gelatina de origen porcino, ambas tipo B y Bloom de 250.

Compuesto Origen de la gelatina	15Gb – 0.75		20S – 5Gb – 0.55		Tiempo de reacción [días]
	Bovino	Porcino	Bovino	Porcino	
% de reacción	66.08 ± 3.54	66.38 ± 3.23	56.84 ± 2.18	28.56 ± 3.06	1
	85.97 ± 3.71	84.78 ± 3.69	88.44 ± 3.55	53.36 ± 3.17	7
Superficie específica [m <sup>2</sup> /g]	5.07 ± 0.04	7.76 ± 0.08	19.06 ± 0.15	14.10 ± 0.13	1
	7.47 ± 0.06	7.15 ± 0.07	17.91 ± 0.14	14.32 ± 0.35	7
resistencia a la compresión [MPa]	0.17 ± 0.01	0.07 ± 0.01	1.31 ± 0.11	1.20 ± 0.10	1
	0.26 ± 0.09	0.08 ± 0.03	2.99 ± 0.21	2.04 ± 0.19	7
% de porosidad total	59.13	58.44	62.37	49.06	12

Para la espuma 15Gb-0.75, a excepción de la resistencia a la compresión, las propiedades del cemento se mantienen relativamente constantes al utilizar uno u otro origen de la gelatina. Sin embargo, la disminución de resistencia mecánica al utilizar gelatina de origen porcino compromete sustancialmente la integridad del material, incluso durante la manipulación *in vitro*. Una posible causa para la menor resistencia de la espuma es que probablemente la gelatina porcina se libera más rápidamente que la gelatina bovina.

Por otro lado, al sustituir la gelatina de bovino en la espuma 20S-5Gb-0.55, todos los parámetros disminuyen considerablemente de magnitud, probablemente el hecho que la gelatina de porcino atrase la reacción de fraguado del compuesto sea la causa de la menor superficie y resistencia mecánica. Aún más contraproducente es el descenso en porosidad al sustituir la gelatina de bovino, por lo que no se recomienda el empleo de gelatina de porcino en esta formulación.

Cabe mencionar que esta comparación se realizó para determinar la posibilidad de reemplazar la gelatina bovina por la porcina, debido a la remota posibilidad de transmisión de la encefalopatía espongiiforme bovina. Sin embargo, debido a que los resultados no muestran ventajas al sustituir el origen de la gelatina, y por el contrario el empleo de gelatina porcina genera algunas desventajas, se decidió continuar la caracterización preclínica fabricando las espumas con gelatina bovina tipo B.

Es importante remarcar que la gelatina bovina de grado farmacéutico esta aprobada para uso en humanos y los productores siguen controles sanitarios más rigurosos para garantizar la calidad del producto [25,26]. Además, la gelatina tipo B, extraída mediante un proceso alcalino, tiene menos posibilidades de transferir la encefalopatía espongiiforme bovina que la gelatina tipo A extraída en medio ácido [27].

## 5.5 Conclusiones

Las conclusiones más relevantes del desarrollo, selección y caracterización de las espumas de HA obtenidas con polímeros naturales se pueden dividir en los siguientes bloques.

### Los agentes espumantes multifuncionales:

- La gelatina bovina tipo B es un espumante natural que a 55 °C genera espumas con adecuada espumabilidad para fabricar cementos macroporosos. Además, brinda cohesión a las pastas espumadas hasta con proporciones L/P de 0.75 ml/g.
- El alginato de sodio no es un espumante natural, pese a ello, la incorporación de 0.5 % w/v de Tween 80 en la disolución permite obtener espumas adecuadas para obtener cementos macroporosos, si y sólo si, la concentración de alginato de alto peso molecular no supera el 2 % w/v. Sin embargo, en esta concentración el alginato no brinda cohesión a las espumas obtenidas con proporciones L/P mayores a 0.55 ml/g.
- El extracto de soja es un espumante natural que permite fabricar cementos macroporosos. No obstante, debido al efecto fluidificante de la pasta del cemento, las pastas espumadas únicamente con extracto de soja no tienen cohesión. La mezcla del extracto de soja con gelatina bovina tipo B incrementa la cohesión de la pasta espumada. Además, el espumado de la mezcla 20S-5Gb genera espumas de HA con mayor porosidad en comparación con espumar únicamente el extracto de soja.

### El proceso de espumado de la fase líquida:

- Para este método de obtención de cementos macroporosos, la espumabilidad de la fase líquida es un factor más significativo que la estabilidad de la espuma obtenida. No obstante, se requiere de una mínima estabilidad de la espuma líquida para poder mezclarla con el polvo de cemento sin romper las burbujas.
- La viscosidad en exceso del líquido dificulta el espumado e incrementa la estabilidad de la espuma, pudiendo llegar a impedir la formación de uniones entre macroporos cuando se mezcla con el polvo del cemento.

### Las espumas de CDHA compuestas con biopolímeros:

- La incorporación y el aumento de la macroporosidad disminuyen la cohesión de las pastas de cemento. Para mejorar la cohesión de las pastas espumadas puede reducirse la proporción L/P de mezclado.
- Las pastas espumadas que presentan cohesión (autofraguables *in situ*) son capaces de adherirse a las paredes de la cavidad donde son inyectadas y por tanto permanecen en el sitio deseado sin desintegrarse.
- El moldeo por espátula y la mayor proporción L/P empleada para fabricar las espumas prefraguadas permite obtener andamios con mayor macroporosidad abierta y de mayor tamaño. No obstante, el tamaño de la macroporosidad abierta está ligeramente por debajo al requerido para regenerar al tejido óseo.

*Estudio cinético de las espumas autofraguables in situ:*

- La incorporación de la gelatina bovina tipo B, el alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular o la mezcla de extracto de soja con gelatina bovina tipo B, no detienen la reacción de hidrólisis del  $\alpha$ -TCP. El máximo de transformación se alcanza después de 12 días, cuando la composición corresponde prácticamente a CDHA.
- El fraguado de las espumas en medio de cultivo celular retrasó la reacción de hidrólisis del  $\alpha$ -TCP, es probable que la adsorción de proteínas sea la causa del retraso.
- Los resultados de espectroscopia de infrarrojos mostraron que los biopolímeros se liberan hacia el medio de reacción durante el endurecimiento. No obstante, hay indicios de que después de 12 días de reacción las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5%Gb-0.55 conservan cierta cantidad de fase orgánica.
- La resistencia mecánica alcanzada por las espumas autofraguables *in situ* limita su empleo al tratamiento de lesiones óseas que no estén sometidas a esfuerzos.

## 5.6 Agradecimientos

Agradezco al Grupo de Química de Polímeros y Biomateriales de la Universidad de Ghent – Bélgica por la ayuda en la interpretación de los espectros de IR.

## 5.7 Referencias

1. Chollet C., Chanseau C., Remy M. et al. The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials* 2009; **30**: 711-720.
2. Morris C., Thorpe J., Ambrosio L., Santin M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *Journal of Nutrition* 2006; **136**: 1166-1170.
3. Santin M., Morris C., Standen G., Nicolais L., Ambrosio L. A new class of bioactive and biodegradable soybean-based bone fillers. *Biomacromolecules* 2007; **8**: 2706-2711.
4. Franz G., Alban S. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* 1995; **17**: 311-314.
5. Studart A.R., Gonzenbach U.T., Tervoort E., Gauckler L.J. Processing routes to macroporous ceramics: a review. *Journal of the American Ceramic Society* 2006; **89**: 1771-1789.
6. Djagny K.B., Wang Z., Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2001; **41**: 481-492.

7. Cole B. Gelatine. <http://www.gelatin.co.za/>. 2009.
8. Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; **31**: 267-285.
9. Bohner M. Calcium phosphate emulsions. *Key Eng Mater* 2001; **765-768**: 192-195.
10. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement through the use of mannitol crystals. *Key Eng Mater* 200; **773-776**: 192-195.
11. del Real R.P., Wolke J.G.C., Vallet-Regi M., Jansen J.A. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; **23**: 3673-3680.
12. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C., Mikos A.G., Jansen J.A. Injectable PLGA microsphere/calcium phosphate cements: physical properties and degradation characteristics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2006; **17**: 1057-1074.
13. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C., Mikos A.G., Jansen J.A. Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: An in vitro degradation study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009; **91**: 555-561.
14. Bohner M., van Lenthe G.H., Grünenfelder S., Hirsiger W., Evison R., Müller R. Synthesis and characterization of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 2005; **26**: 6099-6105.
15. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* 2006; **113**: 102-110.
16. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* 2006; **27**: 2171-2177.
17. Durucan C., Brown P.W. Kinetic model for alpha-tricalcium phosphate hydrolysis. *Journal of the American Ceramic Society* 2002; **85**: 2013-2018.
18. Durucan C., Brown P.W. alpha-Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2000; **11**: 365-371.
19. Ginebra, M.P. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. *Universitat Politècnica de Catalunya*, 1996.
20. Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Bermúdez O., Driessens F.C.M., Planell J.A. Common ion effect on some calcium phosphate cements. *Clin Mater* 1994; **16**: 99-103.
21. Bigi A., Bracci B., Panzavolta S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2004; **25**: 2893-2899.
22. Bigi A., Cantelli S., Panzavolta S., Rubini K.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate-gelatine composite cements. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2004; **2**: 81-87.

23. Kevor S., Huisen T., Brown P.W. The formation of hydroxyapatite-gelatin composites at 38°C. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; **28**: 27-33.
24. Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., Herrera A., Martínez R. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Barcelona: Masson, 2004.
25. Department of health and human services. Use of materials derived from cattle in medical products intended for use in humans and drugs intended for use in ruminants. Food and Drug Administration. 21 CFR Parts 211, 226, 300, 500, 530, 600, 895, and 1271. 2007.
26. Gelatine Manufacturers of Europe. <http://www.gelatine.org/es/index.html>. 2008.
27. Taylor D.M. Inactivation of TSE agents: safety of blood and blood-derived products. *Transfusion Clinique et Biologique* 2003; **10**: 23-25.

# Capítulo 6: Caracterización preclínica de las espumas de hidroxiapatita autofraguables *in situ*.

---

## 6.1 Introducción

La salida al mercado de un producto biomédico es un proceso lento en el que la mayoría de los desarrollos no cumplen con todos los requerimientos de la aplicación para la que fueron diseñados. Se sabe que de cada cien proyectos de investigación básica sólo uno llega a colocar en el mercado el producto médico o terapéutico [1]. Los estudios preclínicos y clínicos junto con la modelización computacional son las herramientas que permiten discriminar qué productos son aptos para salir al mercado, por tanto las condiciones de ensayo en cada estudio realizado son fundamentales para tomar una buena decisión. Por un lado, no es admisible ofrecer un producto que no cumpla al 100 % con la función deseada, o que pueda producir daños a corto o largo plazo, y por otro lado, tampoco es permisible descartar un producto eficaz por un mal diseño experimental.

En el presente capítulo se hace una primera aproximación a la caracterización preclínica de las espumas de hidroxiapatita (HA) consideradas como inyectables y autofraguables *in situ*. Se estudia la interacción con células óseas, y se implantan en un modelo animal básico para determinar la eficacia en la regeneración ósea.

Por un lado, mediante la caracterización *in vitro* se estudió la adhesión, la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas sobre las espumas de HA, y se observaron las interacciones de las espumas con el medio de cultivo.

Por otro lado, el estudio *in vivo* reportado en este capítulo no es un trabajo concluyente sobre la factibilidad de uso clínico en humanos de las espumas de HA, pero sí es la base para el diseño de futuros estudios *in vivo* en modelos animales más desarrollados que permitan tomar dicha decisión.

En este sentido cabe mencionar que no es objetivo de esta tesis analizar a profundidad la regeneración ósea asistida por las espumas en el modelo animal empleado, sino que, en el marco del proyecto europeo en el que se desarrolló, la aportación del presente capítulo fue apoyar al equipo encargado del estudio *in vivo* para obtener los mejores resultados. Sin embargo, para mostrar cualitativamente que las espumas de HA desarrolladas son aptas para la regeneración de lesiones óseas, en el presente capítulo se reportan brevemente algunos resultados del estudio *in vivo*. Los resultados completos, el análisis y las conclusiones detalladas de la implantación pueden encontrarse en la tesis doctoral de Melanie Göckelmann (Universidad de Ulm).



## 6.2 Marco teórico

### 6.2.1 Métodos de esterilización

La esterilización es una etapa del proceso de fabricación de los biomateriales, cuyo objetivo es liberar al material o instrumental de microorganismos patógenos tales como bacterias, virus, gérmenes u hongos. Se considera que un material es estéril cuando la probabilidad de encontrar un solo organismo viable es menor a  $10^{-6}$  [2].

La correcta selección de un método de esterilización es crucial para no modificar las propiedades de los materiales a estudiar. Dependiendo de la naturaleza química del material, la técnica empleada interaccionara en mayor o menor medida con la superficie o la estructura [3]. Para minimizar dichas interacciones o modificaciones, la esterilización puede realizarse sobre las materias primas con las que se fabricará el implante o bien sobre el producto final a implantar de acuerdo a las necesidades de cada proceso y aplicación. Por otro lado, no debe confundirse el proceso de esterilización con los métodos de asepsia tales como el empleo de, alcohol, soluciones de yodo, peróxido de hidrogeno, soluciones de hipoclorito, entre otros; los cuales sólo garantizan cierta limpieza del material o instrumental pero no la eliminación de los microorganismos [4].

Los métodos más comunes de esterilización son el óxido de etileno (EtO), la radiación gamma, métodos por calor, métodos químicos, plasma y otros gases (peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro u ozono) [2,4-8]. En la tabla 6.1 se lista las ventajas y desventajas de los tres métodos industriales más importantes y los tipos de materiales para los que se aconseja el empleo de cada uno de ellos.

*Esterilización del polvo de cemento:* Las cerámicas son materiales estables que pueden esterilizarse fácilmente por autoclave o radiación gamma. Sin embargo, algunas cerámicas como el zirconio se degradan con la humedad por lo que se debe ser precavido en la selección del método más adecuado. Se sabe que la esterilización por calor seco no afecta las propiedades de las apatitas sinterizadas a alta temperatura [9], incluso las apatitas deficientes en calcio pueden ser esterilizadas por autoclave sin que sufran alteraciones [10]. Por el contrario, debido a la reactividad con agua de la fase sólida de los cementos en base a fosfatos de calcio, la esterilización por vapor no es la mejor opción. Además, se ha reportado que la esterilización de la fase sólida a través de óxido de etileno, calor seco o radiación gamma trae como consecuencia el retraso del fraguado y la disminución de la resistencia mecánica de un cemento en base a fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido [9]. En el mismo trabajo se reporta que cuanto mayor es la dosis de radiación gamma mayores son los cambios en las propiedades, sin embargo, no se determinaron cambios en la composición de los componentes antes y después de la esterilización. Finalmente, se menciona que entre los métodos citados la radiación gamma bajo una dosis de 20-25 KGy es la mejor opción para esterilizar el polvo de cemento sin producir cambios estadísticamente significativos en las propiedades [9].

Tabla 6.1: Ventajas, desventajas e indicaciones de los métodos más comunes de esterilización industrial y hospitalaria [2,4-8].

Método	Ventajas	Desventajas	Indicaciones	Materiales
<b>Calor húmedo</b>	Rápido calentamiento y penetración. Destrucción en corto tiempo de bacterias y esporas. No deja residuos tóxicos. Económico.	No permite esterilizar soluciones acuosas. Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos. Esta limitado a materiales resistentes al calor. El calor provoca la desnaturalización de proteínas.	Tiempo de exposición: 20 a 30 minutos. Temperatura: 120 - 133 °C a 1 atm de presión.	Instrumental de vidrio, instrumental metálico resistente a la oxidación, telas, polímeros termoestables.
<b>Óxido de etileno</b>	Baja temperatura de exposición. Compatible con muchos materiales polímeros. Compatible con metales, cerámicas y dispositivos electrónicos.	Los residuos pueden ser tóxicos; requiere aireación. Valorar la corrosión de metales y componentes electrónicos. Materiales porosos pueden retener residuos de EtO.	Concentración de gas: 400 mg/l. Temperatura de exposición: 52 - 55 °C. Humedad ambiental de la cámara: > 30 % (ideal en torno al 50 %). Tiempo de exposición: 3 - 6 horas.	Gomas, plásticos, caucho (guantes y sondas), instrumental óptico, material fotográfico, equipos eléctricos, suturas, antibióticos.
<b>Radiación gamma</b>	No deja residuos. Efectos insignificantes en propiedades de superficie. Compatible con muchos materiales polímeros. Compatible con cerámicas y metales.	Es un sistema caro. Se necesitan medidas de protección para el personal que utiliza los aparatos. No es compatible con componentes electrónicos activos (semiconductores). Debe tenerse precaución con el desprendimiento de recubrimientos por calentamiento.	Origen más común de la radiación gamma industrial: Co <sup>60</sup> . Dosis de entre 3 y 100 KGy.	Esta indicado en materiales termo sensibles, (gomas, polietileno), tejidos humanos y animales, materiales quirúrgicos y farmacéuticos.

Esterilización de los biopolímeros: La esterilización de los polímeros es un tema más complicado debido a que son fáciles de degradar o de modificar estructuralmente. Por ejemplo, es sabido que la radiación gamma puede producir la formación de radicales libres, así como la degradación o el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas [5].

Tanto la gelatina, como el alginato y la soja son biopolímeros que se esterilizan comúnmente en la industria alimentaria mediante radiación gamma. Sin embargo, no existe un consenso generalizado de ser la mejor opción. Algunos trabajos reportan que no hay cambios significativos en la apariencia o en la composición de estos biopolímeros al ser irradiados en estado sólido [11,12], sin embargo, la viscosidad de las disoluciones disminuye cuanto mayor es la dosis de radiación [13-16], lo cual se asocia con la ruptura de las cadenas por la energía de la radiación, generando fragmentos de menor peso molecular [14]. Además, para la gelatina se reporta que la radiación gamma disminuye el poder de gelificado [11]. Por otro lado, la caída de la viscosidad de las disoluciones de biopolímeros y el poder gelificante no significan un inconveniente para el proceso de fabricación de cementos macroporosos a través del método de espumado de la fase líquida, sino que por el contrario, de acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo 5 de esta memoria podría incrementar el volumen de macroporosidad abierta.

Para esterilizar a la gelatina, manteniendo inalteradas las propiedades, se recomienda emplear la radiación gamma en dosis entre 3 y 5 KGy [11]. Por otra parte, para el alginato se recomiendan dosis entre 8 y 12 KGy [14,17], mientras que para los concentrados de soja se recomiendan dosis mayores a 10 KGy para garantizar la esterilización [15].

Finalmente, los organismos reguladores [7] sugieren, siempre que sea factible, realizar la esterilización por radiación gamma de gran volumen de paquetes cuyo contenido es de un solo uso [4].

### 6.2.2 Evaluación *in vitro* a través de cultivos celulares

Los estudios *in vitro* se definen como el uso de células o componentes celulares extraídos de tejidos humanos o animales, aislados y mantenidos en medio acuoso fuera de un organismo vivo [18]. Los métodos de cultivo *in vitro* han sido una pieza clave en el desarrollo de las ciencias biomédicas, siendo en estos días una herramienta científica para valorar respuestas celulares específicas sin la influencia de otros sistemas [19]. Una de las principales ventajas de los estudios *in vitro* es reducir el número de animales de experimentación, minimizando costos de investigación y desarrollo [20-22]. No obstante, los resultados de los estudios *in vitro* pueden ser difíciles de extrapolar a la situación *in vivo*, sin embargo, son más reproducibles, cuantificables y fáciles de estandarizar [22,23]. También son útiles para seleccionar nuevos materiales en base a la compatibilidad y la liberación de productos potencialmente peligrosos remanentes del proceso de manufactura. Los estudios *in vitro* son el primer paso para evaluar la toxicidad aguda, la citocompatibilidad, la genotoxicidad, la proliferación y la diferenciación celular de o sobre un material.

Las limitaciones de los cultivos celulares son: 1) no son capaces de demostrar la respuesta tisular frente a los materiales, sino sólo de líneas celulares individuales o células primarias, 2) la respuesta celular puede variar entre líneas celulares y el número de pases del cultivo, y 3) los ensayos pueden sobrestimar el nivel de toxicidad del material y están limitados a estudios de toxicidad aguda debido a la corta vida media de las células cultivadas [18,22].

#### 6.2.2.1 Ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación celular

Las células que componen al tejido óseo se dividen en células formadoras de hueso (osteoblastos y osteocitos) y células que reabsorben el mineral óseo (osteoclastos) [24-26]. Razón por la cual los materiales diseñados para promover o soportar los procesos de regeneración ósea se prueban *in vitro* en contacto con líneas celulares de tipo osteoblástico. Es importante señalar que el aislamiento de osteocitos es un proceso difícil y actualmente en estudio, por lo que no se reportan trabajos de compatibilidad de materiales con este tipo de células [27]. Por otro lado, la reabsorción activa, es decir, la reabsorción del implante por la acción celular directa, es un tema importante para los sustratos biodegradables. Sin embargo, en este trabajo no se planteó la evaluación de la interacción de los cementos compuestos macroporosos con células osteoclasticas [26,28].

Algunos de los ensayos básicos *in vitro* para estudiar las interacciones celulares con el biomaterial son la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular, sin embargo, existen ensayos que evalúan más a profundidad la interacción de las células con los materiales [19,22]. Es sabido que bajo condiciones normales las células osteoblásticas se multiplican exponencialmente con el paso del tiempo de cultivo, por lo que el ensayo de adhesión y proliferación evalúa el número de células adheridas a la superficie del material bajo investigación [19]. Por otro lado, en términos estrictos, el ensayo de diferenciación evalúa el cambio en el fenotipo celular (por ejemplo la evolución de la célula estromal a osteoblasto). No obstante, el término diferenciación en células osteoblásticas también se aplica a la determinación de señales de mineralización temprana (como la generación de fosfatasa alcalina; ALP) o mineralización tardía (como la producción de osteocalcina) [29].

#### 6.2.2.2 Diferentes líneas celulares: células osteoblásticas Saos-2

Las líneas celulares consisten en subcultivos de un cultivo primario celular (células inicialmente extraídas del tejido u órgano), en el que las células reproducidas mantienen el linaje de las células originales. Además, si las células no sufren alteraciones al realizarse “n” cantidad de subcultivos se les denomina líneas celulares inmortales o continuas [19]. La ventaja de emplear líneas celulares en la investigación *in vitro* es que las células de una misma línea se comportan de manera similar y por tanto la reproducibilidad de los ensayos se incrementa notablemente.

Existe gran cantidad de líneas osteoblásticas continuas, la mayoría procedentes de osteosarcoma. No obstante, en este trabajo sólo se utilizara la línea Saos-2 [30,31], la cual fue extraída de osteosarcoma de fémur humana caucásica de 11 años de edad. Estas células son adherentes, de morfología epitelial [32] y puesto que provienen de un tumor desarrollado, tienden a diferenciar rápidamente.

Una ventaja adicional de las células procedentes de osteosarcoma es que son células resistentes que se reproducen con facilidad, por lo que no se tienen limitaciones en el número de células para realizar los experimentos.

### 6.2.3 Modelos animales para la evaluación de la biocompatibilidad y la osteointegración

Los estudios *in vivo* en modelos animales son el paso siguiente a los estudios *in vitro* durante el desarrollo de un dispositivo biomédico o farmacéutico. Pese a ello existe gran controversia sobre el uso de animales de laboratorio. No obstante, es más cuestionable la experimentación en humanos, por lo que bajo las condiciones adecuadas el empleo de animales para la investigación está aprobado [33]. El empleo de animales de laboratorio como modelos humanos se basa en que: 1) ambos controlan la bioquímica interna por liberación de hormonas endocrinas que son esencialmente las mismas en todas las especies, 2) ambos envían transmisores químicos similares para las células nerviosas en el sistema nervioso central y periférico, y 3) ambos reaccionan de la misma forma ante la infección y el daño tisular.

Un animal de laboratorio se puede definir como cualquier especie no humana del reino animal que se mantiene en cautiverio para la observación o experimentación. Los animales de laboratorio abarcan gran variedad de órdenes, desde crustáceos hasta mamíferos, y de especies domésticas y salvajes [34]. En investigación ortopédica, los modelos animales permiten evaluar a los posibles materiales de tratamiento bajo condiciones de carga o sin carga, a periodos largos de tiempo, en diferentes edades, calidades y tipos de tejido. Además, durante los estudios *in vivo* no solo se estudia la respuesta de los órganos o tejidos en la vecindad del implante, sino que se puede estudiar la interacción de los productos de degradación o desgaste con los órganos y tejidos distantes [35]. A pesar de que los modelos animales son excelentes aproximaciones a las condiciones mecánicas o fisiológicas humanas, ninguna especie cubre todas las características de la anatomía y fisiología humana, sin embargo, cada especie tiene ventajas y desventajas de acuerdo a la investigación específica a desarrollar [35].

El conejo es la especie más usada en investigación [34], representando el 35 % de la investigación musculoesquelética *in vivo*. Probablemente la razón del elevado uso del conejo sea su fácil manejo y alojamiento, sin embargo, es la especie menos semejante con el sistema óseo humano. El cerdo es la especie con el esqueleto más similar al humano, no obstante por el tamaño y la dificultad en su manejo no es extensamente empleado. Por otro lado, la cabra y la oveja son especies más dóciles, ambas con esqueletos macroestructural y mecánicamente parecidos a los humanos [35]. Un resumen de las semejanzas con el sistema esquelético humano de las especies más empleadas en investigación musculoesquelética se presenta en la tabla 6.2.

Tabla 6.2: Resumen de semejanzas óseas entre especies de laboratorio y el humano [35].

	Canino	Cabra/oveja	Cerdo	Conejo
<b>Macroestructura</b>	++	+++	++	+
<b>Microestructura</b>	++	+	++	+
<b>Composición ósea</b>	+++	++	+++	++
<b>Remodelación ósea</b>	++	++	+++	+

+: poco similar; ++: moderadamente similar; +++: gran similitud.

### 6.2.3.1 Anatomía del conejo: el esqueleto

Los conejos de nombre científico *oryctolagus cuniculus* son animales mamíferos de la familia de los lepóridos (el labio superior está dividido a la mitad). En estado salvaje viven en grupos dentro de refugios subterráneos. Su pelo es sedoso y suave al tacto, el color del iris de su ojo es café oscuro o pardo, tienen tres tipos de pelaje: de protección primaria, protección secundaria y fibras pilosas. De adultos pesan de 2 a 6 Kg, llegando a medir hasta 45 cm de largo. Tienen entre 26 y 28 dientes que crecen continuamente (10 a 12 cm en la vida de un conejo). El sistema óseo del conejo es muy frágil, y representa solo el 8 % del peso total corporal. Los huesos largos y la espina lumbar están cubiertas por una gran cantidad de músculo, y son susceptibles a fracturas; un esquema del esqueleto del conejo se muestra en la figura 6.1. La esperanza de vida media de los conejos es de 6 a 8 años, alcanzando las razas pequeñas la madurez sexual entre 3 y 4 meses, y las razas grandes entre 8 y 9 meses de edad [36].

El conejo tiene un metabolismo más rápido que el humano por lo que los resultados de remodelación ósea *in vivo* no son directamente extrapolables. No obstante, esta característica acorta los tiempos de implantación. Por otro lado, debido a las diferencias en peso y modo de desplazamiento, la forma, el tamaño y la distribución de cargas mecánicas, el esqueleto del conejo es mecánicamente diferente al humano. Una desventaja del conejo como modelo es la limitación en el número de implantes que pueden ser colocados debido al reducido tamaño de los huesos, lo cual incrementa el número de animales de experimentación. Sin embargo, son un modelo animal accesible y relativamente económico, tanto en adquisición como en mantenimiento [34]. Pese a todo, el conejo es un modelo sensible empleado para determinar la biocompatibilidad, la osteointegración y la osteogénesis de un biomaterial previo a estudios en especies de mayor tamaño [35]. Por último, la raza empleada por excelencia para investigación es el conejo alvino de Nueva Zelanda.

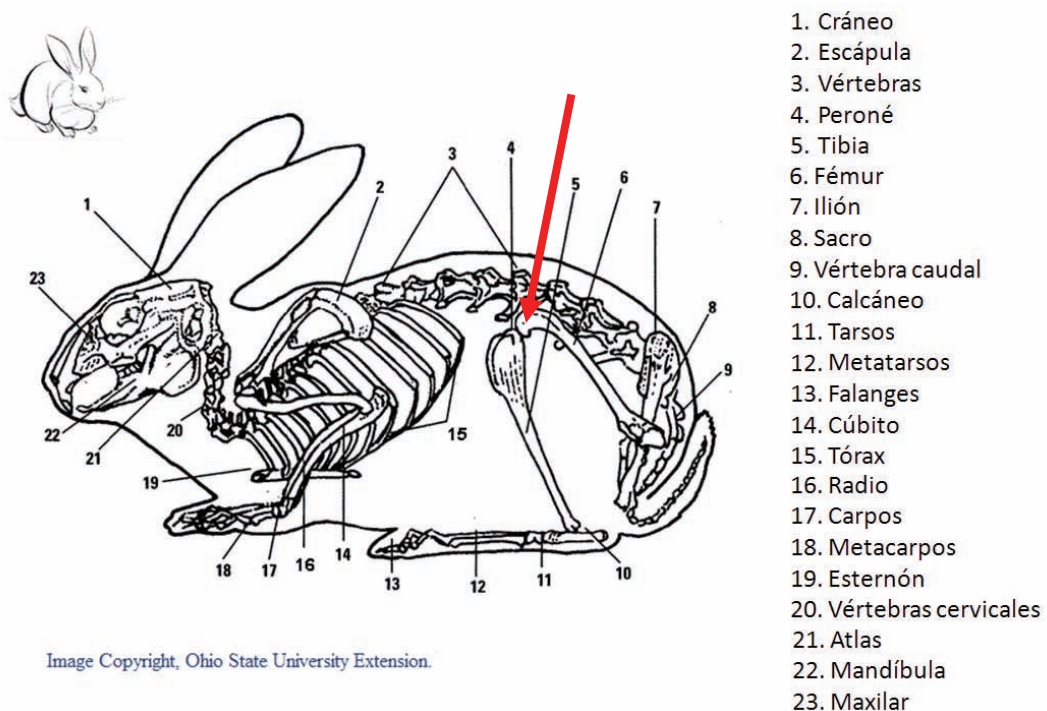


Image Copyright, Ohio State University Extension.

Figura 6.1: El esqueleto del conejo. La flecha de mayor tamaño marca el sitio de implantación.



### 6.3 Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar *in vitro* e *in vivo* las diferentes formulaciones de espumas de HA catalogadas como inyectables y autofraguables *in situ*.

La caracterización *in vitro* tuvo los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la incorporación de los biopolímeros en las espumas tiene efectos sobre la adhesión de células óseas.
2. Determinar si las espumas de HA son capaces de soportar el metabolismo celular óseo a través de la observación de indicadores de diferenciación.

La caracterización *in vivo* tuvo los siguientes objetivos:

1. Probar que las espumas de HA pueden ser preparadas de forma sencilla bajo condiciones de esterilidad dentro del ambiente del quirófano.
2. Probar que las espumas de HA inyectadas llenan y adoptan completamente la forma del defecto óseo, y que tienen la suficiente cohesión *in vivo* para fraguar dentro del defecto.
3. Probar cualitativamente la eficacia de las espumas compuestas como regeneradoras de lesiones óseas de tamaño crítico.
4. Determinar si se producen reacciones tóxicas o de rechazo a cuerpo extraño al implantar las espumas de HA subcutáneamente.

### 6.4 Materiales y métodos

#### 6.4.1 Composición de las espumas de hidroxiapatita empleadas

Las formulaciones de espumas de HA empleadas en esta investigación fueron las seleccionadas en el capítulo 5 como inyectables y autofraguables. La nomenclatura asignada, la composición de la fase líquida y la proporción L/P de cada una de ellas se resumen en la tabla 6.3. Cabe mencionar que los cementos RefA-0.50 y 0.5T-0.55 fueron empleados respectivamente como referencia inorgánica no macroporosa y macroporosa en los ensayos.

*Tabla 6.3: Composición de la fase líquida y proporción L/P del cemento y las espumas estudiadas a lo largo de este capítulo. Las espumas compuestas corresponden a las seleccionadas como autofraguables in situ.*

Nomenclatura	Proporción L/P [ml/g]	Composición del líquido
RefA-0.50	0.50 <sup>†</sup>	2.5 % de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0.5T-0.55	0.55 <sup>††</sup>	2.5 % de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0.5 % de Tween 80
2As** -0.5T-0.55	0.55	2.5 % de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2 % de alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular + 0.5 % de Tween 80
15Gb-0.75	0.75	2.5 % de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 15 % de gelatina bovina tipo B
20S-5Gb-0.55	0.55	2.5 % de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 20 %w de extracto de soja + 5 % de gelatina bovina tipo B

Los porcentajes están representados en peso/volumen; a excepción del porcentaje de soja expresado en peso/peso. †No espumada; ††espuma de hidroxiapatita desarrollada en el capítulo 3; \*\*alto peso molecular.

Por otro lado, la tabla 6.4 muestra las características y el proveedor de cada componente empleado en la fabricación de las espumas compuestas.

*Tabla 6.4: Proveedor y características de las materias primas.*

Componente	Características	Proveedor
<b>Gelatina bovina tipo B</b>	Bloom = 250	Rousselot, ref. LB - B
<b>Alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular</b>	DS = 6.6 % PM = 162500	Universidad de Ghent - Bélgica
<b>Extracto de soja</b>		Universidad de Brighton - Reino Unido
<b>Tween 80</b>	Para cultivo celular	Sigma, ref. P4780
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>		Merck, ref. 06586.0500
<b>Hidroxiapatita precipitada</b>		Alco, ref. 1.02143.1000

#### 6.4.1.1 Polvo del cemento

La fase sólida del cemento consistió en la mezcla de 98 % de fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP) con 2 % en peso de HA precipitada (pHA). La preparación del polvo se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el capítulo 3 de esta tesis. El tamaño medio de partícula del polvo fue 7.34  $\mu\text{m}$ , con una superficie específica de 1.99  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Para fabricar el cemento y las espumas bajo condiciones de esterilidad se prepararon dosis individuales de la fase sólida para cada una de las proporciones L/P manejadas, en base a 2 ml de líquido. El polvo de cada dosis se pesó dentro de botes de poliestireno, los cuales se cerraron y se empaquetaron en bolsas herméticas. Finalmente, las dosis se esterilizaron mediante radiación gamma a 25 KGy. Los paquetes estériles fueron guardados en un ambiente limpio y seco.

#### 6.4.1.2 Fase líquida de los cementos

Las disoluciones empleadas como fase líquida se prepararon disolviendo los componentes en agua destilada (milli Q), de acuerdo a los procedimientos descritos en los capítulos 4 y 5 de esta memoria. Las disoluciones se prepararon dentro de campana de flujo laminar diseñada para realizar cultivos celulares bajo condiciones estériles, siguiendo los principios de trabajo que se tienen en biología para evitar contaminaciones de los cultivos.

En el caso de la disolución soja/gelatina se prepararon por separado disoluciones de soja y gelatina con el doble de la concentración deseada, para que en el momento de mezclar ambas disoluciones en una proporción 1:1 se combinaran dando lugar a la concentración final requerida.

Para preparar cada fase líquida estéril, el agua usada para disolver cada componente fue previamente esterilizada por autoclave (Sterilmax, Selecta). Las disoluciones de Tween 80 fueron esterilizadas inmediatamente después de la preparación por filtración en un filtro comercial con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex syringe driven filter unit, Millipore Co.).

En cuanto a los demás componentes, éstos se esterilizaron previamente en forma de polvo por radiación gamma bajo dosis diferentes. Por ejemplo, el alginato de sodio se esterilizó a 8 KGy, mientras que el Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, la gelatina y la soja fueron esterilizados a 25 KGy. Los paquetes con

la masa apropiada de cada componente se prepararon de forma similar a las dosis de polvo de cemento y una vez estériles se almacenaron en un lugar limpio y seco hasta su empleo. Las dosis se prepararon para obtener 25 ml de fase líquida. La tabla 6.5 resume los métodos de esterilización empleados para cada componente.

*Tabla 6.5: Métodos de esterilización empleados para cada componente de los cementos.*

<b>Componente</b>	<b>Método de esterilizado</b>
<b>Polvo del cemento</b>	Radiación gamma: 25 KGy
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en polvo</b>	Radiación gamma: 25 KGy
<b>Gelatina en polvo</b>	Radiación gamma: 25 KGy
<b>Soja en polvo</b>	Radiación gamma: 25 KGy
<b>Alginato en estado sólido</b>	Radiación gamma: 8 KGy
<b>Disolución acuosa de Tween 80</b>	Filtrado a través de una membrana de 0.22 µm
<b>Agua destilada</b>	Autoclave
<b>Material metálico y de vidrio de laboratorio</b>	Autoclave

#### 6.4.1.3 Obtención de espumas sólidas compuestas estériles

Para trabajar bajo condiciones de esterilidad la preparación de la fase líquida, el espumado, la mezcla del polvo con la espuma y la preparación de muestras, se realizaron bajo campana de flujo laminar manteniendo las buenas prácticas de trabajo que se siguen en biología para realizar cultivos celulares. Para ello, es importante remarcar que el recipiente del espumado, la punta del agitador y la espátula con la que se realizó el mezclado debieron estar estériles y se usaron una sola vez por cada preparación.

En el caso del recipiente, éste se vende estéril para uso desechable (Eurotub–Deltalab), mientras que la espátula y la punta del agitador se esterilizaron por autoclave (Sterilmax, Selecta) después de cada uso, por lo que es recomendable tener disponibles tantas espátulas y puntas estériles de recambio como sean necesarias para agilizar el proceso de obtención de muestras.

La fase líquida estéril se preparó mezclando el contenido de la dosis correspondiente en el volumen adecuado de agua destilada (milli Q) también estéril, homogenizando las disoluciones por agitación mecánica externa. Es recomendable preparar la fase líquida del cemento el día previo al empleo.

La condición de espumado de la fase líquida y el agitador empleado corresponden a los descritos en los capítulos 3 y 5 de este trabajo. Dichas condiciones consisten en espumar 2 ml de disolución de biopolímero durante un minuto dentro de recipientes de polipropileno de 3 cm de diámetro por 7 cm de alto. Posteriormente se agrega el polvo de cemento a la espuma y se homogeneizan con espátula para finalmente introducir la pasta espumada dentro de una jeringa comercial (diámetro de la apertura de 2 mm con capacidad para 5 ml) para moldear el material.

Todo el material incluidos los moldes y los medios de inmersión en contacto con la fase líquida, el polvo de cemento o la pasta cementante deben estar esterilizados para evitar contaminaciones.

#### 6.4.2 Primer cultivo celular sobre las espumas sólidas compuestas

Este primer cultivo consistió en medir la adhesión de células óseas de tipo osteoblasto correspondientes a la línea celular Saos-2, sobre las tres formulaciones de espuma autofraguables *in situ*, más los cementos inorgánicos (no macroporoso y macroporoso) empleados como referencias (ver tabla 6.3).

La preparación de los cementos macroporosos y el cultivo celular se realizaron bajo condiciones de esterilidad en instalaciones para cultivo con nivel 2 de seguridad.

##### 6.4.2.1 Preparación de muestras

Aprovechando la buena inyectabilidad de las espumas, entre 400 y 600  $\mu\text{l}$  de pasta fueron inyectados directamente en cada pozo de la placa de cultivo de 48 pozos (diámetro interno del pozo = 12 mm). En este caso el cemento inorgánico de referencia no espumado se preparó bajo una proporción L/P = 0.50 ml/g, para poder inyectarlo con relativa facilidad.

Una vez inyectada la pasta fue necesario golpear ligeramente la base de la placa de cultivo sobre la superficie de trabajo con la intención de expandir el cemento sobre el pozo y obtener una superficie plana. Este paso debe hacerse inmediatamente después de inyectar cada espuma, porque si se demora, la pasta inicia el fraguado y no puede ser expandida.

Para conservar de la mejor manera la porosidad introducida por el proceso de espumado durante la preparación de las muestras, se propuso el siguiente orden en la inyección de las espumas dentro de una misma placa de cultivo: 1) RefA-0.50, 2) 15Gb-0.75, 3) 2As\*\*-0.5T-0.55, 4) 0.5T-0.55 (referencia macroporosa) y 5) 20S-5Gb-0.55. Esta disposición fue seleccionada en orden creciente de la fluidez de la pasta y del tiempo de fraguado.

Una vez inyectados todos los materiales se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada (milli Q) estéril sobre cada pozo para llevar a cabo la reacción de fraguado a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se realizaron cambios de agua cada tercer día durante un periodo de 7 días.

Finalmente, antes de iniciar el cultivo celular y después de los 7 días de fraguado, se removió el agua de cada pozo y se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo completo durante las 24 horas previas al sembrado de las células (preacondicionado).

##### 6.4.2.2 Cultivo celular

La cuantificación del número de células adheridas se realizó después de 6 y 24 horas de cultivo. Para ello se sembraron de forma directa 5000 células/pozo sobre los cementos contenidos en placas de cultivo de 48 pozos (diámetro de pozo de 12 mm).

Como material control del experimento de adhesión y proliferación se empleó el plástico de la placa de cultivo (TCPS). El ensayo se realizó una sola vez, empleando tres muestras por cada material y tiempo de ensayo.

El cultivo celular se realizó empleando 500  $\mu\text{l}$  de medio McCoy's 5A complementado con 15 % de suero fetal de bovino (FBS), 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de L-glutamina, al cual se le denominó medio completo. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en atmósfera saturada de humedad con 5 % de  $\text{CO}_2$ . El medio de cultivo se renovó una vez cada tercer día.

#### 6.4.2.3 Métodos de caracterización

La cuantificación de la cantidad de células viables sobre la superficie de cada material en cada tiempo de cultivo se realizó mediante el ensayo colorimétrico WST-1 (Roche), para ello, el sobrenadante fue removido y cada muestra se lavó dos veces con PBS. Posteriormente se colocaron 180  $\mu\text{l}$  de medio sin FBS más 20  $\mu\text{l}$  de WST-1 y se incubaron en un lugar oscuro durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante con actividad WST se colocaron en placa de cultivo de 96 pozos para determinar el cambio en la coloración mediante un lector de placas ELISA (espectrofotómetro de placas Power WaveX, Bio-Tek Instruments, Inc.) a una absorbancia de 420 - 480 nm.

Además, para cada tiempo y material se tomaron imágenes por fluorescencia de las células viables sobre la superficie de los materiales. Las células fueron teñidas con diacetato de fluorosceína (FDA; Sigma Ref. 596-09-08) diluido en acetona en una concentración de 5 mg/ml. Para realizar la tinción, 5  $\mu\text{l}$  de disolución de FDA por ml de medio fueron colocados en cada muestra. Las muestras se incubaron en un lugar oscuro a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y las muestras se lavaron dos veces con PBS para finalmente colocar 200  $\mu\text{l}$  de D-PBS. Las imágenes fueron tomadas con un estéreo microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara fotográfica a color, iluminado por una fuente externa de luz u.v. (Sistema Leica).

Finalmente, la concentración de iones calcio y el pH fueron medidos en el medio de cultivo que había estado en contacto con cada material para los diferentes tiempos de ensayo. La cuantificación se realizó con un electrodo selectivo de iones (ILyte:  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{++}/\text{pH}$ ; Instrumentation Laboratory).

### 6.4.3 Segundo cultivo celular sobre la espuma de hidroxiapatita obtenida únicamente con Tween 80

#### 6.4.3.1 Preparación de muestras

En base a la experiencia obtenida en el primer cultivo celular se planificó este segundo cultivo. Las formulaciones de cemento comparadas en este estudio fueron la referencia sin espumar y la espuma de HA obtenida espumado únicamente con 0.5 % de Tween 80. La composición de cada una de ellas se resume en la tabla 6.6.

Tabla 6.6: Formulaciones comparadas durante el segundo cultivo celular.

Nombre	Proporción L/P [ml/g]	Composición del líquido [% en peso - volumen]
RefA-0.55	0.55	2.5 % de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0.5T-0.55	0.55	2.5 % de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 0.5 % de Tween 80



La espuma sólida 0.5T-0.55 corresponde a la espuma de HA desarrollada en el capítulo 3, que no tiene cohesión en medio líquido a tiempos cortos desde su preparación. Por tal motivo, una vez inyectado el cemento dentro de la placa de cultivo de 48 pozos, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.4.2.1, no se colocó ningún medio líquido en contacto directo con la pasta. Para fraguar el cemento dentro de la caja de cultivo se colocó agua estéril en los pozos circundantes donde se inyectó la pasta, para asegurar una atmósfera húmeda. Después de 24 horas se colocaron 500 µl de agua destilada (milli Q) estéril directamente sobre los cementos para terminar la reacción de fraguado. El agua fue renovada cada 24 horas y la concentración de iones calcio y el pH fueron medidos sobre cada muestra líquida removida. Las placas con los materiales se almacenaron durante 7 días a 37 ° C y atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> para terminar la reacción de fraguado.

Finalmente, antes de iniciar el cultivo celular y después de los 7 días de fraguado, se removió el agua de cada pozo y se colocaron 500 µl de medio de cultivo completo durante las 24 horas previas al sembrado de las células. Después de 24 horas de contacto del medio de cultivo con el material sin células se midió la concentración de iones calcio y el pH.

#### 6.4.3.2 Cultivo celular

El segundo cultivo consistió en medir la adhesión y la proliferación de células óseas de tipo osteoblasto, correspondientes a la línea celular Saos-2. Adicionalmente, se siguió el metabolismo de producción de indicadores de mineralización como señal de diferenciación celular, sin incorporar factores osteogénicos al medio de cultivo empleado. La tabla 6.7 lista los ensayos de caracterización realizados y los tiempos experimentales de cada ensayo.

Tabla 6.7: Tiempos de ensayo y tipos de ensayo realizados durante el segundo cultivo celular.

Tipo de caracterización	Método de análisis	Tiempos de ensayo
Adhesión	LDH indirecto	6 horas
	Imágenes con AO/EtBr	6 horas
Proliferación	LDH indirecto	3, 7 y 14 días
	Imágenes con AO/EtBr	3, 7 y 14 días
	Actividad de fosfatasa alcalina	6 horas, 3, 7 y 14 días
Diferenciación	Producción de osteocalcina	7 y 14 días
	Concentración de iones en el medio de cultivo	Electrodo selectivo de iones

A diferencia del primer cultivo, el número de formulaciones de cemento comparadas se redujo y la cantidad de células sembradas inicialmente se incrementó a 25000 células/pozo.

En cuanto a las condiciones de cultivo, el tipo de medio de cultivo y las condiciones de incubación se mantuvieron constantes a las descritas para el primer cultivo celular. Cabe remarcar que no se agregaron promotores de la diferenciación al medio de cultivo. La diferencia radicó en que se realizaron cambios de medio cada 24 horas durante el tiempo total del ensayo. La concentración de iones calcio y el pH fueron medidos sobre cada sobrenadante removido.

Como material control del cultivo se empleó el TCPS. El ensayo se realizó en dos réplicas independientes, empleando en cada caso tres muestras por cada material y tiempo de ensayo sin factores osteogénicos adicionales. Los resultados reportados corresponden a la media entre muestras y ambas réplicas.

#### 6.4.3.3 Protocolos de caracterización del cultivo celular

A continuación se describen los protocolos empleados para cuantificar y observar la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular.

*LDH indirecto*: La cuantificación del contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) en las células adheridas a cada tiempo de experimentación se utilizó para determinar de manera indirecta el número de células viables sobre la superficie de cada material estudiado.

Para retirar las células no adheridas al tiempo de ensayo el sobrenadante de cada muestra fue removido y las muestras fueron lavadas dos veces con PBS a 37 °C. Posteriormente las células adheridas fueron lisadas mediante digestión con M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce Protein Research Products). Para ello, 250 µl de M-PER fueron colocados en cada pozo, posteriormente la placa de cultivo fue incubada a 37 °C durante 20 minutos. Por último, el M-PER fue retirado haciendo lavados, mediante pipeteo, para recuperar toda la proteína celular. Los 250 µl del lisado se almacenaron a 4 °C hasta tener las muestras correspondientes a todos los tiempos de estudio para la determinación del contenido de LDH.

Para evitar que los residuos sólidos intervinieran en la cuantificación del contenido de LDH, el lisado celular fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, 100 µl de cada centrifugado fueron colocados en pozos de placas de cultivo de 96 pocillos, a los cuales se les agregó 100 µl de la mezcla de reacción para determinar el contenido de LDH (kit LDH; Roche Ref. 11644793001). Las placas se incubaron durante 15 minutos en un lugar oscuro para realizar la reacción de análisis. Una vez transcurrido este periodo, la reacción se detuvo agregando 50 µl de HCl 1N a cada pozo. Finalmente, la caja de cultivo se llevó a un lector de placas ELISA (espectrofotómetro de placas Power WaveX, Bio-Tek Instruments, Inc.) para determinar la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 490 nm.

Por último, para expresar los resultados en función del número de células, se preparó una curva patrón con 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mil células sobre TCPS. El medio de cultivo y las condiciones experimentales se mantuvieron constantes a las descritas anteriormente. El cultivo celular se realizó durante 24 horas antes del lisado para asegurar la adhesión de las células al TCPS.

*Imágenes con AO/EtBr*: Las muestras para imagen, al igual que las muestras para cuantificar el número de células, fueron preparadas en cajas de cultivo de 48 pozos. Para realizar la tinción, a cada muestra se le agregó directamente 495 µl de medio de cultivo con 5 µl de una mezcla 1:1 de naranja de acridina (AO) con bromuro de etilo (EtBr), ambos en una concentración 10 µM. Las muestras se incubaron en un lugar oscuro entre 10 y 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las muestras se lavaron 2 veces con 500 µl de D-PBS; finalmente, 400 µl de D-PBS se colocaron en cada pozo para llevar la placa a observar bajo un estereomicroscopio de fluorescencia acoplado a una cámara fotográfica a color, iluminado por una fuente externa de luz u.v. (Sistema Leica). Para AO las células se observaron en color

verde (células viables) mientras que para EtBr las células se observaron en color rojo (células dañadas). Se trabajó rápidamente para evitar la pérdida de fluorescencia y el incremento del ruido de fondo. Nota: se debe trabajar con precaución debido a que el EtBr es un reactivo tóxico.

Actividad de fosfatasa alcalina: Las muestras para cuantificar la ALP correspondieron al mismo lisado empleado para la cuantificación del LDH. Inicialmente, 100  $\mu$ l de cada muestra centrifugada fueron colocados en pozos de cajas de cultivo de 96 pozos y se les agregó 50  $\mu$ l de reactivo (40 mg de phosphate substrate en 10 ml de AMP; Sigma P5994-25TAB), más 50  $\mu$ l de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) usado como solución tampón. Posteriormente, la mezcla de reacción fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, la reacción fue detenida agregando 50  $\mu$ l de NaOH 1 N, para finalmente leer la absorbancia a 405 nm (espectrofotómetro de placas Power WaveX, Bio-Tek Instruments, Inc.).

En el caso de los blancos se agregó 100  $\mu$ l de agua destilada en vez de lisado celular. Por otro lado, las muestras que salieron del límite de detección se diluyeron en AMP para llevar a cabo la reacción y la lectura de absorbancia, posteriormente se calculó el valor real multiplicando el resultado experimental por el factor de dilución.

Finalmente, para expresar los resultados en concentración de fosfatasa alcalina se realizó una curva patrón en base a una solución estándar de p-nitrofenol (Sigma, ref. N7660-100ML), el cual corresponde al producto formado por el reactivo al ser catalizado por la ALP en medio básico.

Producción de osteocalcina: La producción de osteocalcina fue observada mediante imágenes de fluorescencia de células Saos-2 cultivadas en medio no osteogénico durante 7 y 14 días sobre discos prefraguados de 6 mm de diámetro y 3 mm de altura.

Los discos prefraguados fueron esterilizados por radiación gamma con una dosis de 25 KGy antes del cultivo. La composición de los discos correspondió al cemento RefA-0.55 y a la espuma 0.5T-0.55 (ver tabla 6.6). El cultivo se realizó en placas de 96 pozos, en los cuales se sembraron inicialmente 8000 células/pozo en una gota de 40  $\mu$ l de medio, para asegurar que las células se depositaran únicamente sobre la superficie del material. Después de 30 minutos se colocaron 160  $\mu$ l más de medio para realizar el cultivo siguiendo el mismo protocolo antes indicado para las muestras inyectadas directamente en las placas de cultivo. La razón de usar discos prefraguados para la observación de osteocalcina, fue facilitar la observación en el microscopio, ya que las placas de cultivo son demasiado altas para ser colocadas entre la platina y el objetivo.

Las células adheridas en las muestras a cada tiempo de estudio se lavaron con PBS-glicina (0.15 g de glicina en 100 ml de PBS), para posteriormente fijarlas con disolución de paraformaldeído al 3 % (760  $\mu$ l paraformaldeído al 16 %, 240  $\mu$ l sacarosa 1 M, 2 ml PBS y 1 ml agua milli Q) durante 10 minutos. Enseguida las células se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.25 % durante 5 minutos, y se bloquearon en solución tampón de fosfato/albumina de bovino (PBS/glicina/BSA 6 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entre cada paso se realizaron dos lavados con solución PBS/glicina.

La tinción Hoechst 33258 (Invitrogen) se empleó para teñir de color azul el núcleo de cada célula, mientras que para la osteocalcina se utilizó una tinción en base a inmuno-fluorescencia. Para ello, primero se incubó cada muestra durante 24 horas a 4 °C con anticuerpo primario para osteocalcina (goat anti – human osteocalcin; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50 en PBS/Glicina/BSA 3 %. Posteriormente se marcó el anticuerpo de forma fluorescente, en color verde, con un anticuerpo secundario (mouse anti-goat conjugated to Alexa Fluor 488; Molecular Probes) diluido también en PBS/Glicina/BSA 3 %, durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, como se mencionó, se agregó 0.1 µl/ml de reactivo Hoechst 33258 para teñir los núcleos. Después de haber fijado y teñido las células los discos fueron sacados de cada pozo y colocados sobre porta objetos de vidrio para tomar las imágenes. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio confocal (Leica SPE), tomando imágenes para cada tinción a cada 10 µm en la dirección vertical en una profundidad total de 200 µm. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron acopladas con el software Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Electrodo selectivo de iones: La concentración de iones calcio y el pH en el medio de fraguado y en el sobrenadante del cultivo celular, se midieron cada 24 horas mediante un electrodo selectivo de iones (ILyte: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>/pH, Instrumentation Laboratory). Este equipo fue diseñado para la rápida y eficiente determinación de estas concentraciones en muestras de sangre completa, muestras de suero o plasma sanguíneo, o muestras de orina.

#### 6.4.4 Implantación de los materiales en modelo animal

El estudio preclínico *in vivo* se realizó en la Universidad de Ulm en Alemania. El procedimiento quirúrgico de implantación y el protocolo experimental fue informado a las autoridades competentes para obtener la aprobación de acuerdo a lo estipulado en la legislación vigente [37].

El modelo animal elegido fue el conejo; 72 hembras albinas de raza Nueva Zelanda entre 6 y 9 meses de edad con pesos similares, fueron adquiridas en centros autorizados de crianza y se alojaron en el centro autorizado para el manejo de animales de laboratorio de la Universidad de Ulm, bajo las condiciones optimas estipuladas para el alojamiento de esta especie animal (15 – 21 °C, 55 ± 10 % de humedad, y cambios periódicos de luz ambiental) [34].

La composición exacta y la nomenclatura de los materiales implantados se presentan en la tabla 6.3. Las implantaciones se programaron en grupos de acuerdo a la composición del material a implantar, tomando entre 3 y 4 días por cada grupo de 18 conejos. El orden en la implantación de las espumas fue el siguiente: 15Gb-0.75, 20S-5Gb-0.55, 2As\*\*-0.5T-0.55 y RefA-0.50.

##### 6.4.4.1 Protocolo experimental

Para obtener el máximo de información por cada animal empleado se efectuaron dos experimentos en paralelo. Por un lado, la implantación mediante inyección de las tres espumas compuestas autofraguables *in situ* más la referencia no espumada (ver tabla 6.3) dentro de defectos óseos inducidos de tamaño crítico. Y por otro lado, la implantación subcutánea de discos prefraguados de las mismas composiciones, con la intención de descartar reacciones a cuerpo extraño o de toxicidad por parte de los cementos.

Los 72 conejos se dividieron en 4 grupos, un grupo por cada material a probar (por cada formulación  $n = 18$ ). Cada material se implantó por duplicado, es decir, en un mismo conejo en cada extremidad caudal. Los periodos de implantación se fijaron en 1, 3 y 5 meses. Al término de cada periodo se sacrificaron 6 animales por grupo con una sobredosis de fenobarbital.

Posteriormente, la zona de la implantación en cada extremidad fue removida y lavada con solución salina para la evaluación macroscópica, histológica y estructural.

#### 6.4.4.2 Implantación de las espumas por inyección

Antes de la cirugía la zona de la implantación se afeitó y desinfectó, y posteriormente los conejos se trasladaron a la sala de operaciones donde los cementos fueron espumados e implantados. Se empleó anestesia general para la preparación y cirugía de los conejos, los signos vitales fueron monitoreados hasta que los animales se recuperaron de la anestesia después de la intervención.

La cirugía consistió en generar un defecto de tamaño crítico (5 mm de diámetro por 10 mm de profundidad) en el cóndilo lateral distal del fémur de cada extremidad caudal (ver figura 6.1). Para ello, se realizó un barreno de 2 mm de diámetro con la profundidad deseada, posteriormente con un sacabocados de 5 mm de diámetro se extrajo el bloque de hueso. Finalmente, con una fresa de punta plana de 5 mm de diámetro se aseguró el acabado recto del fondo de la cavidad.

Una vez realizado el defecto, se llevó a cabo el espumado y la mezcla del cemento dentro de las instalaciones del quirófano. La pasta se introdujo en una jeringa comercial con capacidad para 5 ml y apertura de la boquilla de 2 mm de diámetro, con la que se inyectó dentro del defecto en un tiempo total menor a 5 minutos desde el espumado de la fase líquida.

Antes de inyectar el material, el defecto se lavó con solución salina y se secó con gasas estériles, lo que detuvo la hemorragia por unos segundos, tiempo suficiente para inyectar las espumas. De acuerdo con los resultados del capítulo 5 de esta memoria, para evitar aire atrapado en el implante y para llenar completamente el defecto, el cirujano inyectó la pasta comenzando por el fondo de la cavidad, subiendo lentamente la boquilla de la jeringa hasta llegar a la superficie. Una vez lleno el defecto con la pasta espumada, el periostio, la fascia y la piel fueron suturadas capa a capa. El mismo procedimiento se siguió en la segunda extremidad caudal.

#### 6.4.4.3 Implantación subcutánea de discos prefraguados

Adicionalmente a la implantación por inyección de las pastas, se implantó subcutáneamente un disco de cada formulación de espuma sólida prefraguada. Los discos se fabricaron de acuerdo a los protocolos de espumado de la sección 6.4.1.3, se moldearon por inyección dentro de moldes de teflón (6 mm de diámetro por 2 mm de altura), se fraguaron durante 12 días por inmersión en Ringer a 37 °C, se secaron a 37 °C durante una noche, se empaquetaron en sobres herméticos individuales y se esterilizaron por radiación gamma a 25 KGy.



Después de la implantación por inyección, justo antes de suturar las capas de fascia y piel, se implantó un disco prefraguado en cada extremidad caudal, entre el musculo y la fascia. La composición del disco y de la pasta inyectada fueron las mismas en cada conejo. Con este procedimiento se evitó una segunda intervención quirúrgica de los animales. Es importante señalar que no se implantó directamente la pasta cementante porque la presión entre la piel y el músculo genera la deformación de la pasta que termina desintegrándose.

#### 6.4.4.4 Evaluaciones realizadas

Las evaluaciones presentadas en esta memoria son cualitativas y sólo abarcan aquellos puntos relacionados con la eficacia de espumas compuestas para llenar y regenerar lesiones óseas.

*Evaluación macroscópica:* La apariencia de la zona de implantación fue seguida visualmente a lo largo de todo el estudio. Asimismo, se tomó un registro fotográfico de la apariencia del tejido circundante a cada tiempo de análisis, tanto para el implante inyectado como para el implante subcutáneo. En esta memoria sólo se reportan los resultados correspondientes a un mes de implantación.

*Análisis por  $\mu$ -CT:* La estructura trabécular ósea del cóndilo femoral extraído al primer tiempo de implantación se analizó mediante microtomografía computacional ( $\mu$ -CT), con el objetivo de mostrar si las espumas compuestas son capaces de adaptarse la geometría del defecto a tratar con tan solo ser inyectados. Las imágenes de la zona del implante se realizaron con una resolución de 32  $\mu$ m.

*Análisis histológico:* Fue realizado un estudio histológico cualitativo de la sección femoral extraída después de 5 meses de implantación, con la intención de analizar si las espumas compuestas desarrolladas son eficaces en la regeneración de lesiones óseas de tamaño crítico. El implante, junto con el tejido circundante fueron fijados manteniendo la fase mineral ósea y preparados para observación histológica empleando la tinción *Paragon One*.

*Difracción de rayos X:* Finalmente, para corroborar que la reacción de fraguado tuvo lugar *in vivo* se realizaron diagramas de difracción de rayos X (DRX) sobre los materiales extraídos después de un mes de implantación. Las muestras disponibles se encontraban embebidas en resina y correspondieron al cemento RefA-0.50, a la espuma 2As-0.5T-0.55 y a un blanco (cóndilo femoral). Los difractogramas se adquirieron bajo una longitud de onda de 1.5406 Å (CuK $\alpha$ , 40 mA, 45 KV) y monocromador del haz. El barrido se realizó en un área de 4.5 x 5 mm<sup>2</sup> entre 4 y 100° en la escala 2 $\theta$  con un incremento de paso de 0.033° a una rapidez de 200 s/paso.

#### 6.4.4.5 Preparación de las espumas para implantar

La fabricación de espumas compuestas bajo condiciones estériles constó de dos etapas:

- La primera etapa se realizó 24 horas antes de cada cirugía y consistió en preparar las disoluciones de biopolímero correspondientes a la fase líquida de la espuma a implantar. La preparación se realizó dentro de campana de flujo laminar siguiendo las buenas prácticas para realizar cultivos celulares. Una vez obtenida cada disolución se tomaron alícuotas de 2 ml dentro de los recipientes donde se llevaría a cabo el espumado (3 cm de diámetro por 7 cm de alto; Eurotub–Deltalab), para finalmente almacenarlos a 4 °C.

En el caso particular de la espuma 20S-5Gb-0.55 se tomaron alícuotas de 1 ml de la disolución de gelatina, mientras que la disolución de soja no se dividió, almacenando el volumen total en un único recipiente. Cabe mencionar que fueron preparadas disoluciones nuevas cada día previo a la implantación.

El día de la cirugía las alícuotas correspondientes al compuesto a implantar se acondicionaron a temperatura ambiente. En el caso especial de la espuma 20S-5Gb-0.55, los 2 ml de fase líquida se obtuvieron agregando, justo antes de espumar, 1 ml de disolución de extracto de soja a 1 ml de disolución de gelatina previamente separado. Cabe recordar que las disoluciones empleadas fueron preparadas al doble de concentración para que al mezclarse dieran lugar a la concentración deseada.

- En la segunda etapa, cada dosis de polvo de cemento estéril se extrajo justo en el momento de ser utilizada, al igual que todo el instrumental empleado (puntas del agitador, espátulas para el mezclado y la jeringa para la implantación). El espumado de la fase líquida y la mezcla con espátula se realizó dentro del quirófano sobre una mesa aséptica siguiendo prácticas de trabajo idénticas a las empleadas para la preparación de muestras para cultivo celular.

Cuando el cirujano terminó la cavidad en el cóndilo femoral se inició el espumado de la fase líquida, posteriormente se agregó el polvo de cemento a la espuma y se mezcló con espátula hasta obtener una pasta homogénea de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.4.1.3. En el caso de las formulaciones de espuma que incorporan gelatina en la fase líquida, las disoluciones de gelatina, incluida la mezcla soja/gelatina, se calentaron y mantuvieron a 55 °C dentro de un baño térmico para llevar a cabo el espumado y la mezcla del polvo con la espuma; el resto de disoluciones fueron espumadas y mezcladas a temperatura ambiente. El tiempo total desde el inicio del espumado, y en el caso de los compuestos con gelatina desde el calentamiento de la fase líquida, hasta que el cirujano terminó de implantar el material no fue mayor a 5 minutos.

Cabe recordar que el cemento de referencia no fue espumado y se preparó bajo una proporción L/P = 0.50 ml/g (RefA-0.50) para poder inyectarlo con relativa facilidad. Finalmente, puesto que la pasta de cemento fue fabricada bajo condiciones asépticas, el cirujano sostuvo la jeringa estéril y el asistente que preparó el cemento colocó la pasta dentro de la jeringa, cuidando siempre de no tener contacto con el instrumental quirúrgico o la pasta de cemento para evitar la pérdida de la esterilidad.

#### 6.4.5 Análisis estadístico de los resultados

Las pruebas de igualdad de medias se realizaron aplicando la prueba estadística t de Student. El criterio de rechazo o aceptación de la hipótesis nula se fijó en un porcentaje de confiabilidad del 0.05 %.

## 6.5 Resultados y discusión

### 6.5.1 Preparación de espumas bajo condiciones de esterilidad

Para el presente estudio se seleccionó la radiación gamma como método de esterilización de todos los componentes, por ser un método eficaz, rápido y perdurable (los materiales esterilizados por radiación gamma pueden permanecer estériles por periodos de hasta 5 años si son almacenados correctamente). Además, se esterilizaron las materias primas en estado sólido para minimizar la desnaturalización o entrecruzamiento de los biopolímeros.

Algunas ventajas de esterilizar las materias primas y fabricar las espumas en condiciones estériles, en lugar de esterilizar las espumas una vez consolidados son:

1. La incorporación de los biopolímeros en los cementos puede facilitar la contaminación de las muestras durante el fraguado, por tanto la esterilización de los componentes evita contaminaciones.
2. Los cementos y las espumas de fosfatos de calcio son materiales diseñados para ser implantados mediante inyección, por lo que no es factible esterilizar la forma final del implante.

Además, no se apreciaron cambios cualitativos en las propiedades de los biopolímeros (espumabilidad, viscosidad o solubilidad) después del proceso de esterilización.

Un cambio que sí fue evidente fue la coloración del polvo de cemento. La mezcla  $\alpha$ -TCP/pHA se caracteriza por ser de color blanco intenso, sin embargo, después de la esterilización por radiación gamma, ésta se torno de color gris claro. El cambio en la coloración del polvo de cemento significó una ventaja para el método de espumado; ya que las espumas líquidas generadas por la agitación mecánica son también de color blanco intenso, por lo que al agregar el polvo de cemento es difícil determinar visualmente cuando la mezcla es homogénea, no obstante, con el polvo de color gris es más fácil determinarlo.

Para descartar cambios en las propiedades del material de partida se determinaron los tiempos de cohesión y de fraguado, la resistencia a la compresión y el módulo de elasticidad a compresión del cemento esterilizado y sin esterilizar. A diferencia de un cemento óseo en base a fosfato tetracálcico reportado en la literatura [9], la radiación gamma no propició diferencias significativas entre ambas condiciones. Tampoco se observaron diferencias en las fases cristalinas por difracción de rayos X. Los resultados no se reportan porque coinciden con los resultados del cemento de referencia reportado en el capítulo 4 de esta memoria.

Por otra parte, se comprobó que el nuevo diseño del agitador de mano (ver capítulo 3), junto con el método de esterilización y los protocolos de fabricación empleados, son adecuados para trabajar bajo condiciones de esterilidad, y que las puntas intercambiables facilitan la producción en serie de espumas estériles, incluso dentro de la sala de operaciones. En el caso de los cultivos celulares se llegaron a preparar en promedio 100 muestras de cemento en un día de trabajo, mientras que, durante la implantación de los materiales, la etapa limitante fue el desarrollo de la cirugía, específicamente la sutura del acceso quirúrgico.

Cabe señalar que la fabricación de las espumas bajo condiciones estériles durante la implantación no requirió de instrumental ni de instalaciones especiales, por lo que el método de espumado de la fase líquida puede ser transferido con facilidad a la aplicación clínica sin inversión considerable en material o equipo, pero requiere de un asistente (no necesariamente médico) capacitado en la preparación del material.

Finalmente, el protocolo de preparación de muestras para cultivo celular inyectando la pasta directamente en cada pozo de la placa de cultivo y el protocolo de preparación de la jeringa con la cual se implanta el cemento *in vivo*, son ya por sí mismos un resultado de esta investigación. Hay que mencionar que no se produjeron contaminaciones de los cultivos celulares, ni infecciones de los animales, lo que prueba la eficiencia de los métodos de fabricación bajo condiciones de esterilidad; lo cual no es un resultado trivial, debido al gran volumen de muestras manipuladas durante cada experimento y la susceptibilidad de los biopolímeros a contaminarse.

## 6.5.2 Primer cultivo celular: adhesión de osteoblastos sobre las espumas de hidroxiapatita compuestas

### 6.5.2.1 Adhesión de osteoblastos Saos-2

La figura 6.2 muestra la lectura de fluorescencia para cada material y para los dos tiempos (6 y 24 horas) del ensayo de adhesión de células osteoblásticas Saos-2. La intensidad de la lectura está directamente relacionada con la cantidad de células adheridas en la superficie.

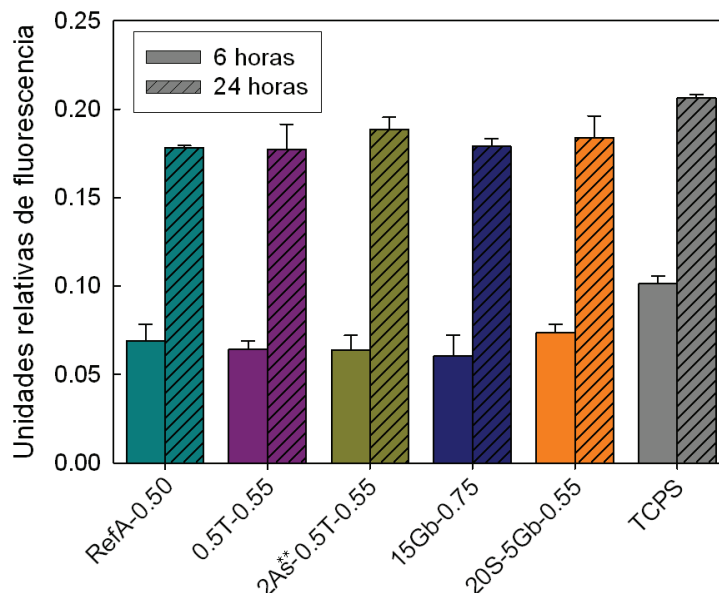


Figura 6.2: Lectura de fluorescencia producida por el reactivo WST-1 durante el ensayo de adhesión. La intensidad de la lectura está directamente relacionada con la cantidad de osteoblastos adheridos en cada material.

Como se esperaba, sobre todos los materiales la cantidad de células adheridas es mayor para el periodo de adhesión más largo. No obstante, en el plástico de la placa de cultivo (TCPS) la cantidad de células adheridas es estadísticamente mayor con respecto al resto de los materiales ensayados. Cabe señalar también que la diferencia es menor para el periodo de adhesión más largo, lo cual sugiere que las células Saos-2 sólo tardan un poco más en adherirse a las espumas o al cemento. Una posible explicación es que las células reconocen más rápidamente la superficie plana y liza del plástico de cultivo, que la superficie rugosa de las espumas y el cemento de referencia, lo cual no necesariamente es una desventaja, sino que puede ser señal de la bioactividad del material.

Es importante mencionar que no existen diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de espumas y el cemento de referencia, por lo que se concluye que la incorporación de los biopolímeros no tiene efectos sobre la adhesión de las células osteoblásticas Saos-2.

Se esperaba que al menos la incorporación de la gelatina como agente espumante incrementara la adhesión celular debido a que contiene la secuencia peptídica RGD, considerada como promotora de la adhesión de gran variedad de células [38]. Sin embargo, del capítulo 5 se sabe que la gelatina no entrecruzada en las espumas se libera hacia el medio de fraguado. A pesar de que después de 12 días no todo el contenido de gelatina se pierde, es muy probable que se libere primero la gelatina localizada en la superficie. Por lo cual es posible que las células no encuentren gelatina a la cual adherirse sobre la superficie de las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55 fraguadas y preacondicionadas durante un total de 8 días en medio líquido.

A diferencia, el efecto biológico de la incorporación del alginato de sodio sulfatado y del extracto de soja se espera que sea respectivamente en términos de vascularización y mineralización de las espumas, efectos que no pueden observarse a periodos de cultivo tan cortos como 24 horas. Sin embargo, estos efectos si fueron estudiados dentro de las actividades del proyecto Smart CaP (resultados no incluidos por pertenecer a otros grupos de investigación).

Por otro lado, las imágenes en la figura 6.3 muestran las células adheridas sobre cada material para el periodo de 24 horas.

Las imágenes evidencian la dificultad para distinguir entre el sustrato de cemento y las células teñidas, puesto que el cemento adsorbe la tinción debido a la microporosidad. Sin embargo, es posible llegar a distinguir las células sobre las espumas como puntos verdes de mayor intensidad, que en el cemento y las espumas forman agregados distribuidos homogéneamente. Por otro lado, la adsorción de la tinción permite distinguir los macroporos de las espumas, siendo tal vez más claro este fenómeno para la espuma de mayor macroporosidad obtenida usando solamente Tween 80 (0.5T-0.55).

La presencia de los agregados celulares sobre los cementos respalda la conclusión de que las espumas compuestas, al igual que el cemento de referencia, no evitan la adhesión celular sino que tan solo es más lenta.

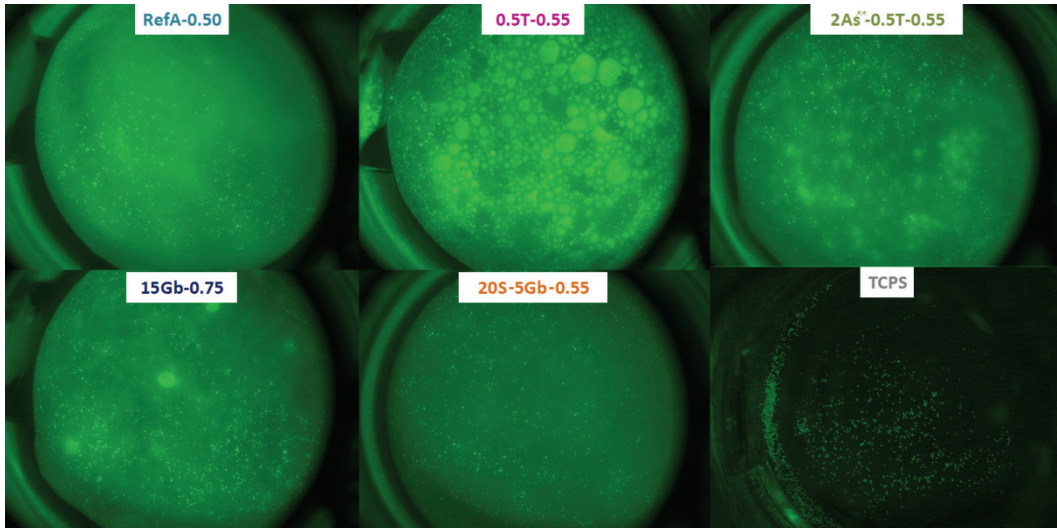


Figura 6.3: Imágenes por FDA de las células adheridas a la superficie de cada material después de 24 horas de cultivo.

### 6.5.2.2 Cambio del pH y de la concentración de calcio

La figura 6.4 muestra la evolución del pH y la concentración de los iones calcio en el medio de cultivo en contacto con las espumas y el cemento de referencia a 6 y 24 horas de adhesión.

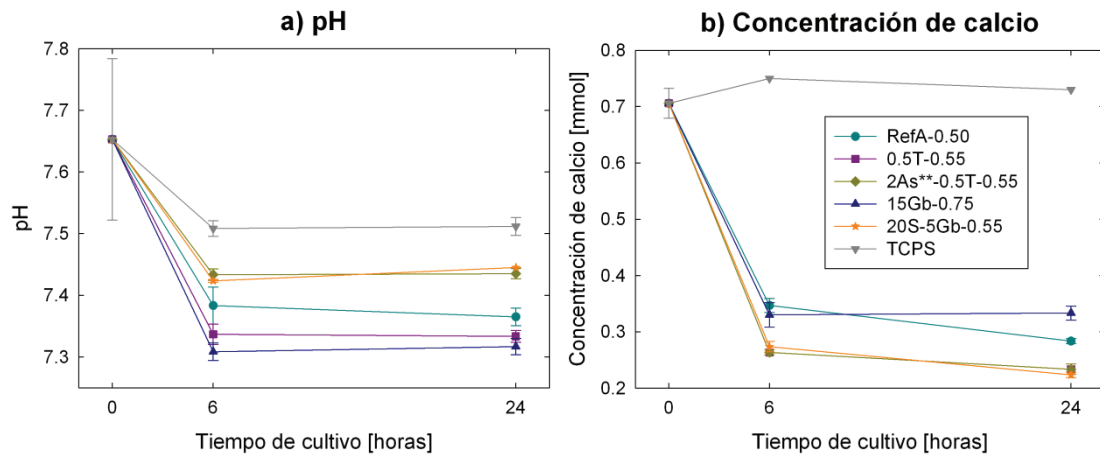


Figura 6.4: a) cambio en el pH y b) cambio en la concentración de calcio en el medio de cultivo después de 6 y 24 horas de contacto del medio con las espumas, el cemento de referencia y el plástico de cultivo (TCPS).

**Cambio del pH:** Puede observarse que el medio de cultivo tiende a acidificarse en contacto con todos los materiales. Además, la caída del pH no es la misma para las diferentes espumas, no obstante, si es igual para 6 y 24 horas.

Por un lado, el medio de cultivo es un caldo proteico inestable que se acidifica a través del tiempo. Es por ello, que la curva correspondiente al TCPS en la figura 6.4a el pH disminuye respecto al valor del medio de cultivo fresco (tiempo = 0).



La disminución del pH es mayor en las espumas o el cemento sin espumar, lo cual se puede atribuir a las interacciones iónicas entre la CDHA y el medio de cultivo. A pesar de que la CDHA es estable en el intervalo de pH al cual se encuentra el sistema, la superficie alcanza un equilibrio dinámico con los iones del medio, de tal forma que hay una dilución y reprecipitación de apatita en la superficie. Además, debido a que la concentración de calcio en el medio de cultivo disminuye, se puede esperar que el equilibrio este desplazado hacia la precipitación. Lo cual es posible debido a que la CDHA está catalogada como un material bioactivo [39-41]. La formación de una nueva capa de apatita sobre la superficie puede implicar el consumo de los iones calcio, fosfato, hidrogenofosfato e hidroxilo del medio de cultivo, generando una proporción mayor de protones con respecto a hidroxilos, que puede ser la causa de la ligera acidificación del medio.

La caída del pH fue diferente entre las formulaciones de cemento, siendo las espumas 15Gb-0.75 y 0.5T-0.55 las que provocaron la mayor caída. Sin embargo, las espumas 2As\*\*-0.5T-0.55 y 20S-5Gb-0.55, que también son más porosas que el cemento inorgánico de referencia, disminuyeron en menor medida el pH. Por un lado, la mayor caída del pH producida por la espuma 15Gb-0.75 podría explicarse por la liberación de la gelatina tipo B, que como ya se ha mencionado, tiene un punto isoeléctrico menor a 7, por tanto tiende a acidificar el medio [42].

El mayor descenso del pH producido por la espuma 0.5T-0.55 se puede atribuir a la macroporosidad abierta, que propicia más superficie expuesta para una mayor interacción iónica con el medio.

Cambio en la concentración de iones calcio: En la figura 6.4b puede observarse que la concentración de iones calcio se mantiene relativamente constante en el TCPS, mientras que la concentración de calcio en el medio en contacto con las espumas o la referencia disminuye mostrando ligeras diferencias entre algunas formulaciones. Como ya se mencionó, los fosfatos de calcio, como la CDHA, son materiales bioactivos capaces de crear una película de apatita sobre la superficie [39-41], resultado coherente con el hecho de que las espumas adsorben constantemente el calcio del medio de cultivo.

Además, que la caída de la concentración de iones calcio sea prácticamente la misma a 6 y 24 horas sugiere que la adsorción de calcio sobre la superficie de CDHA es muy rápida y siempre alcanza un equilibrio químico, porque la concentración de calcio en el medio no llega a ser de cero.

### 6.5.2.3 Sugerencias para el segundo cultivo celular

De acuerdo a los resultados anteriores, en el segundo cultivo celular sobre las espumas de HA se realizaron cambios del líquido de fraguado cada 24 horas durante 7 días para amortiguar el cambio del pH durante la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP, y también se realizaron cambios del medio de cultivo cada 24 horas para compensar la adsorción del calcio y la caída del pH. Finalmente, debido al bajo número de células observadas en la figura 6.3, se recomendó incrementar el número inicial de células sembradas y optimizar la técnica de tinción (reduciendo los tiempos de tinción a no más de 15 minutos); incluso se recomendó emplear la microscopía confocal para distinguir entre la fluorescencia del cemento y las células teñidas.

### 6.5.3 Segundo cultivo celular: adhesión, proliferación y diferenciación

#### 6.5.3.1 Adhesión y proliferación

Los resultados de adhesión a 6 horas y proliferación a 3, 7 y 14 días para el segundo cultivo celular se muestran en la figura 6.5.

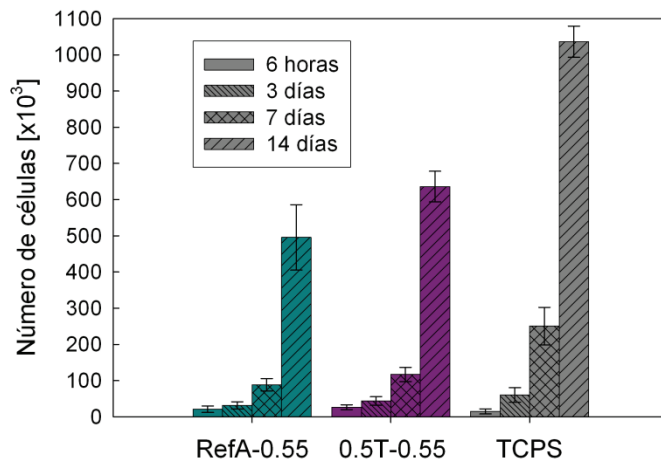


Figura 6.5: Cuantificación del número de células adheridas en función del tiempo de cultivo. RefA-0.55: cemento no espumado de referencia, 0.5T-0.55 cemento espumado únicamente con 0.5 % de Tween 80 en la fase líquida (ambos con L/P = 0.55 ml/g y 2.5 % de acelerante) y TCPS: plástico de cultivo.

En la figura 6.5 puede observarse que el número de células se incrementa exponencialmente sobre todas las superficies, incluso en los cementos. Sin embargo, la rapidez de proliferación es mayor sobre el TCPS. Además, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en proliferación entre el cemento de referencia sin espumar (RefA-0.55) y el cemento macroporoso espumado únicamente con Tween 80 (0.5T-0.55).

El hecho de que la proliferación celular sea igual en el cemento de referencia y la espuma sugiere que la incorporación del Tween 80 como agente espumante no genera efectos citotóxicos. Sin olvidar que el contenido final de Tween 80 en la espuma de HA es menor a la dosis máxima recomendada para aplicaciones parenterales, y que además es probable que el poco contenido de Tween 80 se libere, al menos parcialmente, durante el fraguado de la espuma por inmersión en medio líquido.

El resultado de cuantificación del número de células presentes a cada tiempo de ensayo puede validarse cualitativamente sobre las imágenes de AO mostradas en la figura 6.6, en las que se puede observar que el número de células se incrementa con el paso del tiempo sobre ambos cementos y el TCPS. Puede observarse como a 7 días el TCPS ya ha alcanzado la condición de confluencia, mientras que los cementos alcanzan dicha condición hasta los 14 días de cultivo.

Además, en las imágenes correspondientes la espuma 0.5T-0.55 (figura 6.25 b, e y h) se observa que las células son capaces de colonizar y multiplicarse al interior de los macroporos.

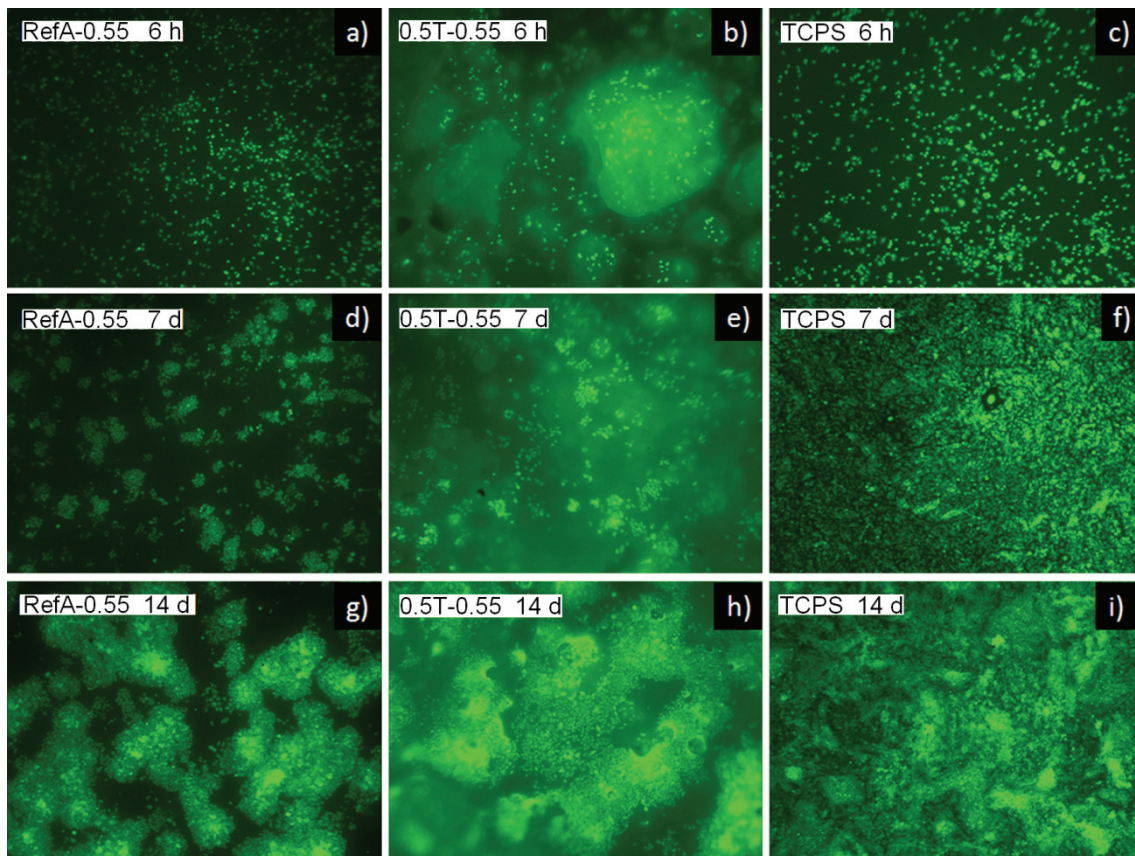


Figura 6.6: Imágenes por AO de las células viables (puntos verdes) adheridas a la superficie de cada material en función del tiempo de cultivo. RefA-0.55: cemento no espumado de referencia, 0.5T-0.55 cemento espumado únicamente con 0.5 % de Tween 80 en la fase líquida (ambos con L/P = 0.55 ml/g y 2.5 % de acelerante) y TCPS: plástico de cultivo.

Por otro lado, al contrastar las imágenes de AO con las imágenes de EtBr (ver figura 6.7) tomadas sobre el mismo campo, se encuentra que la cantidad de células metabólicamente deterioradas es mínima y es la misma para cada tiempo y material probado, por lo que se confirma que el cemento RefA-0.55 y la espuma 0.5T-0.55 no son citotóxicos para los osteoblastos, y que al menos son tan biocompatibles como el TCPS empleado para llevar a cabo cultivos de gran variedad de células.

Finalmente, cabe señalar que el nuevo protocolo de tinción celular y toma de imágenes, descrito en la sección 6.4.3.3, permite reducir el ruido de fondo causado por la adsorción de la tinción en la microporosidad de los cementos.

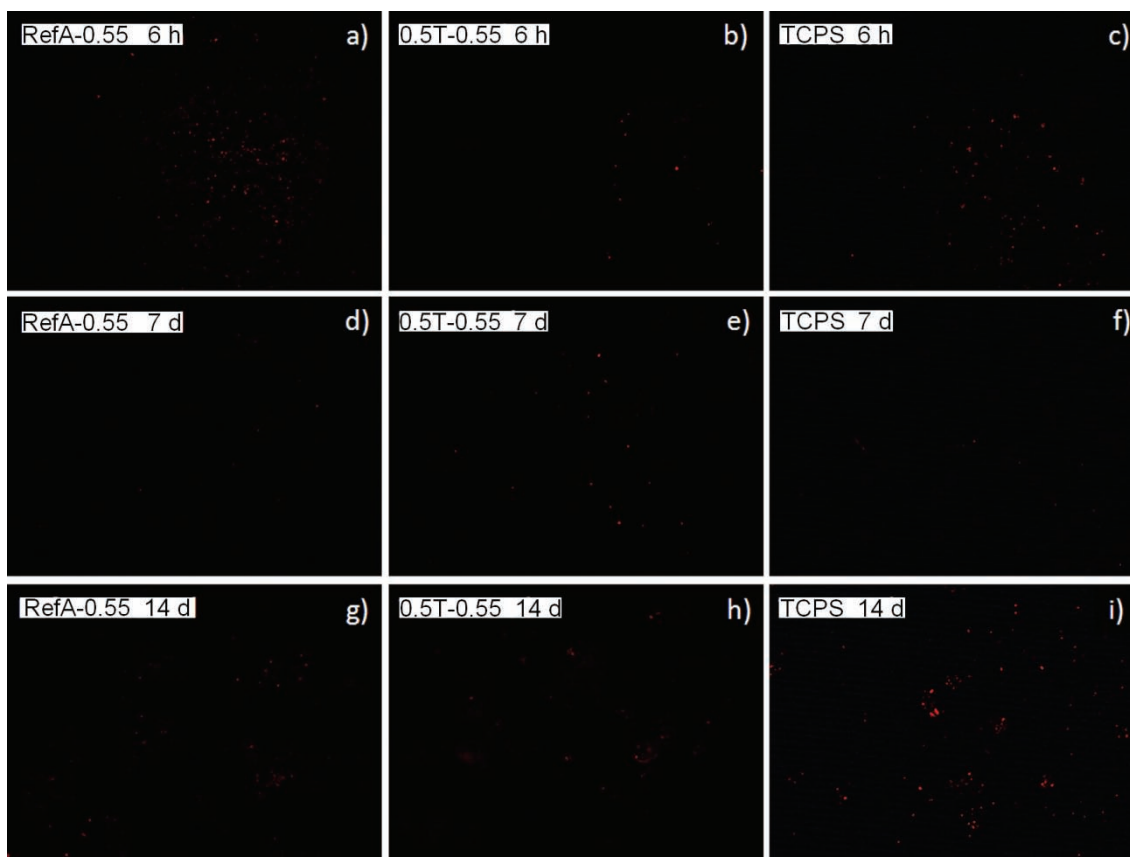


Figura 6.7: Imágenes por EtBr de las células metabólicamente dañadas (puntos rojos) en la superficie de cada material en función del tiempo de cultivo. RefA-0.55: cemento no espumado de referencia, 0.5T-0.55 cemento espumado únicamente con 0.5 % de Tween 80 en la fase líquida (ambos con L/P = 0.55 ml/g y 2.5 % de acelerante) y TCPS: plástico de cultivo.

### 6.5.3.2 Cambio del pH y de la concentración de calcio

El cambio del pH desde el fraguado de los cementos hasta el término del cultivo celular se representa en la figura 6.8. En la figura se distinguen tres zonas de izquierda a derecha, éstas son: 1) el fraguado de los cementos durante 7 días sumergidos en agua destilada (región azul), 2) el preacondicionado de los cementos, y el TCPS, con medio de cultivo durante un día (región naranja) y 3) los 14 días de cultivo celular (región rosa), equivalentes a 22 días totales de experimentación. Como caso especial se encuentra la curva correspondiente al TCPS, la cual inicia el día 8 del experimento puesto que no requiere de ser fraguado.

Cabe mencionar que el medio líquido (agua destilada o medio de cultivo) en contacto con los materiales se cambió cada día y que el valor de pH reportado en la figura 6.8 corresponde al pH del medio remplazado, es decir del sobrenadante que había estado en contacto con los materiales durante un día.

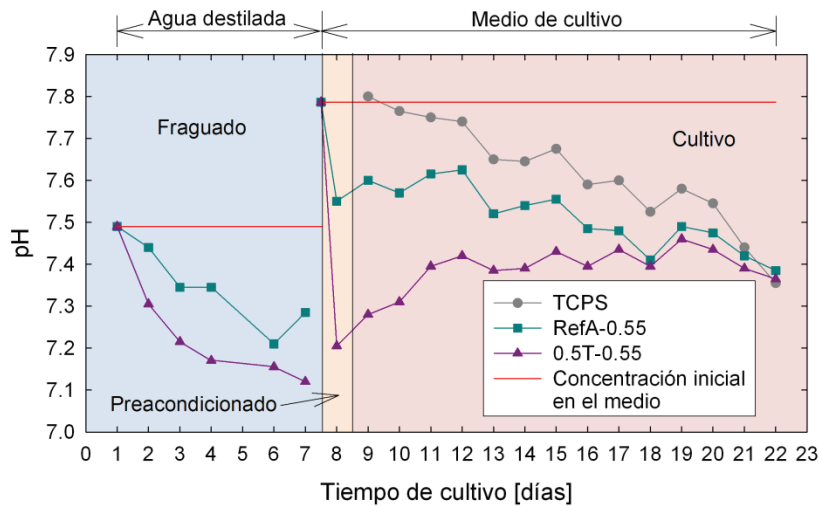
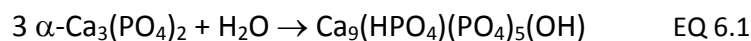


Figura 6.8: Evolución del pH en el medio líquido en contacto con los materiales. La región azul corresponde a los 7 días de fraguado en agua, la región naranja corresponde al preacondicionado con medio de cultivo y la región rosa corresponde a los 14 días de cultivo celular. Se realizaron cambios de medio cada día y el valor de pH reportado corresponde al del medio removido.

Durante el fraguado puede observarse que el valor del pH del agua en contacto con la espuma (0.5T-0.55) o el cemento (RefA-0.55) disminuye, que la caída es cada día mayor y que la espuma genera también un mayor descenso del pH.

Durante el periodo de fraguado, el  $\alpha$ -TCP se hidroliza para transformarse en CDHA de acuerdo a la siguiente reacción química [43-45]:



El mecanismo de reacción implica la disolución del  $\alpha$ -TCP que libera iones calcio y fosfato al medio. Cuando estos iones quedan en disolución suceden inmediatamente varios equilibrios químicos. Los fosfatos reaccionan con los protones del agua para formar aniones hidrógenofosfato y dihidrógenofosfato [46], en paralelo, los iones calcio pueden quelar los hidroxilos del agua, el resultado de éstos equilibrios es que el pH final del agua disminuye.

Una vez que los materiales han fraguado se ponen en contacto con el medio de cultivo celular, que tiene un pH mayor al del agua destilada, por esta razón después del día 7 hay incremento repentino de pH (ver figura 6.8). Durante el periodo de cultivo se observa que el pH del medio en contacto con el TCPS disminuye como consecuencia de la degradación normal del medio. No obstante, la caída del pH en el medio en contacto con el cemento y la espuma es mayor, probablemente a causa de las interacciones iónicas.

A diferencia del fraguado, donde el agua destilada favorece la disolución del  $\alpha$ -TCP, el medio de cultivo es una disolución sobresaturada de iones con respecto a la CDHA producto de la reacción de fraguado. Bajo estas nuevas condiciones, y puesto que la CDHA es poco soluble [46], se favorece la precipitación de los iones sobre el cemento o la espuma. Además es sabido que la HA es bioactiva [47], es decir, es capaz de propiciar la formación de una capa de fosfatos sobre su superficie. Una vez más, el balance de los diferentes equilibrios iónicos que toman lugar genera la caída del pH durante el cultivo celular.



Una prueba de los diferentes equilibrios iónicos referidos anteriormente se muestra en la figura 6.9. En esta figura se muestra la evolución de la concentración de calcio en el agua de fraguado (región azul), el preacondicionado (región naranja) y el cultivo celular (región rosa).

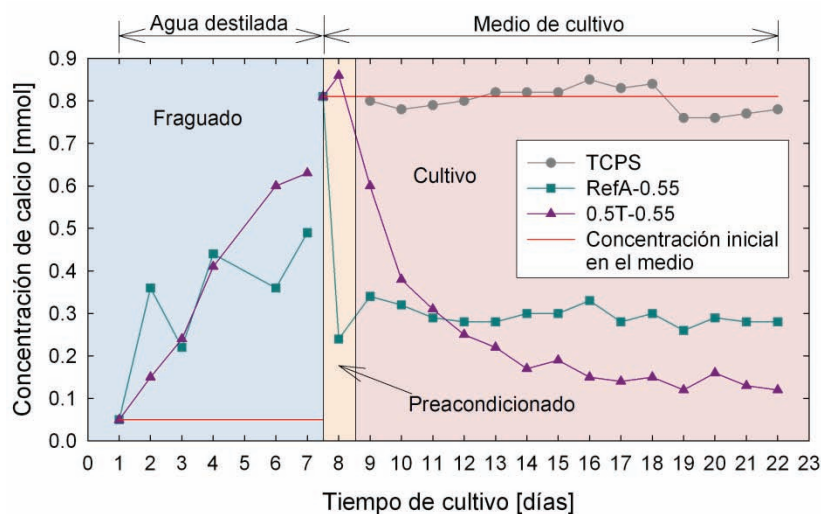


Figura 6.9: Evolución de la concentración de calcio en el medio líquido en contacto con los materiales. La región azul corresponde a los 7 días de fraguado en agua, la región naranja corresponde al preacondicionado con medio de cultivo y la región rosa corresponde a los 14 días de cultivo celular. Se realizaron cambios de medio cada día y el valor de concentración reportado corresponde al del medio removido.

Durante el fraguado se observa que la concentración de calcio en el medio en contacto con el cemento y la espuma se incrementa. Lo cual prueba que parte del calcio del  $\alpha$ -TCP se libera por la diferencia de concentración y muy probablemente el fosfato también se esté liberando. En cuanto a la concentración de calcio durante el cultivo celular, en la figura 6.9 se observa como el calcio del medio en contacto con el TCPS permanece relativamente constante, indicador de que el TCPS es un material inerte. En cambio, la concentración de calcio en el medio en contacto con la espuma y el cemento disminuye cada día relativamente en la misma cantidad.

A diferencia del agua de fraguado el medio de cultivo es rico en calcio, por lo que la tendencia a liberar calcio durante el fraguado se revierte y el calcio del medio de cultivo es captado por el cemento y la espuma, probablemente para formar una capa apatítica debido a la bioactividad de la CDHA [39,47].

En concordancia con los resultados del primer cultivo celular, el mayor cambio del pH y del calcio se observa en el medio en contacto con la espuma, probablemente por la mayor superficie disponible para el intercambio iónico.

Finalmente cabe mencionar que la caída diaria de la concentración de calcio en el medio de cultivo fue mayor al 50 % de la concentración inicial. Se podría esperar que debido a la importancia del calcio en el metabolismo celular el déficit impidiera la proliferación, no obstante, debido a que cada día se renovó el medio, el déficit de calcio no llegó a afectar la proliferación.



### 6.5.3.3 Indicadores de diferenciación

**Fosfatasa alcalina:** La expresión de ALP normalizada por el número de células presente a cada tiempo de cultivo se muestra en la figura 6.10.

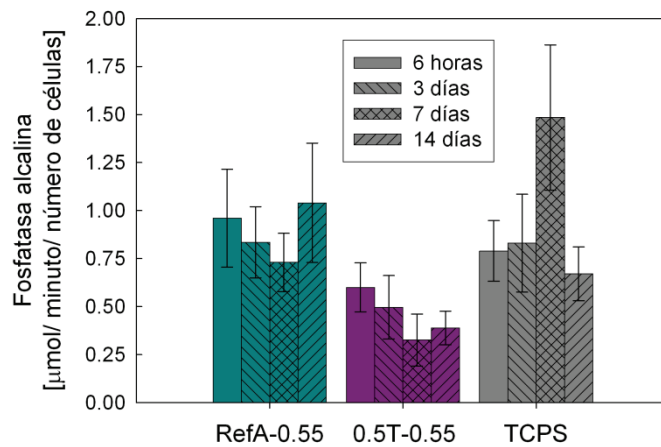


Figura 6.10: Concentración de ALP por cantidad de células presentes en función del tiempo de cultivo. RefA-0.55: cemento no espumado de referencia, 0.5T-0.55 cemento espumado únicamente con 0.5 % de Tween 80 en la fase líquida (ambos con L/P = 0.55 ml/g y 2.5 % de acelerante) y TCPS: plástico de cultivo.

En la figura 6.10 se puede ver que la expresión de ALP no señala ninguna tendencia, además, debido a la elevada desviación de los resultados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes materiales estudiados. Por tanto, los resultados obtenidos de ALP no son concluyentes. Una posible explicación de no haber encontrado el comportamiento típico de expresión de la ALP, es decir un incremento hasta alcanzar un máximo y el posterior decremento [30], es que los tiempos a los cuales se cuantificó la expresión de esta proteína, no coincidieron con los picos y valles de la curva.

**Osteocalcina:** La figura 6.11 muestra imágenes de fluorescencia del cemento de referencia tomadas a través de microscopía confocal después de 14 días de cultivo sin agregar factores osteogénicos.

En la imagen superior izquierda de la figura 6.11 se observan los núcleos celulares como puntos de color azul intenso, sin embargo, en algunas zonas (alrededor de M en la figura 6.11) aún se puede distinguir la superficie del material debido a la adsorción de la tinción en la microporosidad del cemento. Por el contrario, en la imagen inferior izquierda, únicamente se aprecia en color verde la osteocalcina en el citoplasma celular, prueba de la eficaz selectividad del anticuerpo empleado. Finalmente, al superponer ambas imágenes se obtiene la imagen compuesta del lado derecho de la figura 6.11, donde se corrobora que la osteocalcina se encuentra en las células, debido a que concuerda con la posición de los núcleos. Además, la tinción de la osteocalcina permite distinguir la morfología celular, apreciándose células extendidas y células alargadas que indican una buena adhesión al cemento RefA-0.55 a través de sus filopodios como reporta Hockin [48].

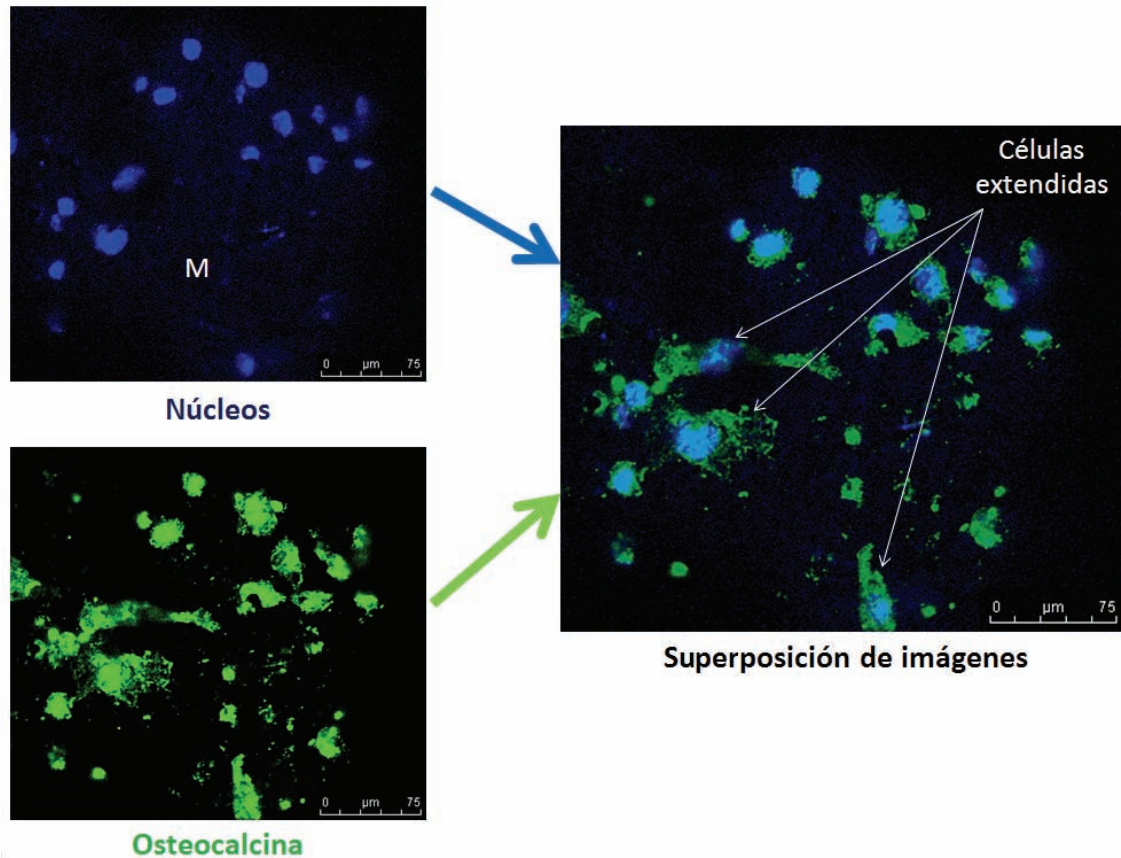


Figura 6.11: Tinción en color azul de los núcleos celulares (izquierda arriba), y en verde para la osteocalcina (izquierda abajo) sobre el cemento de referencia (RefA-0.55). A la derecha se presenta el acoplamiento de ambas imágenes donde se aprecia la concordancia entre los núcleos y la osteocalcina, también se ve la morfología de células extendidas y adheridas sobre la superficie. M: material.

La figura 6.12a muestra los núcleos celulares (en azul a la izquierda) y la osteocalcina (en verde a la derecha) a diferentes profundidades focales en el interior y periferia de un macroporo en la espuma 0.5T-0.55. En las imágenes se ve claramente la presencia de osteocalcina, pero también se aprecia el contorno de la superficie del cemento, tanto en verde como en azul. Probablemente el contorno se hace visible cuando la profundidad de foco coincide con la altura de la superficie, lo cual no sucedía en la muestra de referencia debido a que el barrido se realizó en una menor profundidad. Pese a ello, al superponer las imágenes tomadas a diferentes posiciones de foco y las diferentes tinciones realizadas, es fácil distinguir entre la superficie y la osteocalcina producida por las células (ver figura 6.12b). En la figura 6.12b se marca con la letra “M” una zona del material libre de células, la cual se diferencia de las células extendidas por: 1) la menor intensidad de la coloración en las tinciones, 2) la morfología de las células vista a través de la osteocalcina, y 3) los núcleos azul intenso que concuerdan con la posición de la osteocalcina.

Finalmente, en la figura 6.12b se señala con la letra “C” células en confluencia dentro de un macroporo, lo que parece indicar que las células Saos-2 prefieren crecer y mineralizar al interior de los macroporos.

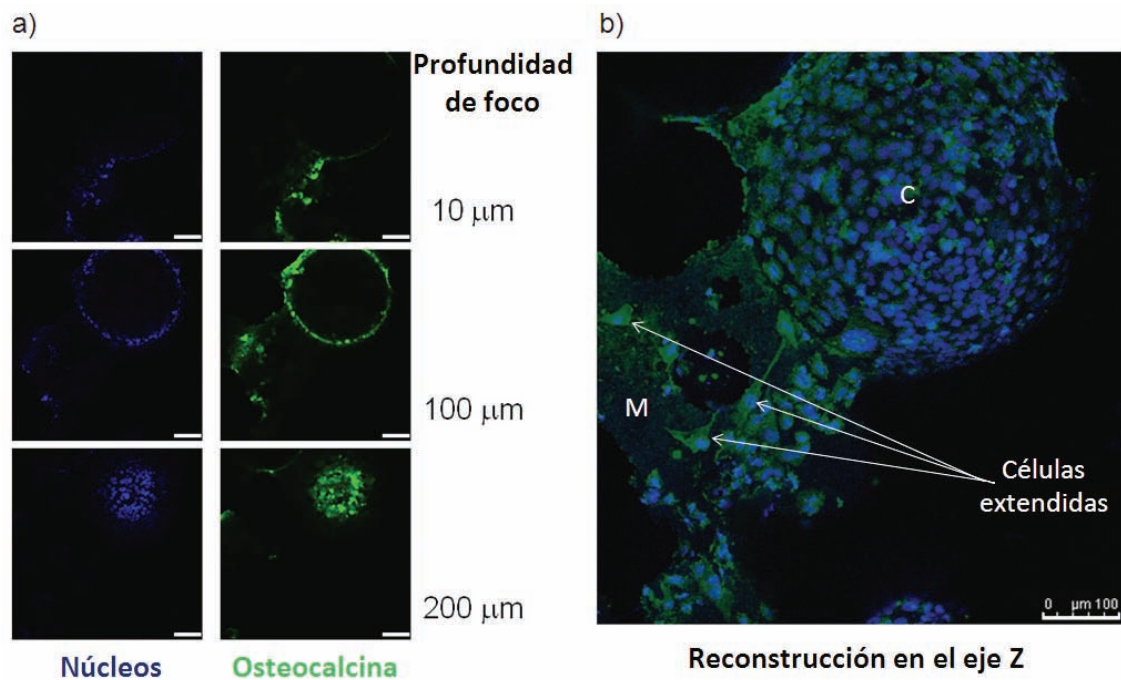


Figura 6.12: Imágenes por microscopía confocal de la espuma de CDHA obtenida únicamente con Tween 80 (0.5T-0.55). a) En el lado izquierdo se presentan en color azul los núcleos celulares dentro de un macroporo para diferentes profundidades de foco, mientras que a la derecha se aprecia la distribución de la osteocalcina. b) Acoplamiento de diversas imágenes correspondientes a diferentes profundidades de foco y a ambas tinciones empleadas, donde se observan células adheridas y expandidas sobre el material (M), células en confluencia el interior de un macroporo (C) y la concordancia entre la posición de los núcleos y la posición de la osteocalcina.

La presencia de osteocalcina es un indicador más fuerte de mineralización que la presencia de ALP, porque la osteocalcina está considerada como una proteína específica de la mineralización osteoblástica [29]. Por tanto, la presencia de osteocalcina, sin la incorporación de componentes osteogénicos en el medio de cultivo, demuestra que el cemento RefA-0.55 y la espuma 0.5T-0.55 son materiales capaces de soportar el proceso de mineralización llevado a cabo por los osteoblastos. Cabe mencionar que no se buscaron lagunas de mineralización mediante las técnicas tradicionales de tinción (von Kossa), debido a la dificultad para discriminar entre la CDHA correspondiente al sustrato y la calcificación osteoblástica.

#### 6.5.3.4 Comparación de los resultados con la bibliografía

Al igual que en este trabajo, la mayoría de los cultivos celulares reportados se realizan después de fraguar los cementos [48], con lo cual se pierde la información de lo que puede suceder durante la reacción de fraguado. Sin embargo, algunos trabajos muestran que el contacto directo de células con el cemento durante el fraguado propicia la inhibición de la proliferación y diferenciación celular [49,50], hecho que se relaciona con la liberación de fosfatos al medio de reacción [49,51].

Para un cemento comercial en base a 62 % de  $\alpha$ -TCP más 27 % de fosfato dicálcico anhídrido (DCPA), se reporta que los intercambios iónicos inhiben la proliferación, aún después de 3 meses de prefraguado en medio líquido [49]. A diferencia, realizando cambios de medio cada 24 horas, después de una semana de reacción el cemento RefA-0.55 y la espuma 0.5T-0.55 (ambos en base a 98 %  $\alpha$ -TCP) permiten la buena adhesión, la proliferación y diferenciación celular. La diferencia entre los resultados se debe, por un lado, al cambio frecuente del medio de cultivo que amortigua la caída del pH y de la concentración de calcio. Y por otro lado, a que el DCPA es un fosfato ácido que probablemente disminuye en mayor medida el pH, llegando a afectar el metabolismo celular. Por tanto, asemejar ligeramente las condiciones de ensayo a las condiciones de un cultivo dinámico, puede evitar posibles efectos adversos de la acidificación del medio y el déficit de calcio. A pesar de que dicho cemento comercial no es citocompatible *in vitro*, *in vivo* ha demostrado fraguar y transformarse en CDHA sin generar inflamación crónica [49]. Por lo que probablemente el intercambio iónico es amortiguado inmediatamente por el sistema sanguíneo y linfático.

Una estrategia que se propone para mejorar la citocompatibilidad de los cementos en base a  $\alpha$ -TCP es sinterizar la estructura para obtener la fase  $\beta$  de este fosfato [49], la cual es menos soluble que la fase  $\alpha$  [52]. Siguiendo esta estrategia, se reporta que la temperatura óptima de sinterización para mejorar la proliferación y diferenciación en estos materiales es de 1100 °C [49]. Esta metodología es una buena solución para fabricar andamios de aplicación *in vitro* en ingeniería de tejidos. Sin embargo, para las espumas compuestas significa la pérdida de la similitud biológica, al calcinar la materia orgánica, y elimina la posibilidad de implantarlas por inyección mediante técnicas de mínima invasión quirúrgica.

Un enfoque diferente para evitar el daño celular ocasionado por los intercambios iónicos, cuando se desea incorporar células vivas en el interior de la pasta cementante, es la protección celular mediante geles de alginato, insertados como microesferas en un cemento en base a fosfato tetracálcico [50].

#### 6.5.4 Implantación de las espumas en modelo animal

En la figura 6.13 se ilustran las etapas más importantes del proceso de implantación de las espumas compuestas. La figura 6.13a muestra la preparación de la cavidad donde se implantaran por inyección los materiales. En la figura 6.13b se presenta una imagen que muestra cómo la sangre fue removida de la cavidad, mientras que la figura 6.13c muestra la cavidad de tamaño crítico justo antes de la implantación. Por otro lado, en la figura 6.13d se observa como las espumas fueron fácilmente implantados por inyección dentro de la cavidad, al mismo tiempo, la figura 6.13e muestra que las espumas tuvieron la cohesión necesaria para permanecer dentro de la cavidad y no ser expulsados por la presión sanguínea, sin necesidad de colocar membranas adicionales. Finalmente, la figura 6.13f muestra la colocación subcutánea del disco de espuma compuesta prefraguada, antes de cerrar la incisión.



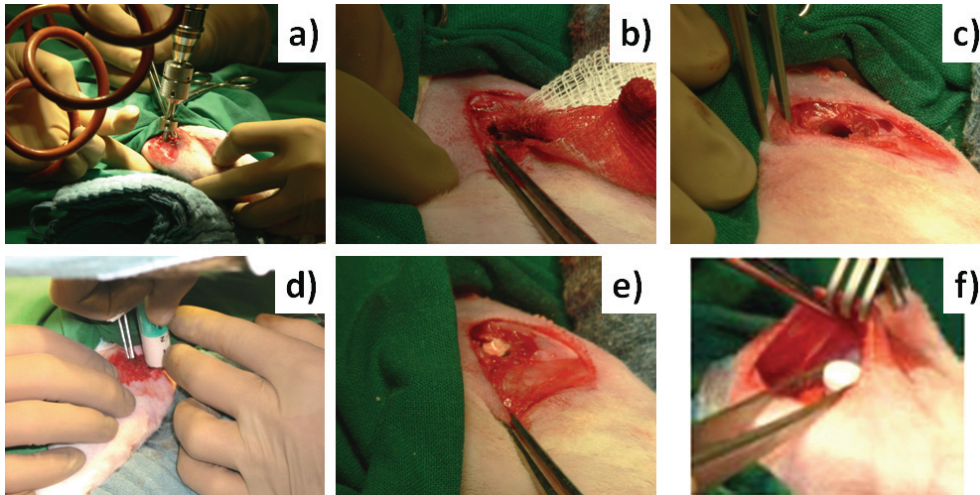


Figura 6.13: Etapas más relevantes del proceso de implantación: a) preparación del defecto de tamaño crítico, b) limpieza de la sangre al interior del defecto, c) defecto libre de sangre, d) implantación de las espumas por inyección, e) muestra de la cohesión de la pasta en la cavidad y f) colocación del implante subcutáneo antes de cerrar la incisión.

#### 6.5.4.1 Observación macroscópica

*Postoperatorio:* La figura 6.14 muestra las extremidades caudales de un conejo después de 11 días de ser implantado el cemento de referencia (RefA-0.50). En la imagen se observa el implante subcutáneo como un pequeño bulto bajo la piel y a lo largo del experimento no se notó en ningún caso la migración del implante. La imagen de la zona de implantación es también un ejemplo representativo de la inflamación y la coloración observado en todos los animales entre 7 y 15 días posteriores a la cirugía. Es probable que el intercambio iónico causado por el fraguado de las espumas inyectadas fuese la causa de la inflamación. Pese a ello, la inflamación fue aguda y cedió en un periodo menor a 15 días, continuando el proceso normal de cicatrización de la herida. En todos los casos los animales mantuvieron los hábitos normales de alimentación y comportamiento [34], señal del buen estado de salud.

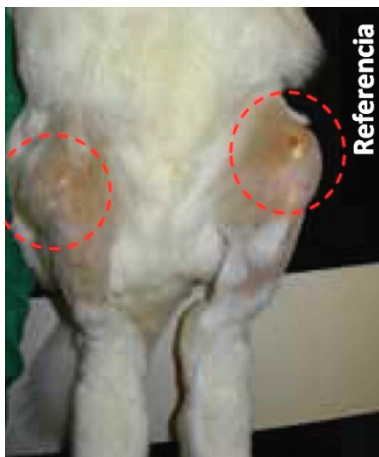


Figura 6.14: Imagen del postoperatorio (11 días) donde se aprecian señales de inflamación en la zona de la implantación. En este caso particular la imagen corresponde al cemento de referencia. No obstante, fue una reacción generalizada.

*Extracción de la zona del implante:* Transcurrido un mes de la implantación se sacrificó el primer grupo de animales y se tomaron imágenes de los implantes subcutáneos e inyectados.

La figura 6.15 muestra un disco de espuma prefraguada por cada formulación implantada subcutáneamente durante un mes. En ningún caso se observaron señales de inflamación crónica o aguda en la periferia del implante. Además, los discos fueron cubiertos e inmovilizados por tejido blando vascularizado, lo cual indica que ninguna formulación de cemento estudiada es tóxica.

Macroscópicamente no se observaron señales de osteogénesis. En este sentido cabe señalar que el conejo no es un modelo adecuado para evaluar la osteoinducción [53], por tanto, que no se haya observado la formación de hueso subcutáneamente no significa que las espumas no sean osteoinductivas.

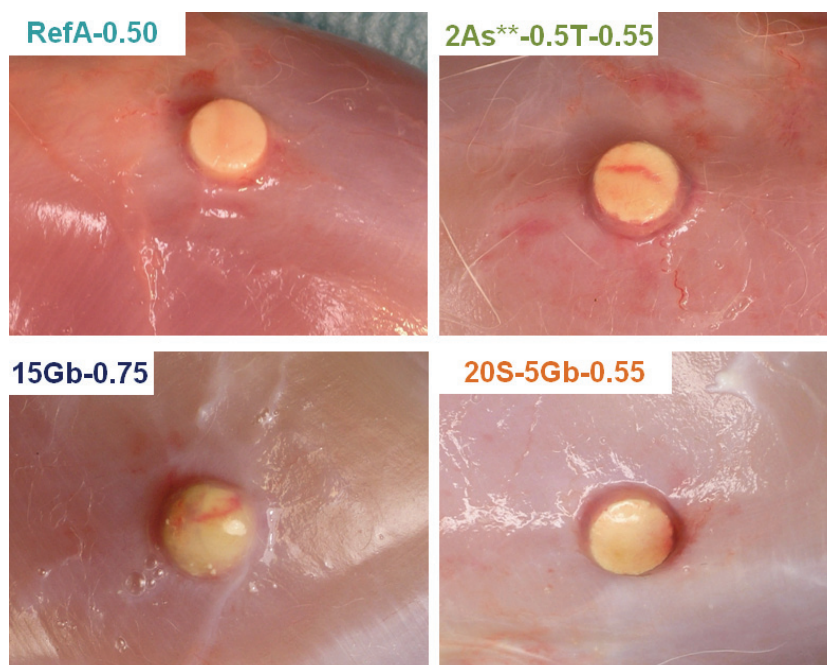


Figura 6.15: Apariencia macroscópica después de un mes de los implantes subcutáneos. No se observan signos de rechazo ni de osteoinducción.

Por otro lado, la figura 6.16 muestra la sección longitudinal del cóndilo femoral donde fueron implantados por inyección las diferentes formulaciones de espuma y el cemento de referencia durante un mes; la zona exacta de la implantación se señala por medio del círculo discontinuo. En cada caso se observa que la cavidad fue completamente llenada por la pasta y que ésta se adaptó perfectamente al contorno del defecto. No se encuentran indicios de inflamación aguda o crónica, por lo que los cementos reafirman la biocompatibilidad. Finalmente, la observación macroscópica parece indicar el inicio de la reabsorción y la osteogénesis sobre la periferia de los implantes, principalmente en las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55.



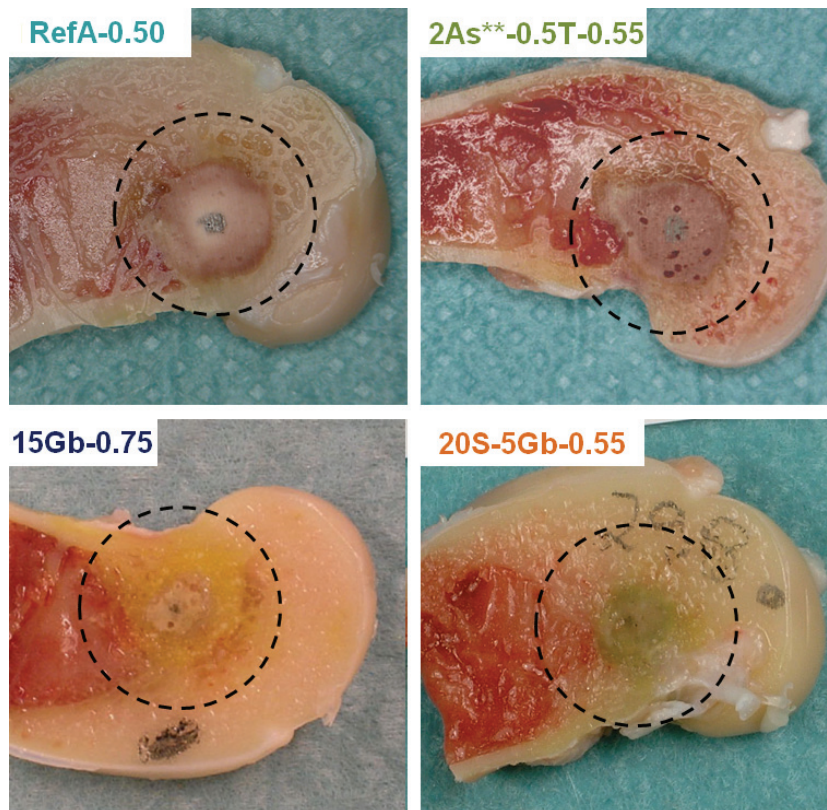


Figura 6.16: Apariencia macroscópica después de un mes de la zona de implantación por inyección, donde la posición exacta de los implantes se marca con el círculo discontinuo. Se puede apreciar la perfecta adaptación de las espumas y el cemento a la cavidad y el correcto llenado de la misma. Además, no se aprecian signos de inflamación.

#### 6.5.4.2 Observación por $\mu$ -CT

Las imágenes por  $\mu$ -CT fueron inicialmente realizadas para determinar la densidad ósea. Sin embargo, en el presente trabajo se reportan sólo algunas imágenes tomadas después de un mes de implantación, con el único objetivo de confirmar que las espumas inyectadas son capaces de llenar y adaptarse a la forma del defecto óseo.

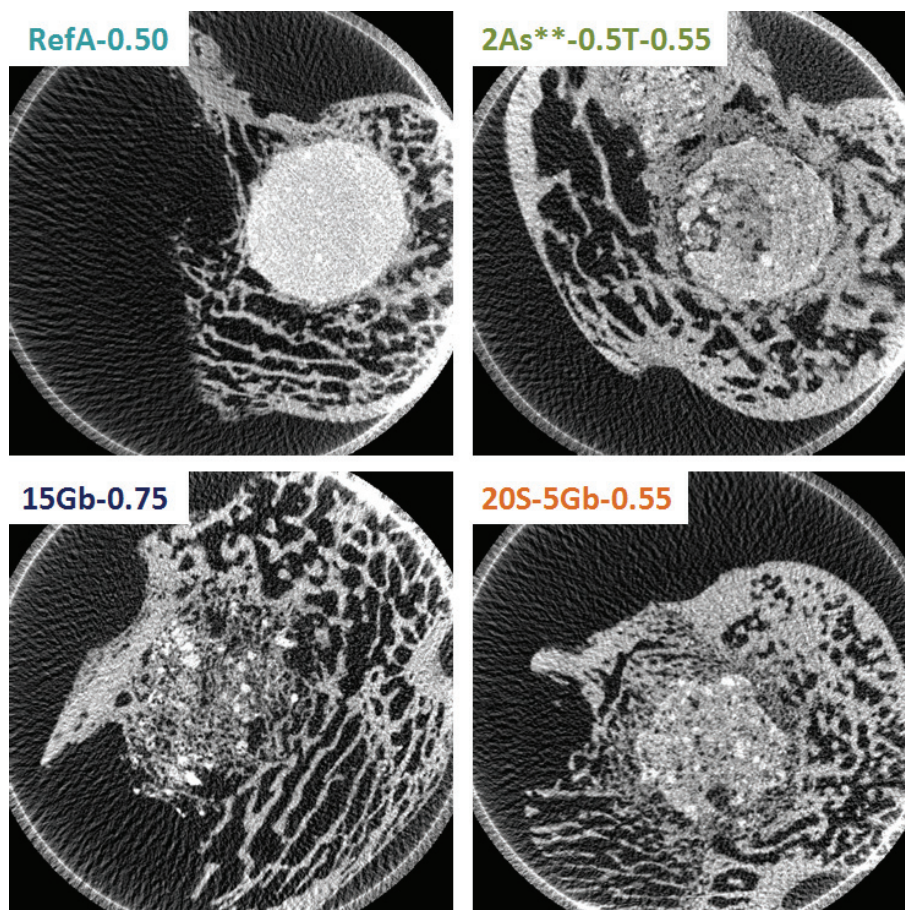


Figura 6.17: imágenes por  $\mu$ -CT de la zona de implantación después de un mes. Las espumas y el cemento se observan como zonas de mayor densidad. Se aprecia el contacto directo de las espumas y el cemento con las trabéculas óseas circundantes. También se nota la diferencia en porosidad entre las diferentes formulaciones de espuma.

La figura 6.17 muestra una imagen de  $\mu$ -CT de la sección longitudinal del cóndilo femoral, o lo que es igual, la sección transversal del implante para cada formulación de espuma después de un mes de implantación. Como primer punto a señalar está la diferencia entre la estructura trabecular ósea del cóndilo femoral y la porosidad de las espumas implantadas, que se utiliza para confirmar la unión directa entre la espuma y el hueso circundante a causa del buen llenado del defecto.

En segundo lugar, y como consecuencia de las diferencias en porosidad, se observa la variación en la intensidad del brillo entre las diversas formulaciones de espuma. De este modo, el cemento no espumado RefA-0.50 es el material más brillante y por tanto el más compacto, mientras que la espuma 15Gb-0.75 es la menos intensa y la más porosa. Por otro lado, con porosidad intermedia entre el cemento RefA-0.50 y la espuma 15Gb-0.75 se encuentran las espumas 2As\*\*-0.5T-0.55 y 20S-5Gb-0.55. Se distingue también como la espuma 20S-5Gb-0.55 se asemeja más en macroporosidad a la espuma 15Gb-0.75, a pesar de haber sido preparadas con proporciones L/P diferentes, y que la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 es similar al cemento RefA-0.50, pero en contraste la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 posee algunos macroporos.

### 6.5.4.3 Conversión de las espumas implantadas a hidroxiapatita

La figura 6.18 muestra los diagramas de DRX de la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 y el cemento RefA-0.50 después de un mes de implantación y de una muestra del cóndilo femoral usada como blanco, en los que se indica qué picos corresponden a cada fase cristalina presente.

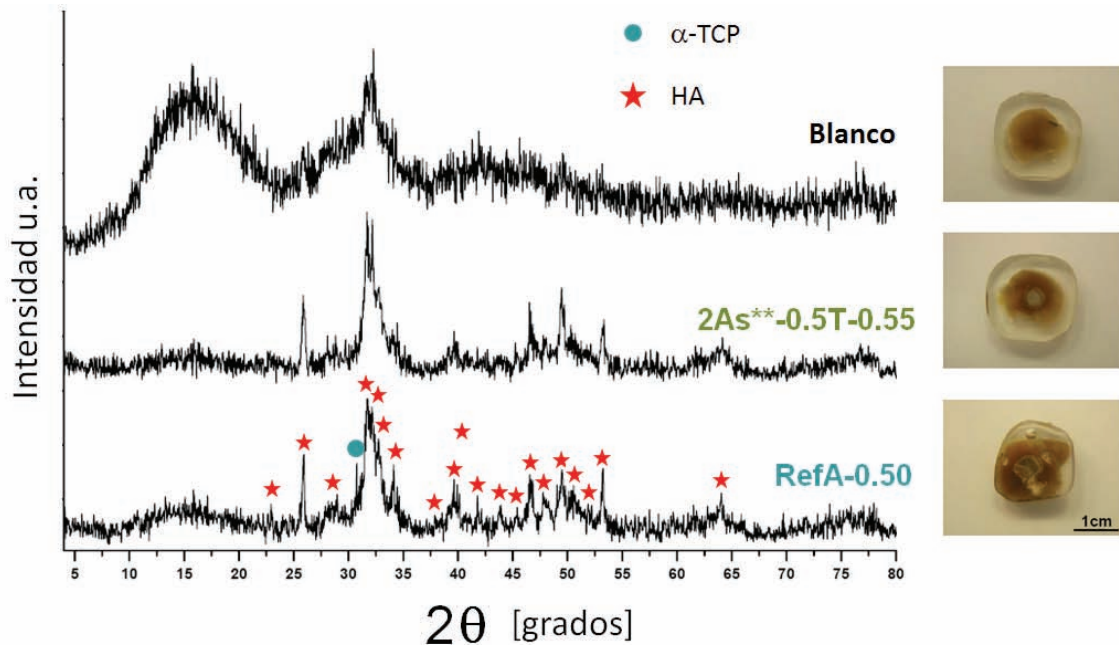


Figura 6.18: Diagramas de DRX realizados sobre las muestras explantadas después de un mes. Las muestras embebidas en resina se presentan en el lado derecho; de las cuales el blanco corresponde al cóndilo femoral del conejo (apatita biológica).

El diagrama correspondiente al blanco presenta un pico muy ancho en la zona correspondiente a las reflexiones principales de la HA, lo cual es normal porque el cóndilo está formado por apatita biológica de baja cristalinidad. Sin embargo, el diagrama no presenta las reflexiones de menor intensidad de la HA por debajo de  $30^\circ$  y por encima de  $35^\circ$ , en escala  $2\theta$ .

Por otro lado, en los diagramas correspondientes a la espuma y al cemento se observa un pico más agudo en la zona de la HA. Además, se observan las reflexiones de menor intensidad de la HA, que en el blanco están ocultas por el ruido de fondo, señal de que la reacción de fraguado tuvo lugar *in vivo* y que el componente inicial del cemento o de la espuma,  $\alpha$ -TCP, se hidroliza para formar HA. Por tanto, como se esperaba, la reacción de fraguado tiene lugar cuando el cemento o la espuma son implantados en el tejido óseo vivo. No obstante, en el diagrama correspondiente al cemento RefA-0.50, aún se nota la presencia de trazas de  $\alpha$ -TCP después de un mes de implantación.

### 6.5.4.4 Observación histológica

La figura 6.19 muestra cortes histológicos representativos para cada formulación de espuma implantada durante 5 meses. En las imágenes, las trabéculas óseas se aprecian de color azul claro, la porosidad intratrabecular se ve de color blanco y los cementos de color marrón.



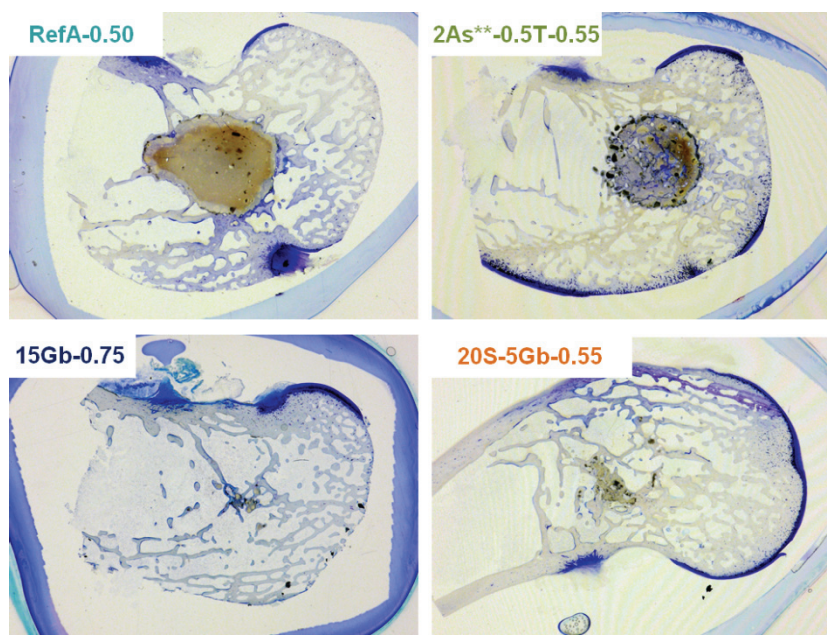


Figura 6.19: Imágenes histológicas macroscópicas (tinción Paragon One) de la región de implantación por inyección después de 5 meses. Las trabéculas óseas se observan de color azul claro, la porosidad intratrabecular se ve de color blanco y los cementos de color marrón.

En la imagen correspondiente al cemento no espumado de referencia (RefA-0.50) se aprecia la poca reabsorción del material aún después de 5 meses de implantación. No obstante, en la periferia del implante se distingue la reabsorción activa del material y la formación de hueso nuevo. También se aprecia la nula macroporosidad del cemento y el contacto directo con el tejido circundante, al igual como se observó mediante  $\mu$ -CT. A mayor magnificación se detectaron pocas células inflamatorias (macrófagos) y alta actividad osteoblástica en la periferia.

Por su parte, la imagen correspondiente a la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 muestra la poca reabsorción del implante, se aprecian también fragmentos del material de diversos tamaños y poca formación de hueso nuevo. En algunos casos, a mayores aumentos, se observó la presencia de tejido blando entre el material y el hueso circundante, también se encontraron algunas células inflamatorias y poca actividad osteoblástica.

Por otro lado, la imagen correspondiente la espuma 15Gb-0.75 muestra prácticamente la completa reabsorción del implante y la sustitución por trabéculas óseas neoformadas. No obstante, se observan algunos fragmentos remanentes del material. Este resultado convierte a la espuma 15Gb-0.75 en la formulación más reabsorbible y promotora de la regeneración ósea, a pesar del poco contenido de macroporosidad abierta introducida por el espumado (ver capítulo 5). A mayores aumentos (ver figura 6.20 lado izquierdo) se aprecia un estrecho contacto entre las partículas remanentes y el tejido formado, la degradación activa de las mismas y una alta actividad osteoblástica. No se encontraron señales de inflamación generadas por las partículas remanentes.

Finalmente, la imagen histológica de la espuma 20S-5Gb-0.55 en la figura 6.19 muestra casi la completa degradación del implante. No obstante, en la mayoría de los casos la degradación y sustitución por tejido nuevo fue ligeramente menor en comparación con la espuma 15Gb-0.75. A mayores aumentos (ver figura 6.20 lado derecho) se observó actividad osteoclástica, señal de que continúa la reabsorción activa de las partículas remanentes. Además, las partículas aparecen embebidas en hueso nuevo, señal del excelente contacto con el tejido circundante.

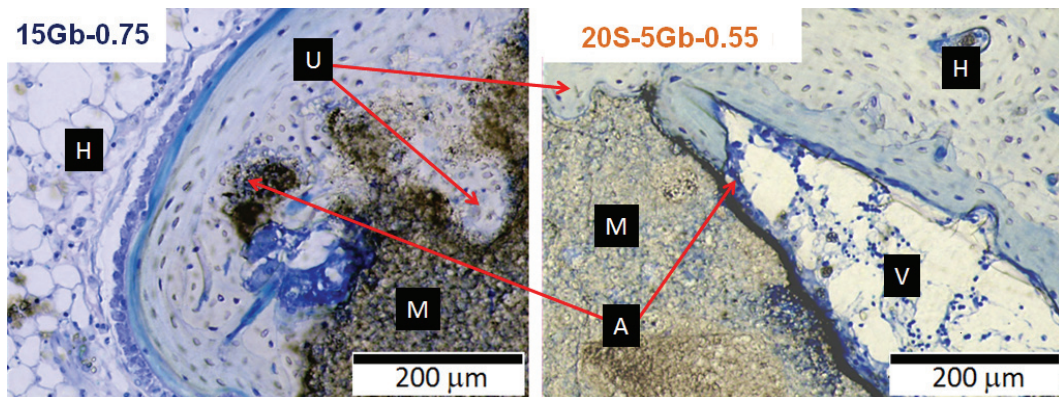


Figura 6.20: Imágenes histológicas (tinción Paragon One) de las partículas remanentes de material después de 5 meses de implantación. H: hueso circundante, M: material remanente, U: unión directa del material con el huso circundante, A: actividad celular y V: posible vaso sanguíneo. Imágenes correspondientes a las espumas 15Gb-0.75 (izquierda) y 20S-5Gb-0.55 (derecha).

En resumen, todas las formulaciones de cemento estudiadas se implantan fácilmente por inyección y se adaptan perfectamente a la geometría del defecto, manteniendo un estrecho contacto con el tejido óseo circundante. Las espumas son capaces de fraguar *in vivo*. Una prueba de ello es que se observó inflamación en la zona de la implantación durante una semana, lo cual concuerda con el periodo de reacción bajo condiciones fisiológicas simuladas (ver capítulo 5) y la caída de pH observada *in vitro*. No obstante, la inflamación fue aguda y desapareció en menos de 15 días. Las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55 se degradan rápidamente por mecanismos activos, se osteointegran completamente y son capaces de permitir el crecimiento de hueso hacia su interior. Por otro lado, el cemento de referencia se degrada mucho más lentamente que las espumas antes mencionadas, aunque es capaz de osteointegrarse completamente, pero solo por la periferia del implante, por lo que solo actúa como material de relleno y no como soporte para la regeneración. Finalmente, la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 es poco biodegradable, pero además no es capaz de osteointegrarse por completo y en algunos casos origina señales de inflamación, por lo que no es el mejor material para regenerar lesiones óseas de tamaño crítico.

En el capítulo 5 se sugirió una jerarquización de mejor a peor formulación de espuma para la regeneración ósea en base a la macroporosidad y la conectividad entre poros por ventanas de diámetro mayor a 5  $\mu\text{m}$ . El orden propuesto en función de la macroporosidad abierta se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 6.8: Formulaciones de cemento y espumas ordenadas de mayor a menor macroporosidad abierta. Se esperaba que a mayor macroporosidad la regeneración del defecto óseo fuera mejor. Datos obtenidos del capítulo 5 de esta memoria.

Composición	Macroporosidad abierta [%] determinada por MIP (5 – 360 $\mu\text{m}$ )	Nano/microporosidad abierta [%] determinada por MIP (6 nm – 5 $\mu\text{m}$ )	Macroporosidad total [%] determinada por inmersión en Hg	Diámetro de los macroporos [ $\mu\text{m}$ ] medido por análisis de imagen
<b>20S – 5Gb – 0.55</b>	31.96	30.41	33.0	50 - 250
<b>15Gb – 0.75</b>	9.62	49.51	27.2	80 - 480
<b>2As** – 0.5T – 0.55</b>	3.63	45.97	12.4	40 - 150
<b>RefA – 0.50</b>	0.65	45.74	0.0	–

Gb: gelatina bovina tipo B; As\*\*: alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular; T: Tween 80; S: extracto de soja.

El estudio *in vivo* mostró que las espumas 20S-5Gb-0.55 y 15Gb-0.75 se osteointegran, degradan y permiten el rápido crecimiento de nuevo hueso en lesiones de tamaño crítico. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en la rapidez de regeneración entre ellas. Incluso, a pesar de que la espuma 20S-5Gb-0.55 posee un 32 % de macroporosidad abierta y que la macroporosidad abierta en la espuma 15Gb-0.75 es de tan sólo 10 %. Existen tres posibles explicaciones para este resultado.

1. A pesar de que la macroporosidad abierta de la espuma 15Gb-0.75 es menor, la cantidad de macroporosidad total es similar a la de la espuma 20S-5Gb-0.55. Por tanto ambas tienen el mismo espacio vacío para permitir la penetración de nuevo hueso.
2. El diámetro de los macroporos en la espuma 15Gb-0.75 es mayor que en la espuma 20S-5Gb-0.55, lo cual brinda mayor superficie para la actividad celular. Por tanto si las células son capaces de penetrar en los macroporos internos, es probable que se acelere el proceso de remodelación ósea [54].
3. La mayor proporción L/P empleada en la espuma 15Gb-0.75 genera mayor cantidad de nano/microporosidad, lo cual puede acelerar la reabsorción activa del material y permitir la penetración celular.

La espuma 15Gb-0.75 tiene la ventaja sobre la espuma 20S-5Gb-0.55 de ser más fácil de preparar, puesto que se evita la mezcla de dos disoluciones biopoliméricas diferentes, hecho que incrementa las posibilidades de introducir el material al mercado clínico. Sin embargo, debido a la menor proporción L/P de preparación de la espuma 20S-5Gb-0.55, ésta presenta mayor resistencia mecánica, pudiendo llegar a ser una mejor alternativa para la regeneración de lesiones sometidas a esfuerzos.



El cemento RefA-0.50 resultó ser mejor alternativa para el relleno de defectos óseos que la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55; confirmando la propiedad de osteointegración y la baja rapidez de reabsorción observada en estudios previos de implantación en conejos [54-57]. Contrariamente a lo esperado, la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 no se osteointegró ni se biodegradó, provocando indicios de inflamación en el tejido circundante. Es posible que la baja macroporosidad, en conjunto con el menor diámetro de macroporo y la escasa macroporosidad abierta, sean las causas de la baja penetración ósea. Mientras que los fragmentos de material encontrados son la causa probable de la inflamación y la encapsulación del material [58].

Por último, para seleccionar una formulación apta para uso clínico se propone comparar solo las espumas 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55 en un modelo animal con mayor similitud microestructural y mecánica al tejido óseo humano, probablemente cabra u oveja [35]. Además, aprovechando las mayores dimensiones del esqueleto de estas especies podría compararse la eficacia en la regeneración de las espumas de HA en relación con injertos óseos autólogos [59], incluso en condiciones bajo carga y sin carga para la espuma 20S-5Gb-0.55. Los posibles sitios de implantación podrían simular condiciones de reconstrucción de huesos largos o la reconstrucción maxilofacial. Finalmente se podría evaluar si las espumas son osteoinductivas o no.

Para obtener una explicación más extensa sobre el estudio *in vivo* y un análisis cuantitativo profundo de los resultados se recomienda revisar la tesis doctoral de Göckelmann M. [60].

## 6.6 Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo son:

### Preparación de espumas bajo condiciones estériles:

- La esterilización de los componentes base de los cementos por radiación gamma resultó ser eficaz. Además, la radiación no modificó las propiedades de los materiales ni propició inconvenientes al proceso de espumado, sino que facilitó determinar cuándo la mezcla del polvo con la espuma fue homogénea.
- Los cementos macroporosos compuestos son fáciles de preparar bajo condiciones de esterilidad, ya sea para realizar cultivos celulares o para ser implantados *in vivo* dentro de quirófanos con servicios estándar.

### Cultivo de células Saos-2 sobre las espumas de HA:

- Las espumas de HA originan una ligera caída del pH del medio de cultivo celular, la disminución es mayor en cementos macroporosos y tiende a un equilibrio con el paso del tiempo de inmersión.

- Las espumas de HA adsorben el calcio del medio de cultivo. La adsorción sucede en menos de 24 horas y en el intervalo estudiado no disminuye con el paso del tiempo de inmersión.
- Bajo condiciones apropiadas de cultivo, las células Saos-2 son capaces de proliferar sobre las espumas de HA, tendiendo a colonizar los macroporos de la estructura. Incluso pueden llegar a situaciones de confluencia en periodos de 14 días. Además, las células son capaces de diferenciarse mostrando la producción de osteocalcina.

Implantación de las espumas mediante inyección:

- Todas las formulaciones de espumas autofraguables *in situ* estudiadas presentaron cohesión *in vivo*, manteniéndose al interior de la cavidad donde fueron implantadas, y reaccionando para formar HA en un periodo menor a un mes de implantación.
- Las imágenes macroscópicas y de  $\mu$ -CT confirmaron que las espumas de HA inyectadas son capaces de adoptar la forma del defecto donde son implantadas, manteniendo la porosidad después de la inyección y logrando un contacto directo con el tejido óseo circundante.
- Ninguna formulación de espuma mostró señales de toxicidad cuando fueron implantadas subcutáneamente. En cambio cuando fueron inyectadas, la espuma 2As\*\*-0.5T-0.55 originó ligeras señales de inflamación crónica.
- A diferencia del cemento no macroporoso de referencia que se osteointegra únicamente por la periferia, en las espumas de HA el hueso neoformado penetra a través de los poros. Además, las espumas de HA son reabsorbidas en tanto que el cemento no macroporoso se mantiene casi intacto.
- Las espumas autofraguables *in situ* con características adecuadas para la futura caracterización en modelos *in vivo* más desarrollados son 15Gb-0.75 y 20S-5Gb-0.55.

## 6.7 Agradecimientos

Agradezco al personal del Laboratorio de Fisiopatología Ortopédica del Instituto Ortopédico Rizzoli – Italia por la instrucción en cultivos celulares.

Agradezco también al personal del Instituto de Investigación Ortopédica y Biomecánica de la Universidad de Ulm – Alemania por la acogida y las facilidades prestadas durante el desarrollo de las implantaciones del estudio *in vivo*.

## 6.8 Referencias

1. Verbeeck N. Hope for a cure, from molecule to medicine. Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development. DeFacto Communications Ltd., 2008.
2. van Doornmalen J., Kopinga K. Review of surface steam sterilization for validation purposes. American Journal of Infection Control 2008; **36**: 86-92.
3. Zahraoui C., Sharrock P. Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. Bone 1999; **25**: 63S-65S.

4. de Zoysa H., Morecroft E. Cleaning, disinfection and sterilization of equipment. *Anesthesia and Intensive Care Medicine* 2007; **8**: 453-456.
5. Mendes G.C.C., Brandpo T.R.S., Silva C.L.M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *American Journal of Infection Control* 2007; **35**: 574-581.
6. Croonenborghs B., Smith M.A., Strain P. X-ray versus gamma irradiation effects on polymers. *Radiation Physics and Chemistry* 2007; **76**: 1676-1678.
7. Haji-Saeid M., Sampa M.H., Chmielewski A.G. Radiation treatment for sterilization of packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry* 2007; **76**: 1535-1541.
8. Razem D. Twenty years of radiation sterilization in Croatia. *Radiation Physics and Chemistry* 2004; **71**: 597-602.
9. Takechi M., Miyamoto Y., Momota Y. et al. Effects of various sterilization methods on the setting and mechanical properties of apatite cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004; **69**: 58-63.
10. Dorozhkin S.V., Schmitt M., Bouler J.M., Daculsi G. Chemical transformation of some biologically relevant calcium phosphates in aqueous media during a steam sterilization. *J Mater Sci Mater Med* 2000; **11**: 779-786.
11. Fu J., Shen W., Bao J., Chen Q. The decontamination effects of gamma irradiation on the edible gelatin. *Radiation Physics and Chemistry* 2000; **57**: 345-348.
12. Daochuan Y., Zuren Z., Zongtiao L., Jie F. Effects of gamma ray radiation sterilization on chemical components of soy sauce. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* 1989; **34**: 869-870.
13. Vieira F.F., Del Mastro N.L. Comparison of  $\gamma$ -radiation and electron beam irradiation effects on gelatin. *Radiation Physics and Chemistry* 2002; **63**: 331-332.
14. Aliste A.J., Vieira F.F., Del Mastro N.L. Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. *Radiation Physics and Chemistry* 2000; **57**: 305-308.
15. Jingtian Y., Xinhua J., Guoxing G., Guichun Y. Studies of soy sauce sterilization and its special flavour improvement by gamma-ray irradiation. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* 1988; **31**: 209-213.
16. Sabato S.F., Lacroix M. Radiation effects on viscosimetry of protein based solutions. *Radiation Physics and Chemistry* 2002; **63**: 357-359.
17. Junjie F., Hongcheng F., Weiying Z. Studies on calcium alginate starch fiber by radiation sterilization and its biology. *Radiation Physics and Chemistry* 1993; **42**: 633-635.

18. Straughan D.W, Fentem J.H., Balls M. Replacement alternative and complementary in vitro methods in pharmaceutical research. In: Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. In vitro methods in pharmaceutical research. San Diego, California: Academic Press, 1997.
19. Barile F.A. Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment. In: Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. In vitro methods in pharmaceutical research. San Diego, California: Academic Press, 1997.
20. Combes R.D. Alternatives to animal testing. In: John B.T., David J.T. Comprehensive medicinal chemistry II. Oxford: Elsevier, 2007; 463-487.
21. Balls M., Fentem J.H. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. *Toxicology in Vitro* 1999; **13**: 837-846.
22. Kroll A., Pillukat M.H., Hahn D., Schneidenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment - Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; **72**: 370-377.
23. Barratt M.D., Chamberlain A. Integration of QSAR and in vitro toxicology. In: Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. In vitro methods in pharmaceutical research. San Diego, California: Academic Press, 1997.
24. Davison K.S., Siminoski K., Adachi J.D. et al. Bone strength: The whole is greater than the sum of its parts. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2006; **36**: 22-31.
25. Favus M.J. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003.
26. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; **423**: 337-342.
27. Liu F., Malaval L., Aubin J.E. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Experimental Cell Research* 1997; **232**: 97-105.
28. Yamada S., Heymann D., Bouler J.M., Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997; **18**: 1037-1041.
29. Stein G.S., Lian J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993; **14**: 424-442.
30. Rodan S.B., Imai Y., Thiede M.A. et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Research* 1987; **47**: 4961-4966.
31. Ahmad M., McCarthy M., Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999; **20**: 211-220.
32. Cell Lines Service. [http://www.cell-lines-service.de/content/index\\_eng.html](http://www.cell-lines-service.de/content/index_eng.html). 2008.

33. Fox M.W. Laboratory animal husbandry: Ethnology, welfare and experimental variables. USA: State University of New York Press, 1986.
34. Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. London: Blackwell Science Ltd., 1999.
35. Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E., Pearce S.G. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials* 2007; **13**: 1-10.
36. Kozma C., Macklin W., Cummins L.M., Russell M. The anatomy, physiology, and the biochemistry of the rabbit. In: Neisbroth S.H., Flatt R.E., Raus A.L. The biology of the laboratory rabbit. Sandiego California: Academic press Inc., 1974; 50-72.
37. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, 1986.
38. Chollet C., Chanseau C., Remy M. et al. The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials* 2009; **30**: 711-720.
39. Cao W., Hench L.L. Bioactive materials. *Ceramics International* 1996; **22**: 493-507.
40. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. *J Mater Sci.* 2008; **43**: 3028-3057.
41. Ishikawa K., Takagi S., Chow L.C., Ishikawa Y., Eanes E.D., Asaoka K.. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dental Materials* 1994; **10**: 26-32.
42. Kawasaki T., Takahashi S., Ideda K. Hydroxyapatite high-performance liquid chromatography: column performance for proteins. *European Journal of Biochemistry* 1985; **152**: 361-371.
43. Fernandez E., Ginebra M.P., Boltong M.G. et al. Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; **32**: 367-374.
44. Ginebra M.P., Fernandez E., DeMaeyer E.A.P. et al. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* 1997; **76**: 905-912.
45. Durucan C., Brown P.W.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2000; **11**: 365-371.
46. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials* 2009; **2**: 399-498.

47. Kim H.M. Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2003; **7**: 289-299.
48. Xu H.H.K., Carey L.E., Carl S.G. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2007; **18**: 1345-1353.
49. Link D.P., van den Dolder J., Wolke J.G.C., Jansen J.A. The cytocompatibility and early osteogenic characteristics of an injectable calcium phosphate cement. *Tissue Engineering* 2007; **13**: 493-500.
50. Xu H.H.K., Weir M.D., Simon C.G. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dental Materials* 2008; **24**: 1212-1222.
51. dos Santos L.A., Carrodguas R.G., Rogero S.O., Higa O.Z., Boschi A.O., de Arruda A.C.F.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate cement: "in vitro" cytotoxicity. *Biomaterials* 2002; **23**: 2035-2042.
52. Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 1999; **10**: 169-176.
53. Yuan H., van Blitterswijk C.A., de Groot K., de Bruijn J.D. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Engineering* 2006; **12**: 1607-1615.
54. del Valle S., Miño N., Muñoz F., González A., Planell J.A., Ginebra M.P. In vivo evaluation of an injectable macroporous calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2007; **18**: 353-361.
55. Salamanc S. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales. *Universitat de Barcelona*, 2004.
56. Camire C.L., Saint-Jean S.J., Mochales C. et al. Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted alpha-tricalcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2006; **76**: 424-431.
57. del Real R.P., Oms E., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A* 2003; **65**: 30-36.
58. Pioletti D.P., Takei H., Lin T. et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials* 2000; **21**: 1103-1114.
59. Truumees E., Herkowitz, H.N. Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery. *U.P.O.J.* 1999; **12**: 77-88.
60. Göckelmann M. Untersuchung von neuen injizierbaren makroporösen knochenementen im tiermodell. *Ulm Universität*, 2010.



# Chapter 7: Conclusions.

---

1. One of the most important milestones achieved in this thesis was to obtain injectable and *in situ* self-setting hydroxyapatite foams, which can be applied in the treatment of bone defects through minimally invasive surgery, in fields like regenerative medicine, orthopedic, oral, and/or maxillofacial reconstruction. The possibility of obtaining a synthetic material that satisfies moldability, injectability, macroporosity, bioactivity and *in situ* self-setting capacity, represents a substantial progress in the development of new materials for bone regeneration or to increasing bone mass, via minimally invasive surgical techniques.
2. The incorporation of 0.5 w/v % Tween 80 in the liquid phase of the cement based on alpha tricalcium phosphate, enables to obtain injectable hydroxyapatite foams with Tween 80 content below the maximum dosage recommended for parenteral administration. Furthermore, the Tween 80 incorporation as foaming agent did not affect the setting reaction of the cement.
3. Gelatin and soy extract can be used as natural foaming agents to obtain hydroxyapatite foams. In addition, these two biopolymers improve the cement paste injectability and the use of gelatin considerably increases the cohesion of the foams. In contrast with the performance of gelatin and soy extract, sodium alginate showed no great advantages as foaming agent, as injectability or cohesion promoter.
4. By comparing the two types of the studied foaming agents (synthetic and natural) it can be concluded that the synthetic surfactants, like Tween 80, were more efficient to produce hydroxyapatite foams in comparison with natural ones. However, gelatin and soy extract improve the injectability and/or the cohesion of the foamed pastes, both essential properties to use these foams as injectable synthetic bone grafting materials.
5. The incorporation of the soy extract increases the cement paste moldability, also improves considerably the paste injectability and decreases the load needed to inject the cement. This allows working with low liquid/powder ratios which permit an increase in the final compressive strength of the cements. Nevertheless, soy extract/cements have low cohesion, which can be improved by incorporating gelatin to the cement formulation.
6. The foamability of the liquid phase was the most significant parameter to obtain hydroxyapatite foams. Nevertheless, the obtained liquid foam should be stable enough to resist the stresses produced when is mixed with the cement powder. In this sense, the liquid phase properties could be tailored through the polymer molecular weight and concentration. High polymer concentrations, or high molecular weight, decrease foamability, but increase foam stability. In contrast, low polymer contents, or low molecular weight, increase the foamability but decrease the foam stability. In order to obtain the best results, the foamability should be promoted.

7. Open macropores were created before cement setting due to the partial breakage of the continuous phase of the foam. There are two reasons which prevent the formation of interconnections between macropores a) very stable liquid foams, such as foams able to gelify, and/or b) low macropore formation due to the use of a low liquid/powder ratio.
8. The incorporation of macroporosity in the cement decreases the cohesion of the pastes. On one hand, cement pastes with cohesion are suitable for bone grafting as self-setting material. On the other hand, pastes without cohesion could be used for the fabrication of preset grafts or scaffolds, with the advantage that they could be obtained in large quantities and in all kinds of geometries and required sizes.
9. The increase of the liquid/powder ratio increases the macroporosity of hydroxyapatite foams; the upper limit was associated to the mechanical resistance of the solid foam. To maintain the spherical shape of the macropores it is important to inject the foamed paste as soon as possible. To obtain open macropores on the surface of the preset scaffolds it is recommended to impregnate the mold with demolding oil.
10. The macropores incorporation decreases exponentially the compressive strength of the foams. Due to this, the obtained self-setting hydroxyapatite foams should be used as grafting materials for non-bearing conditions. Sintering the hydroxyapatite foams allows obtaining beta tricalcium phosphate foams, with higher compressive strength. Nevertheless, the sintered foams cannot be implanted by minimally invasive surgery.
11. Saos-2 osteoblasts like cells were able to proliferate on the hydroxyapatite foams, to colonize the open macropores at the surface, and reach the confluence after 14 days of culture. Furthermore, these cells showed osteocalcin production as a sign of mineralization. Therefore, the foams were able to support osteoblast metabolism.
12. Gamma radiation was a good method to sterilize the raw materials for the sterile preparation of the hydroxyapatite foams. When the hydroxyapatite foams were implanted *in vivo* by injection, they showed enough cohesion to set *in situ*, adapting perfectly to the bone defect shape. Hydroxyapatite foams obtained with soy extract and/or gelatin did not show chronic inflammation. Furthermore, they were osteointegrated, resorbed and substituted by new bone. In contrast, the foams obtained with sodium alginate showed some chronic inflammation.
13. The *in vivo* study showed the feasibility of applying the liquid phase foaming method in clinical conditions. Nevertheless, future preclinical studies should be performed in order to select the best hydroxyapatite foam formulation.

# Capítulo 8: Trabajos publicados y perspectivas futuras.

---

## 8.1 Trabajos publicados

A continuación se listan las publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral.

### 8.1.1 Revistas científicas indexadas

1. M.P. Ginebra, M. Espanol, E.B. Montufar, R.A. Perez, G. Mestres. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 2863-2873.
2. E.B. Montufar, T. Traykova, E. Schacht, L. Ambrosio, M. Santin, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. *J Mater Sci: Mater Med* 2010; **21**: 863-869.
3. E.B. Montufar, T. Traykova, C. Gil, I. Harr, A. Almirall, A. Aguirre, E. Engel, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 876-85.
4. M. Espanol, R.A. Perez, E.B. Montufar, C. Marichal, A. Sacco, M.P. Ginebra. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2009; **5**: 2752-62.
5. E.B. Montufar, C. Gil, T. Traykova, M.P. Ginebra, J.A. Planell. Foamed beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Key Engineering Materials* 2008; **361-363**: 323-326.

### 8.1.2 Comunicaciones en congresos

1. E.B. Montufar, T. Traykova, E. Schacht, L. Ambrosio, M. Santin, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Injectable soy bean-hydroxyapatite cements and foams for bone regeneration. 23<sup>rd</sup> European Conference on Biomaterials, Tampere-Finland, **Accepted**, September 2010.
2. E.B. Montufar, M.P. Ginebra. Injectable hydroxyapatite foams for bone regeneration. TOPEA Meeting, Barcelona-Spain, June-July 2010.
3. E.B. Montufar, T. Traykova, E. Schacht, L. Ambrosio, M. Santin, J. A. Planell, M. P. Ginebra. Self-hardening hydroxyapatite foams for minimal invasive bone grafting. GRIBOI congress, Turin-Italy, March 2010.
4. E.B. Montufar, T. Traykova, E. Schacht, L. Ambrosio, M. Santin, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Injectable hydroxyapatite foams for bone regeneration applications: comparison of synthetic and natural foaming agents. Biofoams congress, Niagara Falls-Canada, October 2009.

5. E.B. Montufar, T. Traykova, E. Schacht, L. Ambrosio, M. Santin, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. 22<sup>nd</sup> European Conference on Biomaterials, Lausanne-Switzerland, September 2009.
6. A. Aguirre, E.B. Montufar, M.A. Koch, E. Vrij, M.P. Ginebra, D. Lacroix, J.A. Planell, E. Engel. Mesenchymal stem cell response to macroporous calcium phosphate scaffolds and mechanical stimulation in a perfusion bioreactor. GEM4 Summer School, Urbana-Champaign, IL-USA, June 2009.
7. E.B. Montufar, T. Traykova, C. Gil, I. Harr, A. Almirall, A. Aguirre, E. Engel, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Macroporous scaffolds for bone tissue engineering based on foamed calcium phosphate cements. 8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Amsterdam-Nederland, May-June 2008.
8. E.B. Montufar, C. Gil, T. Traykova, M.P. Ginebra, J.A. Planell. Foamed beta-tricalcium phosphate scaffolds. Bioceramics 20, Nantes-France, October 2007.
9. E.B. Montufar, C. Gil, T. Traykova, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Substratos macroporosos bioactivos para ingeniería de tejido óseo. MATERIA 2007, Michoacan-México, Octubre 2007.
10. E.B. Montufar, A. Almirall, A. Palmqvist, T. Traykova, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Macroporous scaffolds for bone tissue engineering obtained via foaming of calcium phosphate cement. Fourth meeting of European school of materials science and engineering, Barcelona-Spain, June, 2007.
11. E.B. Montufar, A. Aguirre, C. Gil, E. Engel, M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell. Biocompatibility of an injectable macroporous Tween-calcium phosphate cement for bone tissue engineering. 8<sup>th</sup> advanced summer course in cell-materials interactions, Porto-Portugal, June 2007.
12. E.B. Montufar, A. Almirall, A. Palmqvist, T. Traykova, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Obtención de andamios macroporosos para regeneración ósea a partir del espumado de cementos de fosfato de calcio. XXIX Congreso de la sociedad ibérica de biomecánica y biomateriales, Reus-España, Noviembre 2006.

## 8.2 Perspectivas futuras

La gran ventaja que poseen las espumas de hidroxiapatita (HA) desarrolladas en esta tesis, es la posibilidad de ser implantadas mediante procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos. Esta característica se debe a la capacidad de autofraguado bajo condiciones fisiológicas del cemento en base a fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP).

Por esta razón, el siguiente paso en la caracterización podría ser un estudio preclínico *in vivo* con una especie animal de mayor similitud al ser humano. En este estudio se podría determinar la factibilidad de uso clínico de al menos una formulación de espuma inyectable. Además, se podría determinar si las espumas poseen *per se* propiedades osteoinductivas, propiedad que no pudo ser determinada en el proyecto Smart CaP, puesto que el conejo no es un buen modelo para tal fin.

Tomando ventaja de que la reacción de fraguado tiene lugar a temperatura fisiológica, una estrategia para acelerar la regeneración de lesiones óseas es incorporar factores de crecimiento óseo o de vascularización en las espumas de HA. La incorporación de estos factores puede hacerse mediante dos alternativas. La primera, y probablemente con mayor potencial, es incorporar los factores durante la preparación de las espumas, probablemente en la fase líquida del cemento. Bajo este enfoque, los factores estarían homogéneamente distribuidos en la espuma y podrían liberarse controladamente conforme se degrada una vez implantada. La dificultad de esta metodología radica en los intercambios iónicos y la variación de pH que tienen lugar en el material durante la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP, los cuales podrían desnaturalizar los factores incorporados o disminuir su actividad biológica.

La segunda alternativa consiste en depositar los factores por adsorción en la superficie de la espuma prefraguada. Esta estrategia es más sencilla de llevar a cabo, sin embargo, es poco probable que la distribución de los factores sea homogénea, puesto que es más difícil que el factor difunda hacia la parte interna de la espuma. Además, es probable que la liberación del factor no dependa de la degradación de la espuma, sino de la desorción del mismo una vez implantada. La ventaja de este método es que los factores no estarán expuestos al microambiente agresivo que tiene lugar durante el fraguado de la espuma.

Algunos factores que pueden ser incorporados son la proteína morfogenética ósea (BMP-2), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o concentrados de plaquetas humanas, los cuales son una mezcla de factores con un alto poder regenerativo.

Otra posibilidad para obtener espumas de HA osteoinductivas es modificar la microestructura y/o la composición del material. Por un lado, se sabe que las propiedades superficiales del material pueden llegar a inducir la formación de hueso. La morfología de la superficie de las espumas de HA puede modificarse variando el tamaño de partícula del polvo de  $\alpha$ -TCP. Cristales de HA con forma de agujas y de mayor superficie específica se pueden obtener empleando polvos de cemento de menor tamaño en comparación al empleado en esta tesis, el cual genera cristales de HA con forma de placas.

Por otro lado, se sabe también que las mezclas HA/fosfato tricálcico beta ( $\beta$ -TCP), denominadas cerámicas bifásicas, poseen propiedades osteoinductivas. Existe la posibilidad de obtener espumas cerámicas bifásicas autofraguables partiendo de una fase sólida de cemento consistente en la mezcla de  $\alpha$ -TCP/ $\beta$ -TCP. La hipótesis es que el  $\beta$ -TCP se mantendrá relativamente intacto durante la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP a CDHA, produciendo una mezcla CDHA/ $\beta$ -TCP potencialmente osteoinductiva.

Un reto que queda pendiente es aumentar el tamaño de la macroporosidad abierta inducida en las espumas obtenidas con los biopolímeros. Para lograrlo se podrían combinar al espumado de la fase líquida otros métodos de obtención de cementos macroporosos, como por ejemplo la incorporación de partículas solubles o la generación de gases. Cabe mencionar que esta tarea es más sencilla en el caso de las espumas prefraguadas, debido a que se puede controlar en el laboratorio las condiciones de fraguado, como por ejemplo el fraguado en atmósfera saturada de humedad, condición que no requiere que las pastas espumadas posean cohesión inmediata.

Independientemente de las diferentes líneas que se pueden seguir para optimizar las espumas de HA, las espumas desarrolladas pueden ser empleadas para realizar gran variedad de estudios de interés. Por ejemplo, se podría estudiar en tres dimensiones el sembrado, la proliferación y la diferenciación de células mesenquimales dentro de un bioreactor. Adicionalmente se podría determinar el efecto de la estimulación mecánica en el desarrollo de tejido óseo artificial. Otro estudio podría consistir en determinar los mecanismos de interacción iónica entre el medio de cultivo y las espumas de HA para optimizar las condiciones de cultivo.

Debido a la buena biocompatibilidad del  $\beta$ -TCP, se podrían estudiar *in vitro* e *in vivo* el poder osteogénico las espumas de  $\beta$ -TCP obtenidas a través de la sinterización de las espumas de HA. Sería también de interés comparar la eficacia en la regeneración ósea de estos dos tipos de espumas.

Como puede observarse, a pesar de los avances obtenidos, quedan diversos aspectos pendientes en el sentido de obtener materiales que cumplan por completo y de forma eficiente los requisitos de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos.



# Anexos.

---

## A.1 Lista de abreviaturas

<b>A</b>	Acelerante	<b>T</b>	Tween 80
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina	<b>TCPS</b>	Plástico de placa de cultivo
<b>An</b>	Alginato de sodio sin sulfatar	<b>W</b>	Agua
<b>As</b>	Alginato de sodio sulfatado	<b>w/v</b>	Peso/volumen
<b>As**</b>	Alginato de sodio sulfatado de alto peso molecular	<b>w/w</b>	Peso/peso
<b>α-TCP</b>	Fosfato tricálcico alfa		
<b>β-TCP</b>	Fosfato tricálcico beta		
<b>CDHA</b>	Hidroxiapatita deficiente en calcio		
<b>CMC</b>	Concentración micelar critica		
<b>CPC</b>	Cemento de fosfato de calcio		
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X		
<b>DS</b>	Grado de sulfatación		
<b>E</b>	Espumado		
<b>ECM</b>	Matriz extracelular		
<b>E-Iny</b>	Espumado e inyectado		
<b>EQ</b>	Ecuación		
<b>FDA</b>	Food and drug administration		
<b>Ga</b>	Gelatina tipo A		
<b>Gb</b>	Gelatina tipo B		
<b>HA</b>	Hidroxiapatita		
<b>IR</b>	Infrarrojos		
<b>IT</b>	Ingeniería de tejidos		
<b>L/P</b>	Líquido/polvo		
<b>LDH</b>	Lactato de deshidrogenasa		
<b>MEB</b>	Microscopia electrónica de barrido		
<b>MIP</b>	Porosimetría de intrusión de mercurio		
<b>MSC</b>	Célula mesenquimal		
<b>μ-CT</b>	Micro-tomografía computacional		
<b>NE</b>	No espumado		
<b>II</b>	Porosidad		
<b>PIE</b>	Punto isoeléctrico		
<b>PM</b>	Peso molecular		
<b>PT</b>	Plan de trabajo		
<b>ρ</b>	Densidad		
<b>RGD</b>	Arginina-glicina-ácido aspártico		
<b>S</b>	Extracto de soja		
<b>SBF</b>	Fluido fisiológico simulado		

## A.2 Análisis estadísticos

### A2.1 Propagación de errores

El valor de una propiedad física  $X$  se determina experimentalmente realizando medidas de la misma. Sin embargo, debido al principio de incertidumbre de Heisenberg, no se puede medir el valor real de la propiedad y por tanto siempre se comete un error experimental denominado  $\Delta X$ . Con el objetivo de disminuir el error experimental se realizan varias mediciones de  $X$ , con las que se puede determinar un valor promedio denominado  $\bar{X}$ , que se acerca más al valor real cuantas más replicas se realizan.

Por otro lado, muchas de las propiedades de interés científico son obtenidas indirectamente mediante combinaciones aritméticas de valores determinados experimentalmente. De tal forma que el resultado numérico de la propiedad calculada incluye el error experimental de cada una de las variables involucradas en el cálculo. Por lo que para realizar el análisis objetivo de los datos, es importante conocer el valor del error con el que se estima la propiedad. A lo cual se le denomina cálculo de la propagación de errores.

Como se acaba de mencionar, el error en el cálculo de la propiedad  $f$  es función del error experimental de cada una de las variables involucradas en su determinación. Lo cual se expresa matemáticamente mediante la ecuación A1.1.

$$\Delta f(X, Y, Z, \dots) = \left| \frac{\partial f}{\partial X} \right| \Delta X + \left| \frac{\partial f}{\partial Y} \right| \Delta Y + \left| \frac{\partial f}{\partial Z} \right| \Delta Z + \dots \quad \text{EQ A1.1}$$

Con la ecuación anterior es posible calcular la propagación del error para cualquier relación o ley física existente. A continuación se da un ejemplo del cálculo del error para una relación física tan sencilla como un cociente.

En este ejemplo la propiedad a determinar es  $Z$ , que puede representar físicamente la densidad de un material y es función de las variables  $X$  y  $Y$ . La relación entre las variables se representa mediante la ecuación A1.2.

$$Z(X, Y) = \frac{X}{Y} \quad \text{EQ A1.2}$$

Sustituyendo la ecuación A1.2 en la ecuación A1.1 se obtiene la ecuación A1.3:

$$\Delta Z(X, Y) = \left| \frac{\partial \frac{X}{Y}}{\partial X} \right| \Delta X + \left| \frac{\partial \frac{X}{Y}}{\partial Y} \right| \Delta Y \quad \text{EQ A1.3}$$

Al realizar las operaciones correspondientes y simplificar la ecuación A1.3 se obtiene la representación del error cometido en el cálculo de  $Z$  ( $\Delta Z$ ), en función de los errores experimentales  $\Delta X$  y  $\Delta Y$  (Ecuación A1.4).

$$\Delta Z = \frac{\Delta X}{X} + \frac{\Delta Y}{Y} \quad \text{EQ A1.4}$$

Como se ve, el cálculo final del error es sencillo y depende solamente de los valores experimentales.

## **A2.2 Representación de los errores experimentales**

Los valores de los errores experimentales reportados a lo largo de la tesis corresponden a la desviación estándar del conjunto de datos analizados.

## **A2.3 Pruebas estadísticas**

El análisis estadístico realizado a lo largo de la tesis no requirió del empleo de software especializado.

Las pruebas de igualdad de medias se realizaron aplicando la prueba estadística t de Student.

El criterio de rechazo o aceptación de la hipótesis nula se fijó en todos los casos en un porcentaje de probabilidad del 0.05 %.

## **A.3 Protocolo de espumado para obtener espumas de hidroxiapatita**

### **A3.1 Condiciones de espumado de la fase líquida**

2 ml de disolución de fase líquida son espumados por agitación mecánica durante un minuto dentro de recipientes de polipropileno de 3 cm de diámetro por 7 cm de alto (Eurotubo – Deltalab). El agitador empleado para la formar la espuma se describe a detalle en el capítulo 3 de esta tesis, y debe ser operado en la velocidad más baja (1.5 v).

Para trabajar bajo condiciones de esterilidad, el recipiente del espumado y la punta del agitador deben estar estériles y usarse una sola vez por cada preparación. En el caso del recipiente, éste se vende estéril para su uso desechable. Mientras que la punta debe esterilizarse cada vez por autoclave. Es recomendable tener disponibles tantas puntas estériles de recambio como sean necesarias.

### **A3.2 Mezcla de la fase sólida con la líquida**

Inmediatamente después de formar la espuma, el polvo del cemento debe ser agregado en un solo paso sobre la espuma en el mismo recipiente del espumado. La mezcla del polvo con la espuma consta de dos etapas.

En la primera etapa, la mezcla con espátula debe realizarse lentamente provocando que la espuma moje al polvo. Durante esta etapa se tiene la impresión de que el cemento no formara una pasta moldeable, sin embargo 20 – 30 segundos después se observa un incremento en la fluidez de la pasta. Es en este momento cuando se inicia la segunda etapa del mezclado. En la segunda etapa, la mezcla debe hacerse con más fuerza y velocidad con movimientos circulares en una sola dirección, para conseguir homogenizar la pasta. Sin embargo, debe tenerse precaución de no exceder la fuerza y romper las burbujas de la espuma. Cuando la pasta es homogénea, puede ser moldeada sin dificultad. El tiempo total máximo de mezcla recomendado es de 1.5 minutos.

### **A3.3 Moldeo y fraguado**

Finalmente, la pasta cementante puede ser inyectada o moldeada con espátula de acuerdo al tipo de aplicación y a las características de la espuma preparada. La inyección debe realizarse lo más rápidamente posible para no perder la inyectabilidad.

Si la pasta se inyecta dentro de cavidades, se recomienda iniciar la inyección por el fondo e ir subiendo lentamente hasta llenar la cavidad. En cambio si se moldea con espátula se recomienda no comprimir la pasta para no colapsar las burbujas.

### **A.3.4 Preparación de las muestras para cultivo celular**

La preparación de espumas estériles de hidroxiapatita se realiza bajo campana de flujo laminar, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio que se usan en biología para realizar cultivos celulares, y con materias primas esterilizadas.

Tomando ventaja de la buena inyectabilidad de los cementos, entre 0.4 y 0.6 ml de pasta deben ser inyectados dentro del pozo de la caja de cultivo para 48 muestras, donde se realizará el experimento.

Una vez inyectada la pasta de cada jeringa, es necesario golpear ligeramente la base de la placa de cultivo sobre la superficie de trabajo, con la intención de expandir el cemento sobre el pozo y obtener una superficie de cemento plana. Este paso debe hacerse inmediatamente después de inyectar cada jeringa, si se demora, la pasta inicia el fraguado y ya no puede ser expandida.

Para conservar de la mejor forma la porosidad introducida por el proceso de espumado, se deben inyectar las espumas en orden creciente de fluidez y tiempo de fraguado.

Una vez inyectados todos los cementos se colocaron 500  $\mu$ l de agua destilada estéril sobre cada pozo para llevar a cabo la reacción de fraguado, el agua debe cambiarse cada 24 horas. La placa con las espumas se incubó a 37 °C durante 12 días para realizar el fraguado.

Finalmente, antes de iniciar el cultivo celular y después del fraguado, se remueve el agua de cada pozo y se colocan 500  $\mu$ l de medio de cultivo completo durante las 24 horas previas al sembrado de las células. Este paso puede evitarse en el caso de formulaciones funcionalizadas.

### **A.3.5 Preparación de las espumas de hidroxiapatita para implantar mediante inyección**

Las espumas de hidroxiapatita deben ser preparadas bajo condiciones estériles para poderlas implantar. Se recomienda preparar la fase líquida de las espumas, bajo campana de flujo laminar, el día anterior a la implantación, y además separar dosis de los componentes adecuadas a las cantidades de espuma que se pretenden implantar.

Dentro del quirófano debe haber una zona de trabajo desinfectada del mismo modo que la mesa de operaciones. En el caso de implantar espumas que contengan gelatina se requiere además de un calentador térmico con agua previamente esterilizada, para minimizar las posibilidades de contaminación.

En el momento en que el cirujano requiera la pasta se abren las dosis con los componentes de la espuma a implantar. Y se realiza el proceso de espumado de la misma forma como si se trabajara dentro de una campana de flujo laminar. De tal forma que la mezcla de la espuma con el cemento en interior de los recipientes es estéril.

Una vez obtenida la pasta espumada, aproximadamente en 2 minutos, ésta debe ser introducida en la jeringa con la que se implantará. Puesto que el operario ha trabajado con instrumental no estéril, pero aséptico, no puede sujetar la jeringa que el cirujano empleará para inyectar el material. Por tanto, el cirujano debe abrir la jeringa y sujetarla mientras que el operario introduce la pasta. Una vez llena la jeringa, el cirujano debe inyectar la espuma inmediatamente, de acuerdo al anexo A3.3.

#### **A.4 Notas y fe de erratas**

Este es un espacio dedicado para quien desee hacer sus contribuciones, marcando las erratas no halladas durante la redacción y las revisiones de la memoria de tesis.